

28
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**EVALUACION DE LA TECNICA DE INMUNODIFUSION
PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LEUCEMIA
VIRAL FELINA**

T E S I S
Que para obtener el Título de
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
p r e s e n t a

VERONICA ESTRADA GIL

Asesor: M. V. Z. Guillermo Valdivia Anda

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

ESTRADA GIL VERONICA. " Evaluación de la técnica de Inmunodifusión para el diagnóstico serológico de Leucemia Viral Felina ".

El virus de la leucemia felina (FeLV), es un Retrovirus transmisible y contagioso en gatos domésticos, el cual se originó hace millones de años por medio de la transmisión de un Retrovirus endógeno de la rata hacia los ancestros de los gatos actuales. Excluyendo los padecimientos traumáticos, las enfermedades asociadas con FeLV se han convertido en la causa principal de muerte en los gatos domésticos de México y Estados Unidos.

La infección persistente de FeLV da como resultado tres síndromes clínicos diferentes, que pueden ocurrir solos o en combinación; (1) proliferación incontrolada de células transformadas por el virus, resultando en linfosarcoma o leucemia linfóide, mielóide o eritroleucemia, (2) degeneración de las células progenitoras dando como resultado anemia no regenerativa, leucopenia y/o trombocitopenia, y (3) inmunosupresión generalizada que predispone a infecciones oportunistas.

Actualmente, existen dos pruebas diagnósticas disponibles para detectar la infección por FeLV, ambas detectan el antígeno de grupo específico del virus; p27. La prueba de inmunofluorescencia (IFA), detecta el antígeno en leucocitos y plaquetas en frotis de sangre, y un resultado positivo indica que las células de médula ósea están produciendo activamente el virus. La prueba de Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), utiliza un anticuerpo ligado a una enzima que cambia de color al detectar el antígeno p27. Comparado con la prueba de IFA, la prueba de ELISA es más apropiada para detectar una infección débil, temprana o transitoria, cuando los antígenos virales muchas veces no están presentes en leucocitos.

El presente trabajo fué elaborado con el fin de evaluar otra opción para el diagnóstico de la enfermedad producida por FeLV, tratándose de la técnica de doble Inmunodifusión en agar. En general, las técnicas de inmunodetección deben ser sensibles, rápidas, convenientes y específicas. En estudios anteriores se ha indicado que la prueba de IFA es la más específica y sensible , seguida por sensibilidad pero menos específica ELISA y después por aún menos sensible, pero altamente específica; Inmunodifusión (ID).

Se utilizaron 25 gatos provenientes de distintas ubicaciones en la zona de Satélite, Edo. de Mex., a los cuales se les realizó exploración y anamnesis a los propietarios para obtener una historia clínica completa de cada gato. Todos los animales fueron muestreados para obtener resultados mediante las técnicas de ELISA e ID. A 16 de éstos gatos se les tomaron muestras para biometría hemática (B.H.) y citología de médula ósea (M.O.), con el fin de comparar las relaciones celulares en la médula ósea de animales normales y serológicamente positivos a FeLV y además relacionarlas con los resultados obtenidos en la biometría hemática. Finalmente se realizó una correlación de todos estos parámetros en conjunto: M.O., B.H., ELISA e ID. Estos fueron de gran ayuda para ubicarnos en qué fase de la enfermedad se encontraban los animales en ese momento (no virémicos, virémicos transitorios, latencia o viremia persistente).

Más del 50% del total de los gatos resultaron positivos a antígeno de FeLV mediante la técnica de ELISA, y el 47.6% también fueron positivos a antígeno por medio de ID.

Los resultados de mayor interés durante la elaboración de este trabajo, se refieren a las comparaciones entre los resultados de ELISA e ID. Al tratarse ID de una prueba con poca sensibilidad, era de esperarse que se obtuvieran cierto porcentaje de resultados ID (-), ELISA (+), ya que ésta última requiere de cantidades extremadamente bajas de antígeno para dar un resultado positivo.

Utilizando este mismo principio de sensibilidad, es paradójico pensar en un resultado ID (+), ELISA (-). Sin embargo, éste resultado se obtuvo en casi una cuarta parte del total de muestras probadas para ID. Entre las causas posibles que desencadenan la aparición del resultado ID (+), ELISA (-), podemos citar la detección por medio de ID de:

- 1.- Antígenos de tipo no virales.
- 2.- Antígenos diferentes a p27, pero que también son componentes estructurales del virus de FeLV.
- 3.- Virus diferentes a FeLV con los cuales se produzca cruce antigénico.
- 4.- Subgrupo viral de FeLV diferente a A, B ó C.

Se sugiere realizar estudios posteriores con respecto a estos puntos para mejorar la calidad de la técnica de ID y de esta manera permitir su utilización en la práctica clínica como método diagnóstico para la enfermedad producida por FeLV.

INDICE

PAG.

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	25
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	50

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla No. 1.- Patrones epidemiológicos en infecciones por FeLV	12
Tabla No. 2.- Valores sanguíneos y composición celular en la médula ósea de animales normales	12
Tabla No. 3.- Programa para el control de las infecciones por FeLV	13
Tabla No. 4.- Signología clínica principal en los 25 animales muestreados	27
Tabla No. 5.- Resultados de la biometría hemática en los gatos trabajados	28
Tabla No. 6.- Resultados de la citología en médula ósea para los gatos estudiados	29
Tabla No. 7.- Resultados obtenidos mediante las técnicas de ELISA e Inmunodifusión en los 25 gatos	30
Tabla No. 8.- Frecuencia de antígeno y anticuerpo contra el Virus de Leucemia Felina mediante Inmunodifusión	31
Tabla No. 9.- Número de muestras positivas y negativas a antígeno en ELISA e Inmunodifusión	31
Tabla No. 10.- Pruebas de hipótesis para las técnicas de ELISA e Inmunodifusión en relación con biometría hemática y médula ósea	32
Tabla No. 11.- Sensibilidades relativas de las técnicas de Inmunoensayo	46
Tabla No. 12.- Comparación de los métodos para la detección de infecciones por retrovirus categorizadas por orden de sensibilidad y especificidad	46
Esquema No. 1.- Distribución de perforaciones en agar agar y agar noble al 1% en solución salina fisiológica (SSF)	20
Esquema No. 2.- Distribución de perforaciones en agar agar al 1% en diferentes pH	21
Esquema No. 3.- Distribución de perforaciones en agarosa al 1% en cajas de Petri	21
Esquema No. 4.- Evaluación de diversos factores utilizando suero hiperinmune	21
Esquema No. 5.- Evaluación del suero hiperinmune	22
Esquema No. 6.- Evaluación de anticuerpos y/o antígenos en los sueros problema	22
Esquema No. 7.- Segunda evaluación de antígenos y/o anticuerpos en los sueros problema	23
Esquema No. 8.- Reacción de doble difusión del tipo de Ouchterlony mostrando reacciones de identidad, no identidad y formación de espolones	40

INTRODUCCION

DEFINICION Y ANTECEDENTES

El virus de la leucemia felina (FeLV), es el agente causal del complejo de enfermedad infecciosa fatal más importante de los gatos de América hoy en día. Este virus puede ocasionar muy diversas enfermedades en gatos domésticos; desde un síndrome similar al SIDA felino, hasta cáncer. Mientras muchos gatos son capaces de resistir la infección, o mostrar mínimos efectos secundarios, cerca de un tercio de los gatos infectados enferman y mueren (Siegal, 1991; Childs, 1992).

En 1964, Jarret y sus colaboradores demostraron que un virus similar a aquel causante de la leucemia murina, estaba presente en células de linfosarcoma felino. Este descubrimiento fue pronto confirmado por otros (Kawakami et al 1967, Rickard et al 1967, Theilen et al 1969) (Hagan, 1988)

El rango de animales (hospederos) susceptibles a la infección por FeLV está restringido a los miembros de la familia de los felinos. Son susceptibles las razas domésticas, y también ciertos gatos exóticos pequeños como gato silvestre europeo, gatos de selva y posiblemente leopardos (Childs, 1992).

Los gatos infectados por FeLV persistentemente, son susceptibles a enfermedades que son directa o indirectamente causadas por el virus. Aquellas causadas directamente, incluyen linfomas malignos, enfermedades mieloproliferativas, diversos tipos de anemias, síndrome de pautucopenia y atrofia del timo, al menos una forma de enfermedad renal, ciertos desordenes reproductivos y otras diversas condiciones. Las enfermedades indirectamente ocasionadas incluyen muchas condiciones que se desarrollan secundariamente a la inmunosupresión inducida por FeLV (Hagan, 1988).

CARACTERISTICAS VIRALES

El virus causal de FeLV, pertenece a la familia de los Retrovirus, género Oncornavirus. Este grupo, incluye a los virus responsables del SIDA felino y Anemia infecciosa equina. Como todos los virus, FeLV, es un parásito obligado; puede crecer y multiplicarse sólo en células vivas. El FeLV y otros Retrovirus usan un método particular para replicarse cuando infectan una célula; realizan una copia de su propia información genética y lo insertan en los cromosomas de las células del gato. Desde entonces, el virus es ahora parte del material genético celular, las cuales empiezan produciendo nuevos virus, mismos que van a infectar otras células. La presencia del virus puede suprimir severamente el sistema inmune y/o conducir a la formación de tumores (Childs, 1992).

FeLV presenta una estructura muy simple, dividida en tres partes (Snyder, 1993):

-NUCLEOCAPSIDE: Situada en el centro de la partícula viral, esta nucleocápside protege el material genético viral, constituido por una cadena simple de RNA y transcriptasa inversa, la enzima que lo hace capaz de replicarse. Ambos forman el núcleo. La nucleocápside está formada por tres proteínas nombradas p10, p15 (c) y p27, unidas entre ellas. Los números 10, 15 y 27, se refieren al peso molecular de estas proteínas expresadas en miles de Daltons. El término (c) que significa proteína nuclear, es usado para distinguir la p15 interna de otra proteína p15 (E), que tiene el mismo peso molecular pero está situada en la envoltura.

La proteína p27 también ha sido llamada antígeno de grupo específico (GS) puesto que existe de manera idéntica en todas las cepas de FeLV. Esta proteína es producida en exceso durante la multiplicación viral, y puede ser encontrada en algunos casos en el medio extraocular, cuando el virus sale de las células. Actualmente el diagnóstico está basado en la detección del antígeno p27, utilizando la prueba de ELISA. En contraste con la mayoría de las pruebas sanguíneas para otras enfermedades virales en las que generalmente se detectan anticuerpos, un gato que es "positivo" a FeLV es por lo tanto un gato en el cual el virus se está multiplicando en forma activa, y se encuentra en la muestra usada para el diagnóstico. La proteína p27 es también responsable de la formación de complejos inmunes, lo cual conduce a glomerulonefritis.

-CUBIERTA INTERNA: Esta rodea a la nucleocápside y está constituida por una proteína simple; p12.

-ENVOLTURA: Además de ser la estructura funcional externa del virus de FeLV, la envoltura juega un papel esencial en los mecanismos de reconocimiento molecular y permite la infección específica a las células blanco de FeLV. Este es el mecanismo principal en la actividad patógena del virus, y es por esto también el instrumento en la estimulación de los mecanismos de defensa del huésped.

La envoltura es derivada de la membrana citoplasmática de la célula infectada. Está constituida principalmente de glicoproteínas (Gp70) apoyadas sobre una proteína de transporte llamada p15 (E). La Gp70 se conoce como antígeno mayor de envoltura o antígeno de tipo; pequeñas variaciones en su estructura hacen distinguir 3 subgrupos de FeLV: A, B y C. Este antígeno permite el reconocimiento específico y la fijación a la célula blanco, (principalmente linfocitos) es por esto que confiere la habilidad para infectar. Es capaz de inducir la aparición de anticuerpos neutralizantes.

Sólo la gp70 del subgrupo A induce a la aparición de anticuerpos protectores. Sólo este subgrupo es infeccioso. Se encuentra en el 100% de los gatos con leucemia y es considerado el precursor de los subgrupos B y C; estos últimos son aislados en el 50% y 1% de los casos respectivamente, siempre en asociación con el subgrupo A. El subgrupo A está relacionado con las formas de inmunosupresión que causan el 80% de las muertes. El subgrupo B nunca se encuentra solo y sigue a la infección provocada por FeLV-A. Este es el único implicado en la formación de tumores, que causan el 20% de las muertes. El subgrupo C jamás se encuentra solo, sigue a la infección provocada por FeLV-A. Es capaz de infectar líneas celulares, en particular de la serie eritroide y causa aplasia eritroblástica y anemia no regenerativa.

La p15 (E), en contraste con Gp70, es nombrada antígeno menor de envoltura. Se cree que p15 tiene propiedades inmunosupresoras y que las retiene aún cuando el virus es inactivado. Según parece, cuando entra en contacto con linfocitos, sus características químicas permiten alterar de manera significativa la permeabilidad de la membrana, conduciéndolos a su disfunción.

El antígeno de la membrana celular asociado a oncornavirus felino (FOCMA) es codificado por virus expresados en la superficie de los linfocitos transformados. La significancia real de FOCMA todavía no ha sido explicada. Parece ser que un constituyente importante en la especificidad de FOCMA se codifica en secuencias endógenas que existen en todos los gatos y que son similares a aquellos del subgrupo C de FeLV.

EPIDEMIOLOGIA

El virus de la leucemia felina es excretado principalmente en la saliva y también puede presentarse en secreciones respiratorias, heces y orina de los gatos. Los hábitos de acicalamiento social de los gatos, así como lamidos, mordidas, estornudos, y la práctica de compartir cajas de desechos y tazas de alimento, probablemente representan los métodos de mayor expansión de FeLV entre gatos domésticos. También puede ocurrir la transmisión de FeLV intrauterina, a través de la placenta y la excreción en calostro y leche. Es por ésto que los gatitos pueden estar infectados ya sea por medio de la madre o por contacto directo con otros gatos persistentemente infectados por FeLV. El contacto cercano prolongado (de días a semanas) con un gato infectado, parece ser requerido para una transmisión efectiva del virus. Este también puede ser diseminado por transfusiones sanguíneas de gatos infectados (Childs, 1992).

Los gatitos menores de ocho semanas de edad, exceptuando aquellos nacidos de madres inmunizadas, son los más sensibles a la infección. De hecho, los gatitos infectados in útero o expuestos al virus antes de cumplir ocho semanas de edad, siempre desarrollan viremia persistente y mueren poco tiempo después. Después de la edad de dos meses, los gatitos adquieren competencia inmunológica y el número de sujetos vírémicos disminuye. En el gato joven, el índice de infección disminuye, pero se eleva otra vez a la edad de 4 años. Los adultos mayores de 7 años son más susceptibles y pueden presentar viremia persistente si son expuestos a FeLV (Snyder, 1993).

Las consecuencias de la infección por FeLV en las poblaciones de gatos dependen en gran parte en como son mantenidos los animales. Existen dos modelos epidemiológicos que deben ser distinguidos, los cuales se muestran en la tabla No. 1.

Gatos callejeros.- El primer patrón incluye los gatos que están en constante contacto con otros gatos por salir a la calle, de propietarios que tienen uno o varios animales. El ciclo de transmisión más probable de FeLV en estos gatos implica la excreción de pequeñas cantidades del virus por períodos cortos de animales con viremia transitoria. De esta manera, hay diseminación extendida del virus por toda la comunidad con la mayoría de los gatos expuestos, determinado por la prevalencia de anticuerpos anti-FOCMA, pero la dosis del virus es pequeña y muchos gatos se recuperan. Un segundo factor que alivia las consecuencias de la infección, es que muchos de los gatos en esta comunidad son mayores de 16 semanas de edad antes de enfrentarse con el virus y por lo tanto son relativamente resistentes. Algunos de estos gatos desarrollan anticuerpos virusneutralizantes (VN), sugiriendo que pueden ser susceptibles a una reinfección subsecuente. De cualquier modo, muy pocos llegan a ser vírémicos persistentes o a desarrollar enfermedades relacionadas con FeLV.

Gatos de criaderos.- En marcado contraste con los gatos callejeros, los gatos de criaderos que son expuestos a FeLV, tienen muy alto riesgo de desarrollar infección persistente y enfermedades relacionadas con FeLV. La asociación estrecha de gatos conduce a una transmisión continua de grandes dosis del virus, y frecuentemente son expuestos los gatos más jóvenes. Aproximadamente 30 a 40% de gatos en casas donde FeLV es enzoótico, son persistentemente vírémicos. Los gatos no vírémicos generalmente tienen anticuerpos VN y son resistentes a la infección. Una gran distribución de las enfermedades relacionadas con FeLV que se han encontrado, ha sido en gatos de criaderos, y consecuentemente a menudo en razas de pedigró. No existe evidencia real de si alguna raza es más o menos susceptible a FeLV que cualquier otra, aunque se

ha comprobado que existe una alta prevalencia de viremia por FeLV en gatos de pelo corto comparado con las razas de pelo largo (Chaudler, Gaskell, Hillbery, 1990).

PATOGENESIS

La patogénesis describe lo que sucede al virus en el cuerpo infectado y sus consecuencias. Es útil hablar primero del curso de la infección, y después de la respuesta inmune.

CURSO DE LA INFECCION: La secuencia de los eventos que ocurren después de la infección por FeLV, ha sido estudiada por Rojko, utilizando una prueba de inmunofluorescencia aplicada a secciones de órganos y a varios intervalos después de la infección (Snyder, 1993).

Primera etapa: Seguido a la instilación oral u oronasal, el virus se replica primero en el tejido linfóide regional de la orofaringe (Pedersen, 1988).

Segunda etapa: El virus puede ser detectado dentro de varios días en algunas células mononucleares circulando en sangre. Esta se puede referir como viremia mononuclear. Los linfocitos y macrófagos infectados acarrean el virus a otros sitios de multiplicación, generalmente el bazo y sistema linfóide.

Tercera etapa: Esta se refiere a una multiplicación viral masiva en el bazo y sistema linfóide. En esta etapa, algunos gatos son capaces de sintetizar anticuerpos para eliminar al virus, antes de que éste sea capaz de afectar la médula ósea y epitelios.

Cuarta etapa: Son selectivamente afectados dos órganos:

- La médula ósea: Las células hematopoyéticas no linfoides son infectadas. La infección de las plaquetas es observada a través de efectos en los megacariocitos; los precursores de la serie mielóide monocítica también son afectados, así como la serie eritroide.

- El intestino: Son producidos focos localizados de infección por efectos en las células mitóticas situadas al fondo de las criptas intestinales.

Quinta etapa: El virus es liberado de la médula ósea; la viremia de origen medular es entonces observada, con la aparición del antígeno viral p27 en las plaquetas, los neutrófilos polimorfonucleares y el suero. La viremia medular comúnmente se desarrolla en viremia persistente. Esto ocurre casi a los 21 días de la infección.

Sexta etapa: Cuando la respuesta inmune del huésped es insuficiente, la infección se disemina al epitelio glandular y de las mucosas (glándula salival y lagrimal, páncreas, sistema respiratorio, vejiga y riñones). Las secreciones (leche, lágrimas, saliva, heces y orina) son contaminadas y el animal se vuelve contagioso. El 83% de los gatos que alcanzan las etapas 5 ó 6, mueren a los 3 años después de la infección viral (Snyder, 1993).

El epitelio glandular provee la fuente más probable de transmisión horizontal. Los datos sugieren que la progresión de la enfermedad es determinada en alguna etapa temprana del curso de la infección, posiblemente en la linfóide, o la etapa medular temprana de la infección. Se ha

postulado que una vez que se ha alcanzado esta etapa, el genoma viral se integra en el DNA celular de la médula ósea y todas las células linfoides originadas de estos precursores estarán infectadas con FeLV. A pesar de la presencia del genoma viral integrado un número de gatos que fueron positivos a la prueba en esta etapa, son capaces de restringir la replicación viral en médula ósea y serán negativos en una segunda prueba. Estos gatos con viremia transitoria son considerados inmunes a FeLV. De cualquier manera, estos gatos "inmunes" a FeLV, refugian el virus latente en su médula ósea por meses o años (Tompkins, Ogilvie, 1988).

RESPUESTA INMUNE: Afortunadamente, la mayoría de los gatos que son expuestos a FeLV se recuperan y no continúan excretando el virus. La resolución de una infección transitoria de FeLV, es debida a mecanismos inmunológicos que se cree que incluyen tanto anticuerpos como células mediadoras de inmunidad (Chaudler, 1990).

Los tipos de anticuerpos que se pueden encontrar en gatos infectados son (Snyder, 1993; Chaudler, 1990):

- Anticuerpos dirigidos contra el antígeno viral de grupo específico, p27, el cual es común en todos los tipos de FeLV. Estos anticuerpos no desempeñan ninguna función protectora contra el virus o cualquier proliferación tumoral que éste pueda ocasionar. Estos incluso ofrecen la inconveniencia de inducir la formación de complejos inmunes que provocan glomerulonefritis en gatos con viremia crónica.

- Anticuerpos dirigidos contra el antígeno mayor de envoltura Gp70: Este antígeno está implicado en los fenómenos de reconocimiento molecular entre el virus y la célula blanco. Los anticuerpos dirigidos contra Gp70, protegen a las células de una infección viral. Sólo el Gp70 del virus A es capaz de inducir la aparición de anticuerpos neutralizantes. Estos son responsables de matar al virus y posiblemente las células infectadas en el gato. Consecuentemente, los gatos con anticuerpos VN casi nunca son virémicos y son resistentes a la reinfección por FeLV.

- Anticuerpos dirigidos contra el antígeno viral inducido FOCMA. Estos son dirigidos contra las membranas neoantigénicas que son viralmente inducidas en las células infectadas. Los anticuerpos para FOCMA, no parecen influenciar en el establecimiento de una infección permanente, ya que se encuentran a menudo en gatos virémicos persistentes, pero si tienen cierto valor pronóstico desde que los gatos con niveles moderados o altos de anticuerpos anti FOCMA, aunque virémicos, son resistentes al desarrollo de linfosarcoma. Mientras estos anticuerpos parecen tener efectos antilinfosarcoma, no aparecen para proteger contra otras manifestaciones causadas por FeLV. Tanto los anticuerpos VN, como los anti FOCMA, son transferidos a los gatitos en el calostro, y los protege de una infección temprana de FeLV.

CONSECUENCIAS DE LA INFECCION. La infección por FeLV puede conducir a tres diferentes situaciones (Snyder, 1993):

- Rechazo del virus: Esto ocurre en el 40% de los casos. La respuesta inmune es rápida, masiva y neutralizante. Esto permite prevenir una viremia y los animales son resistentes a cualquier otra infección. Esto es lo que sucede también en animales vacunados que presentan anticuerpos protectores y previenen la replicación viral.

- Latencia: En el 30% de los casos, el virus persiste inactivo en las células de la médula ósea. Seguido a esta etapa de portador latente, hay 3 posibles tipos de evolución:

- 40% de los portadores latentes progresivamente eliminan el virus si mantienen o adquieren respuesta inmune satisfactoria.
- 50% de los portadores latentes permanecen como tales.
- 10% de los portadores latentes se convierten en virémicos como resultado del estrés, tratamiento con corticosteroides o cualquier reducción de sus defensas. Es por esto que algunas situaciones que conducen a la disminución de la respuesta inmune del huésped, tales como peleas, gestación, lactación o un cambio en su hábitat, pueden ser la explicación de la viremia, aunque el animal tenga una larga historia de ser seronegativo y no tenga contacto con otros gatos infectados.

- La enfermedad: En el 30% de los casos, el virus continúa multiplicándose activamente. La viremia conduce al comienzo de la enfermedad después de un período entre 3 meses a 3 años. Estos animales son de curso contagioso para sus compañeros. Más del 80% de los gatos enfermos muere dentro de 3 años.

SIGNOS CLINICOS

Los gatos persistentemente infectados por FeLV pueden desarrollar una o varias enfermedades que son causadas ya sea directa o indirectamente por el virus.

La inmunosupresión, que es la prevención de la formación de la respuesta inmune, es el resultado más común de la infección por FeLV, y la causa fundamental de muchas condiciones relacionadas. Las enfermedades ocasionadas indirectamente por FeLV son el resultado de la inmunosupresión inducida por esta misma y representan algunas de las manifestaciones más frecuentes de la infección por FeLV.

Entre estas enfermedades secundarias se pueden citar las siguientes (Childs, 1992):

- Enfermedades virales:

- Peritonitis infecciosa felina: 50% de los casos de esta enfermedad aparece correlacionada con la infección por FeLV.
- Rinotraqueítis
- Panleucopenia.

- Enfermedades bacterianas:

- Estomatitis crónica ulcerativa, gingivitis crónica, úlceras en la boca: 50% de los gatos afectados por estas enfermedades están infectados por FeLV.
- Pioderma.

- Neumonía.

- Hemobartonelosis: 40% de los gatos que presentan hemobartonelosis, están infectados por FeLV.

-Enfermedades parasitarias:

- Toxoplasmosis.

Las enfermedades directamente ocasionadas por FeLV incluyen (Siegal, 1991):

- Linfosarcomas (LSA). Los linfosarcomas están entre las enfermedades malignas más comunes de los gatos domésticos en América. Estos tumores consisten primariamente de masas sólidas de linfocitos proliferantes y comprenden la mayoría de las enfermedades malignas causadas por FeLV. Han sido identificadas diversas formas de LSA, su clasificación está basada en su distribución anatómica.

- La forma alimentaria de LSA, está caracterizada por la infiltración de células tumorales en el tracto digestivo y otros órganos, por ejemplo: ganglios linfáticos, hígado riñones y bazo. Los signos más comunes que se presentan incluyen inapetencia, pérdida de peso, vómito, diarrea, melena e ictericia.

- La forma tímica o mediastínica está caracterizada por la presencia de una gran masa tumoral infiltrante dentro del tórax con propagación hacia tejido linfático y algunas veces otras estructuras. Los signos clínicos son dificultad respiratoria, tos, sonidos cardiacos silenciosos y severa acumulación de líquidos en el tórax que frecuentemente acompañan al tumor.

- La forma multicéntrica de LSA está caracterizada por implicación primaria de muchos tejidos linfáticos en el cuerpo, con adicional implicación de otras estructuras tales como el hígado, médula ósea, riñones, bazo y pulmones. Los signos que se presentan son variables, dependiendo de la distribución anatómica precisa del tumor, pero generalmente incluyen aumento de tamaño de ganglios linfáticos periféricos, esplenomegalia, hepatomegalia y a menudo ganglios intestinales.

- También ocurren formas atípicas de LSA y consisten generalmente en masas tumorales solitarias, implicando sitios primarios de origen no intestinal y no linfático. Estos incluyen riñones, SNC, ojos y rara vez la piel y los huesos. Los signos presentes varían dependiendo de la localización del tumor.

- Leucemia linfocítica. Está caracterizada por la presencia de linfocitos cancerosos circulantes en la sangre y la médula ósea. La leucemia linfocítica puede preceder el desarrollo de LSA o puede estar asociada secundariamente con LSA. Los signos que se presentan generalmente consisten en inapetencia no específica, depresión y pérdida de peso. Otros signos específicos que se pueden observar incluyen anemia, fiebre, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia y ganglios linfáticos.

La leucemia es una proliferación maligna, generalizada y neoplásica que se origina en el tejido hematopoyético. La leucemia no es una enfermedad intrínseca de la sangre, ya que simplemente es una corriente que se interpone entre los tejidos formadores de sangre anormales y los tejidos en los cuales se depositan las células proliferantes.

De acuerdo con la cuenta leucocítica y el estadio de madurez celular, las leucemias se clasifican en: (Benjamin, 1984).

- Leucémica: Cuentas leucocíticas elevadas.
- Subleucémica: Cuentas leucocíticas normales pero con cuentas diferenciales anormales que muestran células primitivas.
- Aleucémica: Cuentas leucocíticas totales normales, sin células anormales o inmaduras en el frotis sanguíneo, por lo general se observa en el período de remisión o durante el tratamiento de uno de los otros tipos o se diagnostica por aspiración de la médula ósea.

Leucopenia: Disminución del número de los leucocitos circulantes por debajo del promedio normal. Puede ser equilibrada (disminución de todas las células) o limitarse a un solo tipo de célula. En éste último caso se denomina con el nombre específico correspondiente: neutropenia, linfopenia o eosinopenia (Coles, 1986).

Leucocitosis: Aumento en el número de leucocitos circulantes, por encima del promedio normal (Benjamin, 1984).

- Desórdenes mieloproliferativos. Estos desórdenes primarios de la médula ósea, están caracterizados por una proliferación anormal de una o más líneas celulares hematopoyéticas (formación de células sanguíneas). Los signos clínicos son inapetencia, depresión, pérdida de peso, anemia progresiva, fiebre, ictericia, agrandamiento de ganglios linfáticos periféricos, hepatomegalia, esplenomegalia secundario a la masiva infiltración de células proliferantes anormales.

- Anemia no regenerativa (ANR). Esta es probablemente una de las manifestaciones más comunes de la infección por FeLV. Este tipo de anemia, también conocida como hipoplásica, aplásica o anemia depresiva, está caracterizada por una severa reducción en el número de precursores de glóbulos rojos en la médula ósea, resultando en una falla para producir un adecuado número de glóbulos rojos circulantes. Algunas veces puede presentarse pancitopenia, en donde los precursores de los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas están afectados. Desafortunadamente, los signos clínicos por lo general, no son detectados hasta que la anemia está muy avanzada. Los signos comunes incluyen inapetencia, depresión, pérdida de peso, dificultad respiratoria, palidez de las membranas mucosas e incrementado ritmo cardíaco.

- Síndrome de panleucopenia. Como su nombre lo implica, éste es un síndrome parecido a la panleucopenia (moquillo felino) que ha sido observado en algunos gatos infectados por FeLV, los cuales fueron debidamente inmunizados contra panleucopenia. Los signos que se presentan a menudo son inapetencia, depresión, deshidratación, pérdida de peso, fiebre, vómito, diarrea (que puede ser sanguinolenta) y una profunda reducción en el número de glóbulos blancos circulantes. La anemia también puede estar presente. A pesar de que los gatos afectados pueden responder transitoriamente a una terapia de soporte, la enfermedad es progresiva y siempre fatal.

Los gatitos nacidos de hembras vírémicas persistentes, a menudo desarrollan un síndrome de letargia, inapetencia, debilidad, retraso en el crecimiento y atrofia del timo y otras estructuras linfoides y aumenta la susceptibilidad de infección con otros agentes causantes de enfermedades.

- Glomerulonefritis. Este tipo de enfermedad renal ha sido descrito en gatos en asociación con LSA, leucemia linfocítica y leucemia granulocítica. Además, la enfermedad glomerular ha sido reportada en ausencia de malignidad en gatos infectados por FeLV.

- Desórdenes reproductivos. Las gatas infectadas por FeLV, pueden presentar uno o más desórdenes reproductivos, incluyendo reabsorción fetal, aborto, infertilidad y endometritis.

DIAGNOSTICO

Existen dos tipos de pruebas sanguíneas para el diagnóstico de FeLV, que son de uso común. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, que puede ser realizado en clínicas veterinarias), y el ensayo de inmunofluorescencia (IFA, que debe ser realizado en un laboratorio de diagnóstico). Ambas pruebas detectan la proteína p27 que está circulante en el torrente sanguíneo, tanto libre en sangre (ELISA), o dentro de glóbulos blancos infectados (IFA).

FeLV está presente en la sangre durante dos diferentes etapas de infección. La prueba de ELISA puede detectar la etapa de viremia primaria (transitoria), antes que la médula ósea haya sido infectada, cuando la respuesta inmune del gato tiene la oportunidad de rechazar al virus. Los gatos vírémicos transitorios son ELISA positivos (+) , y después vuelven a un estado negativo dentro de ocho semanas. Es importante que un resultado positivo a FeLV sea repetido en 8 a 12 semanas, para determinar si la viremia es transitoria o persistente. La prueba de ELISA también puede detectar el virus en la viremia persistente, después de que el virus, en un cierto porcentaje de gatos, invade la médula ósea y se establece por siempre. Las pruebas de ELISA también son disponibles para detectar FeLV en saliva y lágrimas (Siegal, 1991).

ELISA es en la actualidad la prueba más usada para la detección de FeLV, ya que es simple de realizar y requiere menos de 100 ml de suero o plasma. Es muy sensible y específica si se realiza adecuadamente. Los resultados falsos negativos son muy raros y niveles extremadamente bajos de antígenos (7.8 ng/ml) producen resultado positivo. Sin embargo, si los pasos de lavado no son realizados cuidadosa y debidamente o si se utiliza suero o sangre completa hemolizados, pueden ocurrir falsos positivos. Este es probablemente el único punto débil del procedimiento, pero puede ser virtualmente eliminado por técnicas de lavado apropiadas y evitar el uso de sangre completa o suero hemolizado (Pedersen, 1988; Nettifee, 1991).

La prueba de IFA detecta el virus circulante principalmente durante la segunda etapa. Si la infección progresa en esta etapa, se alcanza un punto irreversible. Es por esto que la mayoría de los gatos que son IFA positivos, permanecen positivos por siempre. Estos gatos, así como la mayoría (70-100%) de aquellos que son ELISA positivos, están excretando FeLV en la saliva y son infecciosos para otros gatos (Siegal, 1991).

Una infección latente de FeLV no puede ser detectada por ELISA ni por IFA. Para detectar una infección latente, debe realizarse un cultivo in vitro de las células de médula ósea por más de 6 semanas (Pedersen, 1988).

La prevalencia y modo de transmisión de FeLV en la población de gatos domésticos en general no pudo ser estudiada hasta que se desarrolló un método rápido, sensible y preciso de detección del virus y que no requería grandes cantidades de tejido. La manera más directa para estudiar el virus fué desarrollando un ensayo de inmunodifusión.

En 1969 fué producido un suero de conejo anti FeLV específico que contenía altos títulos de anticuerpos; ésto permitió el desarrollo de técnicas inmunológicas para la detección del virus. Usando este suero, la primera prueba desarrollada para la detección de FeLV en tejidos de felinos fué la prueba de doble Inmunodifusión (ID). Poco después fué desarrollada una prueba de fijación de complemento para la detección de FeLV, utilizando el mismo suero de conejo pero resultó difícil de realizar y no era práctica. En general, la técnica de ID es capaz de resolver mezclas complejas de antígeno y tiene excelente especificidad. El suero de conejo anti FeLV fué usado en la prueba de ID y con ésto empezaron estudios iniciales de las características epidemiológicas de FeLV y algunas de las enfermedades inducidas por ésta (Hardy, Zuckerman, 1991).

Entre las diversas modificaciones de la inmunoprecipitación en gel que se han desarrollado, el método más comúnmente empleado es el del doctor Ouchterlony. La técnica de Ouchterlony es una difusión doble de antígeno y anticuerpo solubles en gel de agar. Donde el anticuerpo y el antígeno se encuentran después de la difusión, en el punto de equivalencia, se observa la formación de una línea de precipitación insoluble en la matriz del gel. Además, cada sistema diferente antígeno-anticuerpo forma su propia línea de precipitación independiente de otras reacciones antígeno - anticuerpo. Por ejemplo, una mezcla de tres antígenos puede reaccionar con tres anticuerpos diferentes para formar tres líneas de precipitación diferentes en el gel.

Debido a que en cada sistema antígeno-anticuerpo se forma una línea de precipitación independiente de otros sistemas antígeno-anticuerpo, la inmunodifusión en gel se ha empleado como un poderoso instrumento para el análisis de antígenos; por ejemplo, cada proteína de un virus o una bacteria desintegrados o incluso proteínas solubles en el plasma animal, forman teóricamente una sola línea de precipitación con un anticuerpo homólogo apropiado. Además, la localización de los pozos de antígenos en posiciones próximas permite el análisis de antígenos comunes (Olsen, 1983).

Por último, podemos considerar al examen de médula ósea como un recurso muy valioso para el diagnóstico de las enfermedades caracterizadas por trastornos en sangre periférica. Está indicado sobre todo en las enfermedades que se acompañan de disminución o aumento de las células o aparición de células anormales. Hay que considerar la posibilidad de practicarlo cuando el análisis de sangre periférica revela la presencia de leucopenia, anemia no regenerativa, trombocitopenia, o si aparecen células anormales. Es por ésto que deben de realizarse en conjunto el análisis de médula ósea con la biometría hemática (Coles, 1986). Los valores normales de biometría hemática y médula ósea en felinos domésticos, se detallan en la tabla No. 2. Estos fueron extraídos de libro "Schalm's Veterinary Hematology" (Jain, 1986), ya que consideramos a ésta, una fuente especializada para la interpretación de dichos parámetros.

PREVENCIÓN Y CONTROL

Existe una considerable demanda para el control de las infecciones por FeLV, especialmente de los dueños de los gatos con pedigré. El método de control es la detección y la eliminación de la fuente de infección, el gato vírémico persistente. En la tabla No. 3 se ilustra un típico programa de

control. Las razones para muestrear de nuevo después de las 12 semanas son: a) Para establecer si un gato positivo es todavía positivo y es por ésto que presenta una infección permanente y b) Para asegurarse de que un gato negativo continúa siéndolo y no estuvo incubando una infección en la primera prueba.

Una vez que haya sido eliminado FeLV de una casa, las futuras fuentes posibles de infección para un gato son nuevas introducciones de gatos dentro de la casa y contacto con otros gatos en exposiciones y en la cuadra. Las evidencias presentes sugieren que las exposiciones no son la mayor fuente de infección. Es ampliamente recomendado un remuestreo a intervalos de 6 a 12 meses para gatos reproductores que están en contacto con hembras o machos de otros propietarios. Se ha reportado el uso exitoso de los programas de control.

Diversas vacunas son disponibles comercialmente para ayudar en la prevención de FeLV. A pesar de que estas vacunas han sido probadas para ser efectivas en laboratorio y estudios clínicos, ninguna ofrece 100% de protección. Es por ésto que no hay que confiar en las vacunas como único método de reducir la infección por FeLV. Los programas de muestreo y eliminación, así como otros pasos para reducir la exposición, debe ser continuado (Childs, 1992).

La decisión para vacunar a un gato contra FeLV debe ser basada en diversos factores, como son:

- 1.- La prevalencia de FeLV en el área de práctica, y el nivel de morbilidad y mortalidad observado causado por el virus.
- 2.- El nivel de confianza del MVZ en la eficacia y seguridad de las vacunas disponibles.
- 3.- El riesgo de exposición del gato en cuestión.
- 4.- Práctica zootécnica acerca de las indicaciones biológicas y económicas del uso de las vacunas contra FeLV, en la rutina preventiva de cuidado de salud de los pacientes felinos (August, 1993).

TRATAMIENTO

Los objetivos terapéuticos del médico veterinario que está tratando muchas de las enfermedades asociadas con FeLV son proveer alivio paliativo de los signos clínicos y prolongar la vida. De cualquier manera, la terapia debe ser recomendada sólo si hay la posibilidad de mantener una buena calidad de vida para el paciente. Además, las cuestiones éticas con respecto al tratamiento prolongado de gatos virémicos persistentes que esparcen un virus oncogénico en su medio ambiente debe ser comentado por ambos, el clínico y el dueño del gato.

Ha sido desarrollada una variedad de regímenes quimioterapéuticos para los tumores inducidos por FeLV, y en ciertos casos, ésto puede producir una remisión temporal. Los gatos en remisión pueden continuar en un razonable estado de salud, por un período de semanas a meses (algunos más tiempo). De todos modos, debe ser entendido que estas son sólo remisiones, y en muchos casos, incurables de por vida. Las drogas que se usan, son muy potentes y sus efectos deben ser monitoreados cuidadosamente para no sobredosificar al paciente (Siegal, 1991).

Tabla No.1.- PATRONES EPIDEMIOLOGICOS EN INFECCIONES POR FeLV

GATOS CALLEJEROS

Alto índice de exposición 50% de los gatos tienen anticuerpos anti-FOCMA
 Baja prevalencia de inmunidad 4% de los gatos tienen anticuerpos virusneutralizantes
 Bajo índice vírémico 1% vírémico
 Baja incidencia de enfermedades relacionadas a FeLV

GATOS DE CRIADEROS

Alto índice de exposición 80% de los gatos tienen anticuerpos anti-FOCMA
 Alta prevalencia de inmunidad 70% de los gatos no vírémicos tienen anticuerpos VN
 Alto índice vírémico 40% de los gatos son persistentemente vírémicos
 Alta incidencia de enfermedades relacionadas con FeLV. En gatos vírémicos (Chaudler, 1990).

Abreviaturas:

FeLV: Virus de Leucemia Felina

FOCMA: Antígeno de la membrana celular asociado a oncornavirus felino.

VN: Anticuerpos virusneutralizantes

Tabla No. 2.- VALORES SANGUINEOS Y COMPOSICION CELULAR EN LA MEDULA OSEA DE GATOS NORMALES

SERIE ERITROCITICA	RANGO		PROMEDIO	
Glóbulos rojos (mill/ mm ³)	5.0-10.0		7.5	
Hematocrito (%)	24.0-45.0		37.0	
Volumen globular medio (fl)	39.0-55.0		45.0	
SERIE LEUCOCITICA	RANGO / mm ³	PROMEDIO / mm ³	VALOR PORCENTUAL	PROMEDIO %
Glóbulos blancos	5,500-19,500	12,500		
Linfocitos	1,500-7,000	4,000	22-55	32
Neutrófilos (maduros)	2,500-12,500	7,500	35-75	59
Neutrófilos (bandas)	0-300	100	0-3	0.5
Monocitos	0-850	350	1-4	3
Eosinófilos	0-1,500	650	2-12	5.5
Basófilos	Raros	0	Raros	0
MEDULA OSEA	PROMEDIO %	MEDULA OSEA	PROMEDIO %	
Mieloblastos	1.06	Linfoblastos	15.88	
Mielocitos	6.32	No clasificadas	3.91	
Metamielocitos	11.21	Eritroide	28.07	
Bandas	21.12	Relación M:E	2.3	
Total mioide	57.37			

Valores extraídos de: Schaft's Veterinary Hematology (Jain, 1986).

**Tabla No. 3.- PROGRAMA PARA EL CONTROL DE LAS INFECCIONES POR FeLV
UTILIZANDO LA TECNICA DE ELISA**

- 1.- Muestrear todos los gatos para FeLV.
- 2.- Separar gatos FeLV (+) de FeLV (-) . Cuarentenar la casa, no eliminar ni introducir gatos. Lavar y desinfectar todos los botes de alimento, cajas de excremento, canastos, etc.
- 3.- Muestrear y correr la prueba a los gatos después de 12 semanas.
- 4.- Los gatos FeLV (+) son considerados víremicos persistentes y deben ser eliminados o mantenidos en aislamiento permanente. Los gatos FeLV (-) son considerados libres de la infección por FeLV. Si alguno de los gatos negativos son ahora positivos, volver al paso No. 2
- 5.- Correr pruebas a todos en intervalos de 6 a 12 meses y remuestrear para asegurar a los FeLV (-) antes de juntarlos o mezclarlos con los gatos anteriores.

(Chaudler, 1990)

OBJETIVOS

- 1.- Evaluar el uso de la técnica de Inmunodifusión para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina (FeLV).
- 2.- Comparar las relaciones celulares en la médula ósea de animales normales y serológicamente positivos a FeLV.
- 3.- Relacionar las alteraciones en médula ósea con las alteraciones de la biometría hemática.
- 4.- Correlacionar los parámetros de la biometría hemática, médula ósea, Inmunodifusión y prueba de ELISA.

MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras sanguíneas obtenidas de 25 gatos de diferentes razas, edades y sexo

2.- MATERIAL DE VIDRIO

Tubos de ensaye
Portaobjetos
Cubreobjetos
Cámara de Newbauer
Pipeta de Thoma para glóbulos rojos
Pipeta de Thoma para glóbulos blancos
Matraz de 1 litro
Matraz de 50 ml.
Pipetas de 10 ml.
Pipetas de 1 ml.
Pipetas de .2 ml.
Cajas de Petri
Tubos capilares

3.- REACTIVOS

Solución salina fisiológica (NaCl 0.85%, J.T. Baker)
Agua destilada
Timerozal 1: 1000 (merthiolate blanco)
Líquido Turk
Líquido Hayem
Agar agar (DIFCO)
Agar noble (SIGMA)
Agarosa (SIGMA)
Fosfato de potasio (J. T. Baker)
Hidróxido de sodio (J. T. Baker)
Tiras reactivas de pH (Whatman)
Eter (J. T. Baker)
Tintura de benzal (Dermo)
Iodine (Kation)
Rompón (Bayer)
Imalgen 1000 (Rhône Mérieux)
Tinción rápida (Diff Quick Stain, American Scientific Products)
Prueba comercial de ELISA para detectar antígeno de FeLV (CITE/FeLV kit, IDEXX Corp., U.S.A)

4.- ANTIGENOS Y SUEROS

Vacuna Leukocell 2 (Smithkline)
Vacuna Leucogen (Virbac)
Vacuna VacSYN (Bio trends)
Vacuna Fevaxyn (Solvay)
Suero hiperimmune

5.- VARIOS

Jeringas
Pinzas para matraz
Algodón
Caja rectangular con tapa de plástico
Perforador para agar
Refrigerador
Estufa

METODOLOGIA

SELECCION

Se seleccionaron al azar 25 gatos de diferentes razas, edades y sexo que provenian de distintas ubicaciones en la zona de Satélite, Estado de México.

HISTORIA CLINICA

La historia clínica de cada animal se realizó mediante diferentes métodos propedéuticos, tales como observación, palpación, auscultación y la anamnesis al propietario de cada gato.

TOMA DE MUESTRAS

La toma de las muestras sanguíneas se obtuvo, en la mayoría de los casos, (19 gatos) de la vena yugular, y en los restantes de la vena cefálica como se explica a continuación:

Primero se rasuró perfectamente la zona, se realizó la antisepsia con un algodón humedecido en una solución desinfectante (benzal, iodine) y la toma se hizo con una aguja estéril No. 22 ó 21, utilizando como anticoagulante una gota pequeña de heparina, la cual ya estaba contenida en la jeringa. El volumen mínimo de muestra fué de 2 ml.

Las muestras de médula ósea se obtuvieron de los mismos animales a los cuales se les realizó la biometría hemática. Estos gatos fueron tranquilizados previamente a la toma de la muestra utilizando hidrocloreto de xilacina al 2% (Rompún, Bayer), a una dosis de 1mg/ kg de peso corporal, en combinación con ketamina (Imalgen 1000, Rhône Mérieux) empleada a una dosis de 6-8 mg/ kg de peso corporal; ambas por vía intramuscular.

1.- Obtención de muestras.

Para obtener la muestra, se modificó la técnica descrita por: (Benjamín, M. 1984).

a) Se colocó al gato de lado y se rasuró la piel de la región del extremo proximal del fémur, posteriormente se lavó con una solución desinfectante (benzal, isodine), para realizar la antisepsia.

b) Se introdujo una aguja para aspiración (3/4 a 1 1/2 pulg., calibre 20-21) en el hueso cortical de la fosa trocánterica en el canal femoral, hasta una profundidad aproximada de 1.5 a 2 cm., haciendo presión firme y un movimiento de rotación.

c) Después de haber colocado la aguja en el canal femoral, se aspiró la médula y la sangre sinusoidal hacia la jeringa de 3 ml.

2.- Elaboración del frotis de médula ósea

Se realizaron 6 frotis por cada animal, siguiendo los pasos que se describen a continuación:

Se aplicó una pequeña cantidad de muestra en tres portaobjetos limpios, y con cada uno de los tres portaobjetos sobrantes se hizo presión sobre la muestra colocándolos en la misma posición. Después se desprendió uno del otro de manera que la muestra haya quedado extendida en forma de pequeños grumos.

Todos los frotis fueron fijados con metanol, 2 de cada 6 se tñeron con tinción rápida o " Diff Quick ", y los otros 4 quedaron de reserva.

3.- Cuento diferencial de células

Una vez teñidos los frotis, se utilizó el microscopio para el conteo diferencial de células . Primero se revisó el frotis con el objetivo seco débil (10 x), para encontrar las zonas mejor teñidas en el frotis. Ya localizadas éstas zonas, se cambió al objetivo seco fuerte (40x) para realizar el conteo. Para aclarar cualquier duda con respecto a las características celulares, se usó el objetivo 100x aplicando una gota de aceite de inmersión en el frotis.

Se contaron 100 células por frotis, y la diferenciación se hizo tal como se describe en el atlas de Citología Hematológica (Hayhoe, 1980). Se hizo una comparación entre el conteo diferencial de las muestras obtenidas de gatos sanos y gatos antigénicamente positivos a FeLV.

ELISA

El procedimiento para realizar la técnica de ELISA, para el diagnóstico de FeLV en sangre, está descrito en el instructivo de la prueba comercial (CITE/ FeLV kit., Idexx Corp., U.S.A.) tal y como se indica a continuación:

Previo a la realización de cada prueba, se deben dejar los reactivos a temperatura ambiente.

- Lavado.- Asegurarse de que el prefiltro esté bien colocado en el dispositivo. Agregar 10 a 20 gotas de solución de lavado y esperar a que se absorban. Presionar con la esponja para asegurar el contacto de el prefiltro con la membrana bioactiva.

- Combinación de la solución 1 y la muestra.- En el tubo agregar 4 gotas de la solución 1 (conjugado contra FeLV) y 4 gotas de la muestra (suero, plasma o sangre completa). Se recomienda utilizar suero o plasma. Invertir el tubo 5 a 6 veces. Esperar de 5 a 10 minutos.

- Vaciado al dispositivo.- En el caso de haber usado sangre completa, agregar al tubo de 5 a 6 gotas de solución de lavado e invertirlo de 5 a 6 veces para posteriormente vaciarlo al dispositivo. Esperar de 5 a 10 minutos.

- Lavado.- Remover el prefiltro. Agregar de 10 a 15 gotas de solución de lavado y esperar a que se absorban. Llenar el dispositivo hasta la línea con solución de lavado. Esperar su absorción.

- Agregar el sustrato.- Agregar 4 gotas de la solución 2 (sustrato) procurando cubrir los 3 compartimentos. Esperar 1 minuto.

- Lectura de la reacción.- Para determinar el resultado de la prueba, se lee la reacción en los compartimentos del dispositivo:

FeLV positivo: Se colorea de azul el control positivo y el compartimento de FeLV.

FeLV negativo: Se colorea de azul sólo el control positivo.

La reacción es estable por aproximadamente 10 minutos (IDEX Laboratories).

BIOMETRIA HEMATICA

Una vez concluido cada diagnóstico mediante ELISA, se realizó la biometría hemática a 16 de las muestras, de acuerdo a la técnica descrita en: (Manual de Laboratorio Clínico FES-Cuautitlán, 1993).

Para la evaluación de glóbulos rojos y glóbulos blancos, se utilizaron líquidos de Hayem y Turk respectivamente, así como pipetas de Thoma para cada tipo de células y el conteo se realizó mediante la observación en el microscopio y la cámara de Neubauer.

Se utilizaron tubos capilares para la evaluación de los microhematocritos. Estos se llenaron de muestra sanguínea casi el 90% de su capacidad, se sellaron en uno de los extremos y al final se centrifugaron durante 3 min. a 11,000 rpm. El resultado se obtuvo mediante la correlación entre el paquete celular y el volumen total de muestra.

Para el conteo diferencial de células, se fijaron con metanol dos frotis por muestra y uno de ellos se tiñó mediante la técnica de tinción rápida o "Diff Quick". El otro frotis se conservó como reserva. El conteo se evaluó mediante la observación en el microscopio.

Posteriormente, se procedió a centrifugar todas las muestras sanguíneas para conservar el plasma, los cuales se utilizaron para la elaboración de la técnica de Inmunodifusión.

INMUNODIFUSION

I.- Obtención del suero hiperinmune

Se obtuvo suero hiperinmune de una gata persa de un año de edad, la cual fué vacunada contra FeLV a intervalos de 6 meses, 1 mes y después cada 15 días, utilizando la vacuna VacSYN de laboratorios Bio-Trends. La extracción de muestra sanguínea se realizó a los 15 días después de cada revacunación. Este suero fué utilizado como testigo positivo para la técnica de inmunodifusión.

II.- Preparación del material

Se utilizaron 80 portaobjetos, mismos que se trataron lavándolos primero con detergente especial (Extrán, Merck), se dejaron secar en una gradilla, y después a cada uno y por ambos lados, se limpiaron con un algodón humedecido en éter para desengrasarlos completamente.

Todas las pipetas, matraces y cajas de Petri, se lavaron con detergente y se dejaron secar totalmente antes de ser utilizadas con cualquier tipo de solución o reactivo.

III.- Elaboración de agares y variables de pH

1.- Preparación de agar noble y agar agar al 1% en SSF.

En cada uno de dos matraces de 50 ml. se preparó una mezcla que contenía lo siguiente:

- 22.5 ml. de Solución salina fisiológica (SSF)
- 2.5 ml. de merthiolate blanco (Timerozal, concentración final: 1: 10 000)
- 0.5 g. de agar noble en un matraz y 0.5 g. de agar agar en el otro.

Se calentaron ambas mezclas hasta su disolución completa.

Los portaobjetos, se tuvieron completamente secos y desengrasados para cada tipo de agar al 2%. Se aplicó una película de este mismo lo más delgada posible. Al final se midió el volumen de agar sobrante, para agregar la misma cantidad de SSF y diluir a una concentración al 1%.

Con esta última preparación se aplicó una segunda capa más gruesa a los portaobjetos y se dejaron solidificar en una superficie horizontal.

2.- Preparación de agar agar al 1% en 3 diferentes pH (6, 7 y 8)

Se preparó un litro de KH_2PO_4 al 0.1M y 200 ml. de NaOH 1M.

Posteriormente se elaboraron 22.5 ml. de cada pH de la siguiente manera:

pH 6:	11.25 ml. KH_2PO_4 0.1 M
	11.06 ml. H_2O dest.
	0.18 ml. NaOH M

pH 7: 11.25 ml. KH_2PO_4 0.1 M
10.6 ml. H_2O dest.
0.65 ml. NaOH M

pH 8: 11.25 ml. KH_2PO_4 0.1 M
10.21 ml. H_2O dest
1.03 ml. NaOH M (Gordon, 1975).

Con las tiras reactivas de pH, se verificaron las soluciones y después se agregaron 2.5 ml. de merthiolate blanco y 0.25 g. de agar agar a cada matraz. Se utilizaron 10 portaobjetos por cada tipo de pH, mismos a los que previamente se les aplicó la primera película de agar agar al 2% en SSF.

3.- Elaboración de agarosa al 1% en portaobjetos y cajas de Petri.

Se prepararon soluciones de agarosa al 1% en portaobjetos con pH de 6, 7 y 8. En 6 cajas de Petri, se añadieron 3.5 ml. de la suspensión también a diversos pH.

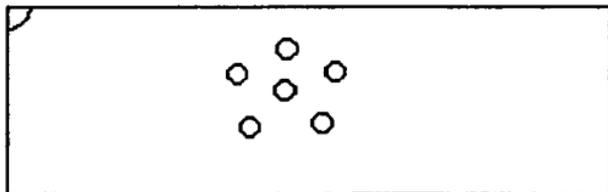
4.- Técnica de inmunodifusión con tubo capilar en cajas de Petri.

Esta técnica es una variante de la anterior, todo el procedimiento en las cajas de Petri fué igual, a excepción de colocar en lugar del orificio central, un tubo capilar, el cual se llenó previamente con la solución de antígeno.

Distribución de las perforaciones.

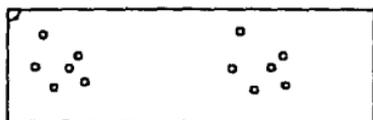
En la primera preparación de agarosa al 2% en SSF, se hicieron 5 perforaciones con un sacabocado alrededor de una central, dejando entre ellas una distancia de 4mm. El espesor y diámetro de cada orificio fué de 3 mm., tal y como lo muestra el esquema No. 1

Esquema No. 1.- Distribución de perforaciones en agar agar y agar noble al 2% en Solución salina fisiológica (SSF)

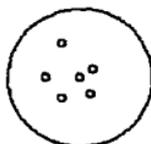


Los orificios en la preparación de agar agar al 1% en diferentes pH y agarosa al 1% en cajas de Petri, se hicieron más pequeños (2 mm. diam.) y a diferentes distancias con respecto al central (2, 4, 6, 8 y 10 mm). En cada extremo de los portaobjetos se perforaron 6 orificios (Ver esquemas Nos. 2 y 3).

Esquema No. 2.-Distribución de perforaciones en agar agar y agarosa al 1% en diferentes pH.



Esquema No. 3.- Distribución de perforaciones en agarosa al 1% en cajas de Petri.

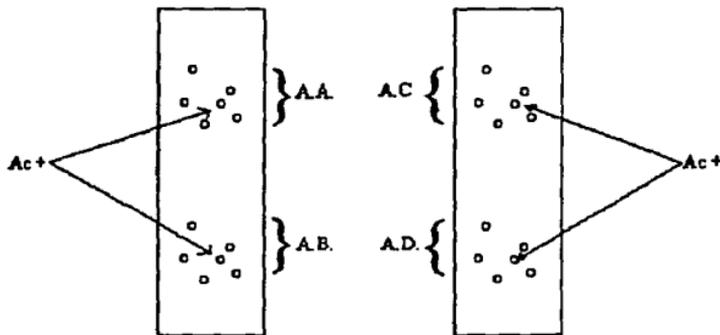


Se identificó con una marca cada portaobjeto para no confundir tipos de agar, pH, antígeno y anticuerpo.

Aplicación y distribución de antígenos y sueros.

1.- Para la evaluación de los factores (tipos de agar, pH y distancia) en la técnica de Inmudifusión, se colocó en el pozo central el suero hiperinmune y en los extremos los 4 diferentes tipos de vacunas, tal como lo muestra el esquema No. 4.

Esquema No. 4.- Evaluación de diversos factores utilizando suero hiperinmune.

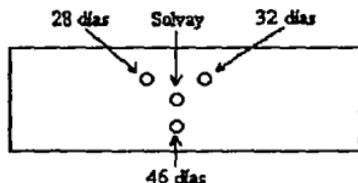


Ac +: Suero hiperinmune.
 A.A: Antígeno "A" (Leukocell)
 A.B: Antígeno "B" (Leocogen)
 A.C: Antígeno "C" (VacSYN)
 A.D: Antígeno "D" (Fevaxyn)

2.- Evaluación del suero hiperinmune. En el pozo central se aplicó la vacuna con la que se obtuvieron mejores resultados en el paso anterior. También se estandarizó la distancia óptima

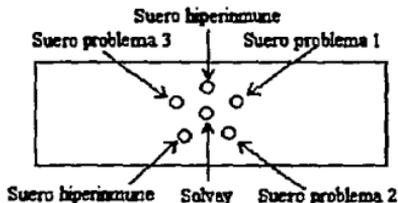
(4 mm.) entre el pozo central y los pozos periféricos; en los cuales se aplicó el suero hiperimmune del gato usado como testigo positivo. Este suero fué tomado a diferentes tiempos posteriores a la vacunación intensiva, utilizando la vacuna VacSYN, de laboratorios Bio-Trends, con el fin de determinar con cual de éstos se obtendría mejor resultado. La primera inmunización se realizó el día 9 sept 1993 . Se hizo una segunda inmunización el 23 sept 93. Posteriormente se obtuvo la primera muestra sanguínea el 7 oct 93, es decir, a los 28 días después de la primera inmunización. La segunda y tercera toma de muestras, se realizaron a los 32 y 46 días respectivamente post-inmunización. El 29 de octubre se inmunizó por tercera ocasión, y la última toma de muestra se realizó a los 14 días posteriores a ésta fecha (Esq. No. 5).

Esquema No. 5.- Evaluación del suero hiperimmune.



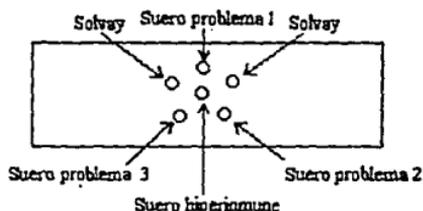
3.- Evaluación de antígenos y/o anticuerpos en las muestras. Se colocó en el pozo central la vacuna de Solway, y en la periferia, los sueros de los gatos problema, alternando en dos pozos el suero hiperimmune con el cual se obtuvo mayor título de anticuerpos (Esq. No. 6).

Esquema No. 6.- Evaluación de anticuerpos y/o antígenos en los sueros problema.



4.- Segunda evaluación de antígenos y/o anticuerpos en los sueros problema. Dependiendo de los resultados en el paso anterior, se evaluaron los sueros que reaccionaron ya sea con presencia de antígeno y/o anticuerpos ante el suero hiperimmune y/o la vacuna Fevaxyn (Solway), incluso ante otro suero problema; ahora enfrentándolos contra sueros distintos y en este caso, el suero hiperimmune, se colocó en el pozo central y en dos pozos alternos la vacuna Fevaxyn. Estas evaluaciones se realizaron en forma repetida usando los diferentes pH (Esq. No. 7).

Esquema No. 7.- Segunda evaluación de antígenos y/o anticuerpos en los sueros problema.



Incubación de las placas

En un recipiente rectangular con tapa, se prepararon unos soportes para colocar las placas en forma horizontal. Las cajas de Petri se cerraron con sus respectivas tapas. Se humedecieron pedazos de algodón con agua para evitar la resequead del agar y se tapó la caja. Se incubaron durante 48 horas a temperatura de refrigeración.

Lectura de las placas.

Habiendo transcurrido la incubación, se sacaron las placas y la lectura se realizó sosteniendo éstas sobre una superficie negra, y se utilizó luz indirecta.

CALCULOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ENTRE ID Y ELISA

Se elaboró una tabla binaria 2×2 para las pruebas de detección de FeLV, y posteriormente se obtuvieron cálculos de sensibilidad y especificidad de la prueba de ID, con respecto a ELISA, por medio de los siguientes métodos:

		Prueba ELISA		Total
		Positivo	Negativo	
Prueba ID	Positivo	a	b	a + b
	Negativo	c	d	c + d
Total		a + c	b + d	

Total de resultados = a + b + c + d

- a) Positivo verdadero= Proporción de gatos ELISA positivos, en donde el resultado de ID será positivo.
- b) Falso positivo= Proporción de gatos ELISA negativos, en donde el resultado de ID será positivo.
- c) Falso negativo= Proporción de gatos ELISA positivos, en donde el resultado de ID es negativo.
- d) Negativo verdadero= Proporción de gatos ELISA negativos, en donde el resultado de ID será negativo.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Resultados positivos verdaderos } a}{\text{Total de gatos infectados con FeLV } a + c} \times 100 = \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Resultados negativos verdaderos } d}{\text{Total de gatos no infectados con FeLV } b + d} \times 100 = \%$$

$$\text{Indice de falsos negativos (I.F.N.)} = \frac{\text{Resultado de FeLV falso negativo } c}{\text{Total de gatos infectados con FeLV } a + c} = \%$$

$$\text{Indice de falsos positivos (I.F.P.)} = \frac{\text{Resultado de FeLV falso positivo } b}{\text{Total de gatos no infectados con FeLV } b + d} = \%$$

$$\text{Valor predictivo positivo (V.P.P.)} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo (V.P.N.)} = \frac{d}{c + d} \times 100$$

Datos extraídos de JAVMA, vol. 199, No. 10, Nov. 15, (Hardy, 1991).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se obtuvo una relación entre los parámetros obtenidos en la B.H., M.O., ELISA e ID de las dieciséis muestras trabajadas utilizando la prueba estadística de análisis de regresión lineal, mediante el programa de cómputo STRATGRAF. En las pruebas de hipótesis se utilizó la distribución T de student (Steel, 1985; Wayne, 1988).

RESULTADOS

Historia clínica

En los resultados obtenidos durante la exploración de los 25 gatos muestreados para determinar los diferentes signos clínicos, se pudo observar que sólo dos gatos se encontraban completamente sanos, ya que no presentaron ningún tipo de signología que nos hiciera pensar en alguna clase de enfermedad. En los gatos restantes, los cuales representan el 92% de los animales muestreados, se observó una variada signología clínica, entre los que destacaron signos como depresión (73%), anorexia (53%), pérdida de peso y caquexia (47%), entre otros. Los signos clínicos más importantes que mostraron los 25 gatos se enlistan en la tabla No. 4

Debido a la indisponibilidad de algunos propietarios de los gatos para permitirnos extraer muestras sanguíneas y de médula ósea, así como la toma escasa de muestra de otros gatos a causa de su difícil manejo, se realizaron biometrías hemáticas y conteo diferencial de células de médula ósea sólo en 16 de los 25 gatos (Tablas Nos. 5 y 6).

Biometría hemática

A grandes rasgos podemos observar, una disminución en la cantidad de glóbulos rojos con respecto a los valores normales (Tabla No. 2) en los gatos Nos. 7, 12, 14, 19, 20 y 23, así como un ligero aumento de los mismos en el gato No. 10. También encontramos una disminución en el hematocrito de los gatos Nos. 14, 19 y 20, así como la variación en el tamaño de los eritrocitos, expresado por el volumen globular medio (V.G.M.) en los gatos Nos. 7, 20 y 23.

En lo que respecta a la fórmula blanca, se registraron 4 gatos con valores de glóbulos blancos por debajo de lo que reporta la bibliografía, así como un aumento de los mismos en 2 gatos. Los valores absolutos estuvieron disminuidos para las células linfocíticas en 5 casos, así como el aumento en los mismos en otros 2. Los neutrófilos estuvieron ausentes en su totalidad en los gatos Nos. 7 y 14. La presencia de células inmaduras en sangre periférica para la serie granulocítica se hizo aparente en 3 casos, uno de ellos (gato No. 20) con 8% de células precursoras de eritrocitos también (rubricitos).

Médula ósea

En los resultados del examen de médula ósea (Tabla No. 6), se calcularon los promedios obtenidos para los diferentes tipos celulares, así como de las relaciones M:E en gatos positivos y negativos mediante ELISA, para obtener una comparación global. Los casos particulares de mayor interés y su relación con la biometría hemática, se describen en la discusión de este trabajo.

Los valores totales de células granulocíticas del examen de médula ósea en gatos positivos, así como en los negativos, oscilaron dentro de los límites normales, descritos en la tabla No. 2, aunque hubo una reducción notoria de estas mismas (más de 15 células) en los gatos positivos con respecto a los negativos. Los valores de células linfoides se encontraron muy aumentados en relación a los que se reportan en la bibliografía (Jain, 1986), tanto en gatos positivos como en los negativos, siendo mayor el aumento en los positivos. La cuenta eritroide en los gatos negativos se encontró muy por debajo en relación a lo que reporta la bibliografía. Sin embargo, el valor relativo de células eritroides en gatos positivos es casi el doble que el de los gatos negativos, y cae dentro de lo que se considera como normal.

Resultados de las variables en la técnica de Inmunodifusión

a) Tipos de agares: Durante la elaboración de las placas para la inmunodifusión, se utilizaron 3 tipos de agares: Agar noble, agar agar y agarosa; todos preparados a una concentración final de 1%. El tipo de agar en el que se obtuvieron bandas de precipitación más intensas y delimitadas, fué el agarosa 1%, por lo cual, fué el agar que utilizamos durante las posteriores pruebas de ID.

b) Preparación en SSF y diversos pH: Se obtuvieron bandas de precipitación sólo en las preparaciones de agarosa a diversos pH (6, 7 y 8). En las preparaciones de agarosa en SSF no se obtuvo ningún resultado. Algunas líneas de identidad parcial en las bandas de precipitación se hicieron más aparentes en pH 6, y otras en pH 8, por lo que las preparaciones posteriores en agarosa, siempre se elaboraron en los 3 tipos de pH.

c) Diferentes distancias: La distancia que estandarizamos para la aparición de bandas de precipitación entre antígenos y anticuerpos fué de 4 mm. entre cada pozo, y ésta fué la que se utilizó para probarlos.

d) Tipos de placas: La aparición de bandas de precipitación sólo fué observable en portaobjetos, no así en las cajas de Petri, además de la impráctica elaboración de estas últimas, para que quedara fija una parte del extremo del capilar introducido dentro del agar, y posteriormente descendiera el antígeno a través de éste. Es por ésto que se continuó la técnica de ID en portaobjetos.

Resultados de la técnica de Inmunodifusión

a) Tipos de antígenos: De las 4 vacunas contra FeLV que se probaron junto con el suero hiperinmune en la técnica de Inmunodifusión, sólo la reacción de la vacuna Fevaxyn de laboratorios Solvay fué observable mediante la aparición de una banda de precipitación, por lo tanto se utilizó dicha vacuna para la evaluación de los sueros problema e hiperinmune.

b) Evaluación del suero hiperinmune: El suero hiperinmune extraído del gato testigo a los 32 días posteriores al inicio de la vacunación intensiva contra FeLV, resultó ser con el que se obtuvieron bandas de precipitación más intensas que reaccionaron contra el antígeno (Fevaxyn, Solvay), por lo que esta extracción fué la que se usó posteriormente.

c) Sueros problema: Los resultados obtenidos en los 25 gatos para evaluar la presencia de antígenos y/o anticuerpos contra FeLV mediante la técnica de Inmunodifusión y la presencia de antígeno p27 mediante ELISA se representan en la tabla No. 7. En ésta se puede apreciar que de 25 muestras, 13 fueron positivas a antígeno mediante ELISA. Al analizar los resultados obtenidos mediante la técnica de ID encontramos que el 47.6% fueron positivos a la presencia de antígenos en suero. Las primeras 4 muestras solo se pudieron analizar por ELISA, por lo que se obtuvieron resultados para ID de los 21 gatos restantes. Dentro de este porcentaje de gatos, la mitad fueron positivos tanto a antígenos como a anticuerpos contra FeLV. El total de gatos que presentaron antígenos, anticuerpos, o ambos, suman 14, lo que representa un 66.6% de animales que de alguna manera están o estuvieron en contacto con FeLV (Tabla No. 8).

Comparación estadística

Posteriormente, se compararon los resultados de ELISA contra los de ID en cuanto a presencia de antígenos (Tabla No. 9), en donde se observa que hay el mismo porcentaje de

muestras (23.8%) positivas a ambas pruebas, sólo positivas a ELISA y sólo positivas a ID , y un porcentaje un poco mayor (28.6%) en las muestras que fueron negativas a ambas.

Análisis estadístico

Por medio de pruebas de hipótesis (Tabla No. 10) se determinó que tanto en la comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA contra glóbulos rojos y la relación M:E, se rechazó la hipótesis nula, lo que significa, que se considera como promedio para gatos negativos por dicha prueba, 7.5 millones de glóbulos rojos/mm³, y 5.2 como valor para la relación M:E, en otras palabras, estos resultados sí fueron significativos, lo que no sucedió con ninguna de las otras comparaciones.

Tabla No. 4.- SIGNOLOGIA CLINICA PRINCIPAL EN LOS 25 ANIMALES MUESTREADOS

No. de gato	S I G N O L O G I A
1	Depresión, anorexia, mucosas pálidas.
2	Depresión, caquexia, mucosas pálidas.
3	Depresión, anorexia, gingivitis.
4	Diarrea, vómitos, anorexia.
5	Depresión, pérdida de peso.
6	Anorexia.
7	Depresión, caquexia, mucosas pálidas, pioderma, gingivitis.
8	Depresión, anorexia, mucosas pálidas, pérdida de peso.
9	Depresión, anorexia, pérdida de peso, mucosas pálidas.
10	Depresión, caquexia, diarrea, vómitos.
11	Depresión, diarrea, vómitos.
12	Depresión, pérdida de peso, mucosas pálidas, pioderma.
13	Absceso en miembro posterior izquierdo.
14	Depresión, anorexia.
15	Convulsiones esporádicas, rigidez de miembros.
16	Depresión, anorexia, gingivitis.
17	Anorexia, gingivitis, conjuntivitis.
18	Depresión, pérdida de peso.
19	Depresión, anorexia, pérdida de peso, mucosas pálidas.
20	Anorexia, pérdida de peso, mucosas pálidas, pioderma.
21	Depresión, anorexia.
22	Depresión, anorexia, ictericia.
23	Depresión, caquexia, mucosas pálidas, anisocoria.
24	No presentó signología clínica de enfermedad.
25	No presentó signología clínica de enfermedad.

Los datos se obtuvieron mediante la exploración de los animales, así como la anamnesis realizada al dueño de cada gato.

TABLA N° 5.- RESULTADOS DE LA BIOMETRIA HEMATICA EN LOS GATOS TRABAJADOS

IDENTIF.	GR ml/mm ³	HTO %	VGM μ	GB ml/mm ³	L ml/mm ³	M ml/mm ³	N ml/mm ³	E ml/mm ³	B ml/mm ³	J ml/mm ³	Bda ml/mm ³	S ml/mm ³
7	2.0	19.3	96.50	1.7	1.7	0	0	0	0	0	0	0
10	10.3	44.8	43.50	10.1	2.7	0	7.3	0	0	0	0	7.3
12	4.7	23.0	53.19	10.8	1.9	0	8.7	.108	0	0	0	8.7
13	6.2	26.9	43.39	11.2	6.0	.112	4.8	.224	0	0	.112	4.7
14	3.0	17.1	57.16	2.8	2.8	0	0	0	0	0	0	0
15	7.6	32.7	43.03	5.8	0.4	0	5.3	0	0	0	0	5.3
16	6.2	29.6	47.74	10.7	4.0	0	6.6	0	0	0	.214	6.4
17	5.9	27.6	46.78	6.1	3.5	0	2.2	.244	0	0	0	2.2
18	7.6	34.3	45.13	5.7	1.0	.228	4.2	.114	0	0	.285	3.9
19	3.2	14.0	43.75	22.9	13.9	.229	8.7	0	0	0	.687	8.0
20	1.1	10.0	90.91	4.9	1.4	0	3.2	.245	0	.588	.049	2.5
21	8.7	47.0	54.02	10.3	1.3	0	8.6	.309	0	.103	.309	8.2
22	3.1	29.0	56.86	11.4	2.2	0	9.1	0	0	0	0	9.1
23	3.6	23.1	64.17	22.3	9.3	0	12.9	0	0	.446	0	12.4
24	7.6	31.0	40.79	5.4	1.1	.054	3.9	.216	0	0	.108	3.8
25	6.9	33.0	47.83	7.2	2.1	.072	4.8	.144	0	0	.288	4.5

L %	M %	N %	E %	B %	J %	Bda %	S %
100	0	0	0	0	0	0	0
27	0	73	0	0	0	0	73
18	0	81	1	0	0	0	81
54	1	43	2	0	0	1	42
100	0	0	0	0	0	0	0
7	0	93	0	0	0	0	93
38	0	62	0	0	0	2	60
59	0	37	4	0	0	0	37
19	4	75	2	0	0	5	70
61	1	38	0	0	0	3	35
29	0	66	5	0	0	1	53
13	0	84	3	0	12	3	80
20	0	80	0	0	1	0	80
42	0	58	0	0	0	0	56
21	1	74	4	0	2	2	72
30	1	67	2	0	0	4	63

Abreviaturas:

G.R: Glóbulos rojos

Hto: Hematocrito

VGM: Volumen globular medio

G.B: Glóbulos blancos

L: Linfocitos

M: Monocitos

N: Neutrófilos

E: Eosinófilos

B: Basófilos

J: Juveniles

Bda: Bandas

S: Segmentados

Se utilizaron las técnicas descritas en: (Manual de laboratorio clínico, FES-Cuautitlán, 1993)

Tabla No. 6.- RESULTADOS DE LA CITOLOGIA EN MEDULA OSEA PARA LOS GATOS ESTUDIADOS

IDENTIF.	RESULT. ELISA	Mb %	Mc %	MMc %	Bda %	Lb %	Lc %	No clasif. %	TOT.miel %	Eritr. %	REL.M:E
7	+	1	17	14	1	31	23	0	33	13	2.5
10	-	4	18	19	13	15	20	0	54	11	4.9
12	+	10	18	3	14	13	12	2	45	28	1.6
13	-	4	22	10	31	6	13	3	67	11	6.0
14	+	5	20	4	21	4	30	5	50	11	4.5
15	-	2	24	22	5	12	25	0	53	10	5.3
16	+	7	23	3	12	5	27	0	45	23	1.9
17	+	2	11	6	12	12	30	3	31	24	1.2
18	-	8	29	11	23	3	12	4	71	10	7.1
19	+	2	8	9	12	7	35	5	31	22	1.4
20	+	10	14	7	7	8	37	0	38	17	2.2
21	-	9	4	5	48	7	14	4	66	10	6.6
22	-	4	15	7	26	7	23	6	52	12	4.3
23	+	8	44	10	7	5	10	1	69	15	4.6
24	-	12	25	5	16	19	5	4	58	14	4.1
25	-	4	16	8	19	24	15	2	47	12	3.9
Prom. +		5.6	19.3	7	10.7	10.6	25.5	2	42.7	19	2.4
Prom. -		5.8	19.1	10.8	22.6	11.6	15.8	2.8	58.5	11.2	5.2

Abreviaturas:

Mb: Mieloblasto	Lb: Linfoblasto
Mc: Mielocito	Lc: Linfocito
Mmc: Metamielocito	Erit: Eritroide
Bda: Banda	Rel M:E: Relación Mielocido: Eritroide

Prom +: Promedio del tipo celular encontrado en gatos ELISA positivos.

Prom -: Promedio del tipo celular encontrado en gatos ELISA negativos.

Se contaron 100 células por frotis, y la diferenciación morfológica se realizó conforme se describe en: (Benjamin, 1984, Hayhoe, 1980)

Tabla No. 7.- RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LAS TECNICAS DE ELISA E INMUNODIFUSION EN LOS 25 GATOS

No. de gato	ELISA (Ag)	ID (Ac)	ID (Ag)
1	+	NP	NP
2	+	NP	NP
3	+	NP	NP
4	-	NP	NP
5	-	-	+ BIP
6	-	-	-
7	+	+ BIP, Db (pH8)	-
8	+	-	+
9	+	+	-
10	-	-	+ BIP
11	-	+	-
12	+	-	-
13	-	-	+ BIP
14	+	+ Db (pH8)	+
15	-	-	+ BIP
16	+	+	+
17	+	+ Db (pH7)	-
18	-	-	-
19	+	+	+
20	+	+	+
21	-	-	-
22	-	-	-
23	+	-	-
24	-	+	+
25	-	-	-

Abreviaturas:

ELISA: Ensayo de Inmunosorción Ligado a Enzimas

ID: Inmunodifusión

Ag: Prueba positiva para antígeno (la reacción se dió contra el suero hiperinmune)

Ac: Prueba positiva para anticuerpo (la reacción se dió contra la vacuna Fevaxyn, Solvay)

NP: No probado

BIP: Banda de identidad parcial

Db: Doble banda al pH indicado

Para la obtención de los resultados en la técnica de ELISA se siguió el procedimiento descrito en el instructivo de la prueba (CITE/ FeLV kit, IDEXX Corp., U.S.A.)

Los resultados de la técnica de ID, se obtuvieron en agarosa 1%, con una distancia de 4 mm. entre cada pozo, a los pH 6, 7 y 8.

Tabla No. 8.- FRECUENCIA DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LEUCEMIA FELINA MEDIANTE INMUNODIFUSION

Resultado	No. de Muestras	%
Ag	5	23.8
Ac	4	19.0
Ag/Ac	5	23.8
Negativo	7	33.4
Total	21	100

Ag: Resultado positivo para antígeno

Ac: Resultado positivo para anticuerpo

Tabla No. 9.- NUMERO DE MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS A ANTIGENO MEDIANTE ELISA E ID.

	ELISA (No. de muestras)	
	+(%)	- (%)
ID +	5 (23.8)	5 (23.8)
ID -	5 (23.8)	6 (28.6)

Valores encontrados para Inmunodifusión con respecto a ELISA:

Sensibilidad = 50%

Especificidad = 54.5%

Indice de falsos negativos = 50%

Indice de falsos positivos = 45.4%

Valor predictivo positivo = 50%

Valor predictivo negativo = 54.5%

Tabla No. 10.- PRUEBAS DE HIPOTESIS PARA LAS TECNICAS DE ELISA E INMUNODIFUSION EN RELACION CON BIOMETRIA HEMATICA Y MEDULA OSEA

a.-ELISA/ GLOBULOS ROJOS (mil/mm³)

PRUEBAS ESTADISTICAS:	NUMERO DE MUESTRAS	ELISA POSITIVOS	ELISA NEGATIVOS	TOTALES
		8	8	16
PROMEDIO		3.7	7.5	5.6
VARIANZA		3.2	2.4	2.8
DESV. STANDARD		1.8	1.6	1.7
MEDIANA		3.4	7.6	6.0

HO: $\mu = 7.5$

Hi: $\mu = 7.5$

$\alpha = 0.01$

Se rechaza HO.

b.- ELISA/ GLOBULOS BLANCOS (mil/mm³)

PRUEBAS ESTADISTICAS:	NUMERO DE MUESTRAS	ELISA POSITIVOS	ELISA NEGATIVOS	TOTALES
		8	8	16
PROMEDIO		10.3	8.4	9.3
VARIANZA		68.6	6.8	37.7
DESV. STANDARD		8.3	2.6	6.14
MEDIANA		8.4	8.6	8.6

HO: $\mu = 8.3$

Hi: $\mu = 8.3$

$\alpha = 0.05$

No se rechaza HO.

c.- INMUNODIFUSION/ GLOBULOS ROJOS (mil/mm³)

PRUEBAS ESTADISTICAS:	NUMERO DE MUESTRAS	LD. POSITIVOS	LD. NEGATIVOS	TOTALES
		8	8	16
PROMEDIO		5.6	5.5	5.6
VARIANZA		9.1	4.8	6.9
DESV. STANDARD		3.0	2.2	2.6
MEDIANA		6.2	5.5	6.0

HO: $\mu = 5.5$

Hi: $\mu = 5.5$

$\alpha = 0.05$

No se rechaza HO.

HO: Hipótesis nula

Hi: Hipótesis alterna

α : Nivel de significancia

continúa...

Tabla No. 10.- PRUEBAS DE HIPOTESIS PARA LAS TECNICAS DE ELISA E INMUNODIFUSION EN RELACION CON BIOMETRIA HEMATICA Y MEDULA OSEA (CONTINUACION)

d.- INMUNODIFUSION/ GLOBULOS BLANCOS (mil/mm³)

PRUEBAS ESTADISTICAS:	NUMERO DE MUESTRAS	LD. POSITIVOS 8	LD. NEGATIVOS 8	TOTALES 16
PROMEDIO		9.2	9.4	9.3
VARIANZA		40.0	37.4	38.7
DESV. STANDARD		6.3	6.1	6.2
MEDIANA		7.9	8.7	8.6

HO: $\mu = 9.4$

No se rechaza HO.

Hi: $\mu = 9.4$

$\alpha = 0.05$

e.- ELISA/ MEDULA OSEA (RELACION M:E)

PRUEBAS ESTADISTICAS:	NUMERO DE MUESTRAS	ELISA POSITIVOS 8	ELISA NEGATIVOS 8	TOTALES 16
PROMEDIO		2.5	5.2	3.9
VARIANZA		1.8	1.4	1.6
DESV. STANDARD		1.3	1.2	1.3
MEDIANA		2.0	5.1	4.2

HO: $\mu = 5.2$

Se rechaza HO.

Hi: $\mu = 5.2$

$\alpha = 0.01$

f.- INMUNODIFUSION/ MEDULA OSEA (RELACION M:E)

PRUEBAS ESTADISTICAS:	NUMERO DE MUESTRAS	LD. POSITIVOS 8	LD. NEGATIVOS 8	TOTALES 16
PROMEDIO		3.8	3.9	3.9
VARIANZA		2.9	4.6	3.8
DESV. STANDARD		1.7	2.1	1.9
MEDIANA		4.3	4.1	4.2

HO: $\mu = 3.9$

No se rechaza HO.

Hi: $\mu = 3.9$

$\alpha = 0.05$

(Steel, 1985; Wayne, 1988)

DISCUSION

Después de haber realizado examen clínico a los 25 gatos, se pudo observar que destacaron los siguientes signos: depresión, anorexia, pérdida de peso y caquexia principalmente. Estos signos fueron observados tanto en gatos positivos a FeLV mediante la prueba comercial de ELISA, como en los que resultaron ser negativos a la misma. Cabe mencionar que estos signos son poco específicos, ya que independientemente de que sean animales positivos o negativos a FeLV, suelen indicar el inicio de alguna enfermedad, o son consecuencia de algún padecimiento crónico (Morales, 1993).

Sin embargo, encontramos 4 gatos con signología clínica y uno de los dos gatos sanos, que fueron negativos a ELISA, pero positivos a algún tipo de antígeno detectado por la prueba de inmunodifusión. Este fenómeno se discutirá con detalle más adelante.

El 24% del total de los gatos muestreados, correspondieron a la raza siamés, mientras que el resto fueron Europeos domésticos. El 33% de los gatos siamés dieron resultado positivo a la prueba de FeLV-ELISA, así como el 58% de los gatos Europeos domésticos. Dos de los 25 gatos eran menores de un año de edad, 3 mayores de 5 años y el resto, que representa el 80% del total, corresponde a una edad que oscila entre uno y cinco años. Los dos gatos menores de un año fueron positivos a la prueba de ELISA, así como el 55% de los gatos que oscilan entre 1 y 5 años. Los 3 gatos mayores de 5 años resultaron negativos a la prueba de ELISA.

La biometría hemática puede considerarse como una técnica de diagnóstico indirecto, que es de gran utilidad cuando se sospecha de cualquier tipo de padecimiento, al detectar signos sugestivos de enfermedad.

Con respecto a la presencia de anemias manifestadas en los gatos positivos mediante la técnica de ELISA, podemos observar que el 75% de estos gatos representan este padecimiento, y que el 50% de estas anemias son de tipo normocítica y el otro 50% son anemias macrocíticas. Las causas posibles que pueden ocasionar una anemia de tipo normocítica incluyen: hemorragias agudas, hemólisis o ausencia de formación de sangre. Esta última, representa una de las alteraciones producidas por la infección de FeLV.

La anemia se diagnostica con más frecuencia en gatos que en otros animales domésticos. Existen diversas causas, la más importante se debe a la infección por FeLV. Como se ha descrito, la anemia asociada a FeLV, puede ser consecuencia de leucemia linfóide o mieloide con sus efectos secundarios en hematopoyesis o, más común, puede ser un efecto principal del virus. Los principales tipos de anemia asociada a FeLV que se conocen son hipoplasia eritroide y anemia hemolítica. La anemia diagnosticada con mayor frecuencia es la hipoplásica, en la cual sólo son afectadas las células de la serie eritroide. La anemia hemolítica asociada a FeLV, puede ser común, pero a menudo se diagnostica sólo cuando la condición es severa. Esta anemia es macrocítica con evidencia de reticulocitosis y hematopoyesis extramedular (Chaudler, 1990).

En el caso de las anemias de tipo macrocítica, las causas pueden deberse a aumento de la actividad de la médula ósea en ciertos estados que se asocian por lo general con anemia normocítica como la hemorragia aguda y hemólisis, o algunas deficiencias de factores hematopoyéticos.

Los cuerpos de Howell Jolly son residuos de material nuclear que permanecen dentro de la célula después de que el núcleo ha sido expulsado, e indican aumento de la producción de eritrocitos, ya sea después de la destrucción o pérdida de sangre o en las anemias regenerativas. Los eritrocitos felinos y equinos por lo general tienen cuerpos de Howell Jolly hasta del 1% del total (Benjamín, 1984, Coles, 1986). Los gatos No. 7, 20 y 23, manifestaron anemia de tipo macrocítica y con presencia de abundantes cuerpos de Howell Jolly en sus eritrocitos. Otras anomalías eritrocíticas se manifestaron en un 81% de los gatos a los que se les realizó biometría hemática. Dentro de este porcentaje, se excluyeron a los gatos sanos.

Los astrocitos son eritrocitos con " espinas " o puntas agudas que se presentan cuando hay daño en la membrana del mismo, ya sea por enfermedad autoinmune o severa, deficiencia de piruvato y abetalipoproteinemia. La astrocitosis estuvo presente en un 46% de los gatos con anomalías.

Los eritrocitos esféricos de menor diámetro en relación al volumen, y que tienen un aspecto microscópico de microcitos hiperromáticos se denominan esferocitos. Estos esferocitos presentes en un 53% de las muestras, se manifiestan en anemias hemolíticas inmunomediadas que también se han relacionado a FeLV.

La anisocitosis, que abarcó el 30% dentro de las anomalías eritrocíticas, es una variación en el tamaño de las células, la cual se observa comúnmente en la mayor parte de las anemias. Los eritrocitos grandes representan células recientemente liberadas de la médula ósea y aumento en su producción.

La formación de pilas, también conocida como fenómeno de " Rouleux " es un arreglo de los eritrocitos en un rollo o columna con las superficies planas de frente. Esta formación de pilas se considera como parámetro normal, cuando se encuentra en forma moderada en el gato, la cual se manifestó en un 38%.

Se presentó un caso de puntado basófilo, el cual se observa en anemias de casi todos los tipos e indica eritropoyesis defectuosa (Benjamín, 1984).

En un caso de anemia macrocítica se encontró un 8% de eritrocitos nucleados, los cuales sólo aparecen en casos patológicos graves en la sangre circulante. Su presencia indica demanda excesiva sobre los órganos hematopoyéticos para la producción de eritrocitos (Coles, 1986).

Se registró un caso de ligera policitemia, que se consideró muy poco significativo debido a que sólo rebasó por 3 décimas el valor máximo considerado dentro del rango normal del número de eritrocitos (Jain, 1986).

Los recuentos total y diferencial de leucocitos, se deben realizar siempre que la historia o el examen físico revelen anomalías que pueden alterar la fórmula leucocitaria. El conocimiento preciso de dichas anomalías es valioso para confirmar un diagnóstico, emitir un pronóstico y seleccionar el tratamiento adecuado. Estos exámenes son útiles en animales que presentan enfermedad general, local o localizada a algún sistema específico. El análisis de leucocitos no proporciona el diagnóstico absoluto o, en todo caso, es muy raro que lo haga. Las únicas excepciones son las enfermedades leucémicas, procesos piógenos localizados o enfermedades virales durante su etapa de incubación.

En el gato, es difícil establecer el valor del número total de leucocitos en condiciones normales, debido a que este animal es muy excitable, y la excitación intensa altera el número total de leucocitos. La leucocitosis fisiológica se presenta con mayor frecuencia en gatos menores de un año de edad. (Coles, 1986).

Las anomalías leucocitarias estuvieron presentes en 7 de los 8 gatos positivos a FeLV mediante ELISA y en 4 de los 8 gatos negativos. Estas cifras llevadas a porcentaje, representan el 69% del total de los gatos a los que se les realizó la biometría hemática.

Las leucopenias se presentaron en tres casos positivos, los cuales manifestaron signología clínica de enfermedad severa terminal. Dos de estas leucopenias se caracterizaron por presentar linfocitosis relativa y neutropenia absoluta; esta última se explica por una reducción en la granulopoyesis en la médula ósea que puede ser ocasionada por cualquier tipo de infección crónica (Benjamin, 1984).

La otra leucopenia, se manifestó con presencia de abundantes células inmaduras. Esta anomalía, característica en ciertos casos debido a la infección por FeLV, se conoce como reticuloendoteliosis, la cual generalmente va acompañada de anemia grave, persistente, no regenerativa (Coles, 1986). Se registraron en total dos casos de reticuloendoteliosis, mismos que serán detallados más adelante.

Las leucocitosis con linfocitosis absoluta se hicieron aparentes en dos casos positivos. Seguramente, estos gatos en etapa terminal de la enfermedad manifestaron neoplasias linfoides, las cuales pueden ser sólidas (linfosarcoma) o más difusas con implicación de sangre (leucemia linfocítica) (Pedersen, 1988).

El 41% de las anomalías leucocitarias se manifestó como linfopenias, presentes en 4 gatos negativos y uno positivo. Dos de los 4 gatos negativos mediante ELISA , resultaron ser positivos a algún tipo de antígeno detectado por la prueba de inmunodifusión, así como el gato positivo. Esta condición nos explica de alguna manera que la linfopenia es producida tanto en FeLV, como en otras enfermedades de tipo viral, que se relacionan antigénicamente con FeLV. En el estrés, hay disminución absoluta de linfocitos, moderada o intensa, que se debe a la acción de los glucocorticoides, lo que pudo haber provocado la linfopenia en los 2 gatos negativos tanto para ELISA, como para inmunodifusión (Coles, 1986).

El examen de médula ósea es un recurso muy valioso para el diagnóstico de las enfermedades caracterizadas por trastornos en sangre periférica. Está indicado sobre todo en las enfermedades que se acompañan de disminución o aumento de las células o aparición de células anormales. Hay que considerar la posibilidad de practicarlo cuando el análisis de sangre periférica revela la presencia de leucopenia, anemia no regenerativa, trombocitopenia, o si aparecen células anormales.

La interpretación correcta del examen de médula ósea, sólo puede hacerse con la ayuda de los datos obtenidos en el análisis de sangre periférica. Si no se tiene la información de ambos exámenes se cometen serios errores de interpretación.

El análisis de los resultados del examen de médula ósea, se basa en la evaluación de lo

siguiente: 1) cantidad y tipo de células, 2) presencia de todas las series celulares, 3) presencia de anomalías morfológicas, 4) orden de sucesión de desarrollo de cada tipo de célula, 5) relación aproximada mielóide:eritroide (M:E) y 6) presencia o ausencia de células anormales (Coles, 1986).

La hipoplasia medular es una reducción en la cantidad de células de la médula ósea, que puede abarcarlas a todas o ser específica de un sólo tipo. La leucemia viral felina y panleucopenia viral, son enfermedades que producen hipoplasia medular. La médula hipoplásica puede representar todos los tipos de células y distribución normal de las diferentes etapas del desarrollo celular, así como de la relación M:E. Para confirmar la reducción de células, hay que examinar los fragmentos de la médula ósea (Coles, 1986).

Cuando existe demanda periférica de linfocitos, como ocurre en las leucemias, prevalece la hiperplasia linfóide. Más del 15% de linfocitos de la médula ósea del gato se consideran por lo general suficientes para un diagnóstico tentativo de leucemia linfocítica (Benjamin, 1984).

Los valores tomados en la bibliografía, de cualquier línea celular en la médula ósea, son basados en muestreos de cierta cantidad de gatos, que habitan en los Estados Unidos principalmente. Posiblemente, las condiciones climáticas u otros factores ambientales que prevalecieron durante la toma de muestras de los gatos evaluados en el presente trabajo, son determinantes para obtener resultados un poco diferentes a los que reporta la bibliografía. Incluso, se han encontrado variaciones marcadas entre diversos autores.

En las anemias regenerativas, aumentan los eritrocitos inmaduros en la médula ósea, lo que disminuye la relación M:E, si el número total de neutrófilos está dentro de los límites normales.

En el gato con anemia hemolítica o hemorragia grave, predominan los normoblastos basófilos y aumentan en forma notable los normoblastos policromatófilos. La falta de respuesta de la médula ósea es de pronóstico desfavorable, a menos que exámenes subsecuentes señalen que la capacidad para producir eritrocitos se ha recuperado (Coles, 1986).

La notoria disminución en el porcentaje de células eritroides en los gatos negativos, trae como consecuencia un aumento de la relación M:E, la cual sobrepasa los valores normales reportados en la bibliografía.

La relación M:E promedio de los gatos positivos (2.4), cae dentro del valor normal, lo cual se encuentra no solamente en una médula normal, sino también en ciertos estados patológicos (Modway, 1980).

Se obtuvieron resultados similares en 2 casos positivos (gatos 7 y 14), los cuales presentaron una disminución de células eritroides y aumento de linfocitos en médula ósea. Las células mieloides también estuvieron por debajo de lo que se considera normal. La biometría hemática reporta anemia, una de tipo macrocítica (gato 7) y otra normocítica. Ambos presentaron leucopenia, linfocitosis relativa y neutropenia absoluta. Las causas generales de neutropenia se relacionan con alteraciones de la médula ósea, y han dado en llamarse las 3 " D ":

- 1.- Degeneración (granulopoyesis deficiente)
- 2.- Depresión (reducción de la granulopoyesis)
- 3.- Depleción (reducción de la supervivencia en sangre)

Cuando la médula ósea se ve afectada por cualquiera de estas alteraciones, disminuye el número de neutrófilos en sangre periférica.

En general, los cambios degenerativos se producen como consecuencia de padecimientos que reducen la eficacia de la médula ósea y producen neutrófilos maduros (granulopoyesis deficiente) (Coles, 1986).

La elevación en el número de linfocitos maduros en médula ósea es un hallazgo posible resultante de la reducción de las principales células de la médula ósea (Jain, 1984).

Debido a la disminución del número de células eritroides en las médulas de éstos gatos, se consideran anemias de tipo no regenerativas.

El gato 12, que resultó positivo a la prueba de ELISA, presentó anemia de tipo normocítica, linfopenia y neutrofilia relativas y aumento en la cantidad de formas inmaduras de linfocitos (linfoblastos) en médula ósea, lo cual puede ser suficiente para un diagnóstico tentativo de leucemia linfocítica (Benjamin, 1984).

El gato No. 15, había estado tratándose algunos días antes de realizar la biometría hemática con corticosteroides y radiaciones. Estas condiciones pueden ser predisponentes para reducir el número de linfocitos circulantes en sangre periférica, y por tal razón se puede explicar la linfopenia absoluta que se encontró en este caso.

En la médula ósea, se registró un aumento en el porcentaje de linfocitos y disminución de células eritroides. Es posible que debido a la demanda de linfocitos en sangre periférica, se haya encontrado este tipo de respuesta en la médula ósea, aunque no se descarta la posibilidad de que en este momento se esté originando alguna enfermedad maligna del tejido linfoide. Este gato fue negativo a FeLV mediante ELISA, pero positivo a antígeno mediante inmunodifusión.

La disminución del número de las células eritroides, así como el consecuente aumento en la relación M:E, son relativas debido al aumento en el porcentaje de la serie linfoide.

La disminución en el porcentaje de células mieloides y aumento de linfocitos en la médula ósea del gato No. 17, positivo a FeLV mediante ELISA, explican la linfocitosis relativa y neutropenia absoluta que se registraron en la biometría hemática.

Otro caso de inmunosupresión por fármacos (corticosteroides), aunado al estrés provocado por el manejo para la extracción de la muestra sanguínea, se hizo manifiesto en el gato No. 18. Este gato presentó linfopenia absoluta, registró la más alta relación M:E debido a la gran cantidad de células mieloides así como la consecuente disminución de células eritroides en la médula ósea. En el proceso inflamatorio crónico, aumenta la granulopoyesis y la hiperplasia de neutrófilos es más intensa. Este caso fue negativo a ELISA y a antígeno mediante inmunodifusión, pero la marcada pérdida de peso y depresión que había manifestado varias semanas antes, nos hace pensar en cualquier otro padecimiento de tipo infeccioso crónico.

El gato No. 19, positivo a ELISA e inmunodifusión, manifestó anemia normocítica, leucocitosis con linfocitosis absoluta, además de una moderada cantidad de mieloblastos y

linfoblastos en sangre periférica. En la médula ósea, se observó un notable aumento en la cantidad de linfocitos con su consecuente disminución de la serie mieloide. El aumento típico de linfocitos sólo se observa en etapas terminales de linfosarcoma y en pacientes cuya malignidad se origina en la propia médula ósea. En esos casos, el aumento de linfocitos en sangre periférica es muy manifiesto, la anemia generalmente es intensa y hay trombocitopenia (Coles, 1986).

Las enfermedades del complejo de la Leucemia Viral Felina se pueden dividir en dos categorías:

- a) Enfermedades neoplásicas.- Que abarca a las enfermedades linfoproliferativas y a las mieloproliferativas.
- b) Enfermedades no neoplásicas.- Que incluyen a las enfermedades degenerativas, inmunomediadas y las que provocan inmunosupresión.

La principal presentación de enfermedad linfoproliferativa es el linfoma, en la cual, el 25% presentan linfocitos atípicos circulantes por el desprendimiento de las masas tumorales. La otra enfermedad linfoproliferativa es la leucemia linfoide, que se manifiesta con anorexia, fiebre, anemia y pérdida de peso. En la médula ósea del gato con leucemia linfocítica, que se manifiesta por aumento de linfocitos anormales en la circulación periférica, más del 15% de las células son linfocitos (Jain, 1986; Coles, 1986). Este cuadro fué evidentemente manifestado en el gato No. 19.

Las enfermedades mieloproliferativas son un conjunto de padecimientos que causan proliferación y diferenciación incompleta de las células mesenquimatosas embrionarias de médula ósea, bazo, ganglios linfáticos e hígado (Coles, 1986).

La enfermedad mieloproliferativa puede envolver una o la combinación de 2 o más líneas celulares diferentes que comprenden la citología de la médula ósea (Jain, 1986).

En el gato, estas enfermedades incluyen: Reticuloendoteliosis, leucemia granulocítica, leucemia megacariocítica, policitemia vera, mielosis eritrémica, eritroleucemia y mielofibrosis.

Dos casos de reticuloendoteliosis se hicieron aparentes en los gatos Nos. 20 y 23.

La reticuloendoteliosis está caracterizada por líneas celulares primitivas e indiferenciadas en la sangre y médula ósea. La forma de estas células varía de un individuo a otro y en cierto grado aún en diferentes muestras de un mismo individuo. Las características morfológicas y de tinción son poco definidas y sugieren que se trata de formas jóvenes de eritrocitos, granulocitos o células plasmáticas. No hay signos de que la maduración de estas células progrese (Pedersen, 1988, Coles, 1986).

Además de la reticuloendoteliosis, el gato 20 manifestó signos de mielosis eritrémica, enfermedad mieloproliferativa en la cual, casi no hay granulocitos en la médula ósea, predominan grupos de células indiferenciadas semejantes a prorrubrocitos y rubrocitos basófilos. Esta forma de enfermedad proliferativa, debe ser sospechada en presencia de anemia severa, la morfología de la sangre periférica está marcada por anisocitosis y eritrocitos nucleados exhibiendo anisocromía entre el núcleo y citoplasma (Jain, 1986, Coles, 1986).

Los valores normales promedio con los cuales se realizaron las comparaciones tanto de la biometría hemática, como citología de médula ósea, fueron extraídos del libro " Veterinary Hematology " (Jain, 1986).

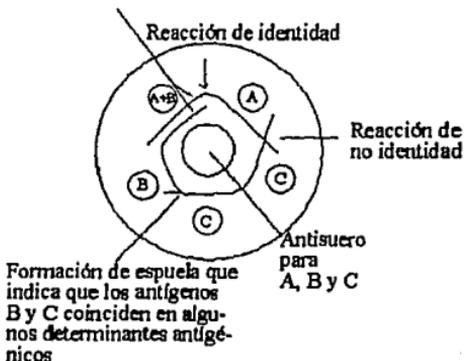
La técnica de precipitación en agar, consistió en cortar orificios de 2 mm. de diámetro, separados entre sí por 4 mm., en una capa de agarosa al 1% en portaobjetos. Luego se llenó uno de los orificios con antígeno soluble (Fevaxyn, Solvay) y el otro con anticuerpo; los reactivos difundieron en forma radial. Se estableció un gradiente de concentración circular para cada reactivo y esos gradientes terminaron por sobreponerse. Así, las proporciones óptimas de la aparición de precipitación se produjeron en una zona de los gradientes superpuestos, y en esa región apareció una línea opaca de precipitado. Esta técnica se llama de doble difusión o de Ouchterlony, por el nombre de su inventor.

Si las soluciones contienen varios antígenos y/o anticuerpos diferentes, es poco probable que cada componente adquiera las proporciones óptimas exactamente en la misma posición. En consecuencia se producirá una línea separada de precipitado para cada grupo interactuante de antígeno y anticuerpo. Este resultado es extraordinariamente útil, ya que permite que pueda hacerse un análisis de los antígenos. Si dos orificios de antígenos y uno de anticuerpo se disponen según se muestra en la figura No. 8, entonces se formarán líneas entre cada orificio de antígeno y el orificio de anticuerpo. Si las dos líneas confluyen, se considera que ambos antígenos son idénticos (reacción de identidad). Si las líneas se cruzan, los dos antígenos son diferentes (reacción de no identidad); en tanto que si las líneas se fusionan y forman un " espolón ", entonces existe una identidad parcial, lo que indica que un antígeno tiene epítopos que no existen en el otro.

La técnica de doble difusión puede utilizarse para identificar tanto la presencia de antígenos como la de anticuerpos solubles en líquidos corporales (Tizard, 1989).

Fig. No. 8.- Reacción de doble difusión del tipo de Ouchterlony mostrando reacciones de identidad, no identidad y formación de espuelas.

Dos líneas indicando que el pocillo contiene dos antígenos distintos.



En el presente trabajo se evaluaron diversas variables para la elaboración de la técnica de Inmudifusión doble , con el fin de estandarizar las condiciones óptimas para la lectura de los resultados. De esta manera encontramos que el empleo de agarosa preparada a una concentración del 1% en los tres tipos de pH (6, 7 y 8), fué la apropiada debido a que la consistencia del agar nos permitió en primera instancia perforar con facilidad los orificios en los que se depositaron las vacunas solubles y sueros problema, así como la correcta difusión de los mismos a través del agar.

La preparación de agarosa en los 3 diferentes pH, nos permitió hacer una diferenciación en cuanto a la intensidad, y en algunos casos la aparición o no de bandas de precipitación entre los reactantes, lo que significa que algunos tipos de antígenos contenidos en los sueros, reaccionan mejor a un pH ácido y otros reaccionan mejor a un pH alcalino.

La difusión de los reactantes en el agar recorrió una distancia aproximada de 2 mm., a partir del perímetro del orificio, por lo que se estandarizó la distancia óptima entre cada orificio de 4 mm., para que de este modo se formara una línea de precipitación justo a la mitad.

Para la realización de placas de soporte para la inmudifusión en agar, preferimos usar portaobjetos, ya que en las cajas de Petri, se utilizó mayor cantidad tanto de agarosa, como de antígeno, además de resultar imprácticas.

La única vacuna contra FeLV, con la que se obtuvieron bandas de precipitación visibles en el agar de inmudifusión, fué la vacuna "Fevaxyn", de laboratorios Solvay. Tenemos varias hipótesis acerca de este resultado, con respecto a las demás vacunas contra FeLV, que no precipitaron ante ningún anticuerpo contenido en algún suero:

- 1.- Que se encuentre cierta partícula antigénica del virus en mayores cantidades en la vacuna Fevaxyn, y por tal, es la única que da reacción visible.
- 2.- Las demás vacunas no son lo suficientemente antigénicas como para crear una reacción visible ante los anticuerpos séricos.
- 3.- Posiblemente, las otras vacunas contengan adyuvantes o están contenidos en solventes que de alguna manera no permiten la difusión correcta a través del agar.
- 4.- Que la reacción obtenida entre los sueros y Fevaxyn se deba a un complejo antígeno-anticuerpo de tipo no viral, que se puede presentar en ciertas vacunas procesadas en cultivos celulares, mismos que son reconocidos por anticuerpos séricos de felinos.
- 5.- Que no contengan la partícula viral completa, sino fracciones de ésta o algún antígeno purificado, incapaces de ser reconocidos por anticuerpos distintos.

En lo que respecta a la evaluación del suero hiperinmune, observamos que la primera muestra, extraída 28 días después de la inmunización, se hemolizó debido a que la centrifugación de ésta se realizó a los dos días después de haberla obtenido. Independientemente de esto, se obtuvo banda de precipitación contra el antígeno contenido en la vacuna Fevaxyn.

Cuatro días después, se tomó una segunda muestra, con la cual se obtuvo una banda fuerte

de precipitación más intensa que la que se observó con el suero hemolizado. Esta segunda muestra fué la que se utilizó para la evaluación de antígenos en la técnica de inmunodifusión. Conforme pasó más tiempo (a los 46 días), los niveles de anticuerpos séricos iban declinando, y la banda de precipitación de esta tercera muestra, se hizo menos intensa que la anterior. Por esta razón, se realizó una segunda inmunización, y 15 días después de ésta, se obtuvo una cuarta muestra, con niveles de anticuerpos muy altos, y que también se utilizó en las últimas evaluaciones de antígenos, debido que la segunda muestra extraída no fué suficiente para probar todos los sueros.

En los resultados de la prueba de ELISA, se puede observar que más del 50% de los gatos son portadores del antígeno p27 de FeLV en su sangre gatos. Este porcentaje es bastante elevado y sobre todo, comparado con los casos de leucemia registrados en otros países.

Se han realizado estudios anteriores, en donde los porcentajes de gatos positivos a FeLV mediante la técnica de ELISA, son similares a los que se obtuvieron en el presente trabajo (López, 1993; Morales, 1993).

Es posible que esta alta incidencia de la enfermedad se deba a que muchos propietarios no realizan un calendario de vacunación completo a sus gatos, aunado a que probablemente, las vacunas disponibles en el mercado mexicano, no estén protegiendo debidamente contra la infección provocada por FeLV, ya que en éstas no se observó reacción visible ante ningún suero mediante la técnica de ID.

Podemos observar, que el porcentaje de gatos positivos a antígeno por ID (47.6%), es muy parecido al que se obtuvo mediante la técnica de ELISA (52%). Como se ha mencionado, para obtener un resultado positivo por medio de ELISA, se requiere de un nivel extremadamente bajo de antígeno p27 (7.8 ng/ml), por lo que se ha considerado a esta prueba altamente sensible, no así en ID, que requiere mayores cantidades de antígeno para obtener resultados positivos. (Nettifee, 1991). Por esta razón, registramos un 23.8% de muestras que resultaron ser positivas a FeLV por medio de ELISA, pero negativas en ID. Este mismo porcentaje, se obtuvo en gatos positivos a antígeno tanto en ELISA, como en ID. Esto significa, que este grupo de gatos, tuvieron que contener grandes cantidades de antígeno p27 en sus sangres para haber sido reconocidas por ambas pruebas.

Tanto en el grupo de gatos positivos a antígeno mediante ELISA e ID, como los gatos que fueron positivos a antígeno mediante ELISA, pero negativos por ID, se registró el mismo porcentaje en cuanto a manifestación de anemias (75%), así como enfermedades mieloproliferativas (25%) por esta razón, no podemos afirmar, que sólo se pueden encontrar grandes cantidades de antígeno circulante en etapas graves de la enfermedad.

El 28.6% del total de gatos evaluados en ID, correspondió a las muestras que no contenían antígeno detectable, ni por ésta técnica ni por ELISA. Sólo en un gato perteneciente a este grupo, se detectaron líneas de identidad total con el suero hiperinmune, lo que significa, que posee el mismo tipo de anticuerpos contenidos en este último, y que ambos reconocen al antígeno de la vacuna Fevaxyn. Este gato no había sido inmunizado contra leucemia, por lo que pudo haber estado en un periodo de latencia, es decir, que no es virémico, pero tiene una infección persistente no productiva en su médula ósea (Pacitti, 1987).

Dos gatos pertenecientes a este grupo también, fueron tratados con corticosteroides y antibióticos previo a la obtención de muestra sanguínea. Este hecho justifica las dos linfopenias absolutas que manifestaron ambos, y por ser negativos a las dos pruebas, se descarta la presencia de antígenos circulantes de FeLV.

En el resto de los gatos negativos tanto a ELISA, como a ID, se obtuvieron biometría hemática y médula ósea normales.

El cuarto grupo de gatos, negativos mediante la técnica de ELISA, pero positivos a antígenos por ID, representó el 23.8% del total de gatos evaluados por esta última prueba.

Está comprobado que la prueba de ID se caracteriza por su gran especificidad, es decir, que tiene alta probabilidad de resultar negativa si el virus no está presente en el gato, pero tiene sensibilidad regular, ésta es la probabilidad de resultar positiva si el virus está presente en el gato. Con la prueba de ELISA sucede lo contrario; es altamente sensible, pero con especificidad regular.

Un resultado ELISA (+), ID (+), indica gran cantidad de antígeno circulante en sangre.

El resultado ELISA (-), ID (-), indica que no hay por el momento antígeno circulante en sangre.

El resultado ELISA (+), ID (-), indica que hay poca cantidad de antígeno en sangre, es decir, se trata de un resultado falso negativo para ID; aunque cabe la posibilidad de ser un resultado falso positivo para ELISA

Para el resultado ELISA (-), ID (+), tenemos varias posibilidades, siendo de mayor a menor importancia las siguientes:

a) Que ID esté detectando antígenos de tipo no virales, que reaccionan contra el suero hiperinmuneizado (que los anticuerpos del suero hiperinmune, además de ser contra FeLV, sean contra restos celulares del cultivo donde se obtuvo la vacuna).

b) Que no sea p27 el antígeno que detecta. Como ya se mencionó, podemos encontrar varias proteínas estructurales que componen a FeLV, además de p27.

c) Que nos estemos enfrentando hacia un virus endógeno de la familia de los Retrovirus, con el que se produzca cruce antigénico, como es el caso del Virus de Sarcoma Felino (FeSV) ó el virus RD 114.

d) Que exista en México un subgrupo viral diferente a A, B ó C.

Estas 4 posibilidades, pueden ser asignadas a cada caso en particular, dependiendo de la historia clínica, signología y datos de biometría hemática y médula ósea de los gatos en los que se obtuvieron resultados ELISA negativos, ID positivos.

El gato No. 10, se presentó a consulta con depresión severa, caquexia, vómito y diarrea. La biometría hemática reportó ligera policitemia y aumento de linfocitos en la médula ósea.

Esta policitemia, aunque poco significativa, ya que no rebasó por mucho el valor máximo normal reportado en la bibliografía, es relativa, debido a la deshidratación provocada por el vómito y las diarreas. Esta produce hemoconcentración como resultado de una disminución en el volumen del plasma, sin un cambio considerable en la masa total de eritrocitos (Benjamin, 1984).

Como ya se ha descrito, el aumento de linfocitos en la médula ósea sólo se observa en etapas terminales del linfosarcoma y en pacientes cuya malignidad se origina en la propia médula ósea (Coles, 1986).

Para este caso, podríamos deducir que en ID se detectaron antígenos diferentes a p27 (Gp70, p15E, FOCMA, etc.,) no reconocidos por la prueba de ELISA, o bien, nos enfrentamos hacia un subgrupo viral diferente.

Otro caso también interesante, el gato No. 13, presentó como signología la formación de un absceso pequeño en el miembro posterior izquierdo. Tanto la biometría hemática, como la citología en médula ósea resultaron normales.

Existen Retrovirus que hasta la fecha no se han asociado con algún proceso patológico; éste es el caso de los virus sincitiales que han sido aislados de numerosas especies, el gato en particular.

Más allá de lo que a oncornavirus concierne, ha sido posible reconocer secuencias correspondientes a algunos Retrovirus defectuosos, por ejemplo, aquellos que son incapaces de multiplicarse por sí mismos en el genoma de las células de gatos aparentemente sanos. Esto es real para el Virus del Sarcoma Felino (FeSV), de quien su material genético puede ser encontrado en el genoma celular de los gatos; FeSV es incapaz de multiplicarse sin la ayuda de FeLV, el cual asume el papel de " virus auxiliar ".

Otro oncornavirus que forma parte integral del genoma celular, pero hasta la fecha no ha sido relacionado con ninguna enfermedad, es el virus RD 114, el cual está presente en todas las células de casi todos los gatos, y que es transmitido intacto hacia sus descendientes mediante las células germinales. El virus RD 114, es un verdadero agente endógeno, distinto a FeLV el cual es un virus exógeno, y es capaz de ser transmitido de gato a gato (Snyder, 1993).

Las proteínas p30 endógenas de RD 114 poseen determinantes interespecies compartidos con el virus de la leucemia felina y/o el virus del sarcoma felino, por lo que en este caso podemos considerar la posibilidad de enfrentarnos hacia cualquiera de estos virus, que ocasionan cruce antigénico con FeLV (Hagan, 1988).

La signología clínica del gato No. 15, se manifestó principalmente como convulsiones esporádicas y rigidez de miembros. Los datos de la biometría hemática reportan linfopenia absoluta y neutrofilia relativa. En la médula ósea, hay aumento de la serie linfoide.

A pesar de que la patogénesis y lesiones de los signos de disfunción neurológica no han sido bien determinadas, es probable que la enfermedad neurológica sea una de las manifestaciones de la infección por FeLV en un número reducido de animales (Mullins, 1991). A este caso podemos asignarle las posibilidades que mencionamos en el primero; es decir, ID detectó antígenos diferentes a p27 o un subgrupo viral aparte de los ya conocidos.

Con respecto al gato No. 24, podemos observar que se trata de uno de los dos gatos que no presentaron signología clínica de enfermedad alguna. La linfopenia absoluta, como se ha descrito, puede ser consecuencia de un estado de estrés provocado al momento de tomar la muestra sanguínea.

Este gato fué inmunizado 10 meses antes de la obtención de la muestra para ELISA, ID y biometría, utilizando la vacuna Fevaxyn, de Solvay. Por medio de las bandas de precipitación entre el suero de este gato y la misma vacuna de Solvay, pudimos observar que aún existen anticuerpos circulantes contra FeLV. Pero así como detectamos éstos anticuerpos, el suero de este gato, reaccionó contra el suero hiperinmune. Para entender esta reacción, detallaremos el proceso que se dió entre la utilización de la vacuna VacSYN (Bio- Trends) para inmunizar al gato probado como testigo positivo para la obtención del suero hiperinmune y el gato No. 24, que representa este caso.

La vacuna VacSYN, es un producto de partículas virales completas, que han sido propagadas en líneas celulares linfoides de felinos, continuamente infectadas y contienen los subgrupos A, B y C del Virus de Leucemia Felina. La suspensión viral es purificada para eliminar componentes no deseados de cultivos celulares tales como suero bovino y después se concentra para optimizar una masa antigénica efectiva por dosis de vacuna. Como parte del proceso, las partículas virales son selectivamente inactivadas con etilenimina, la cual destruye el ácido nucleico contenido en la nucleocápside, sin afectar o desnaturalizar las proteínas antigénicas que son responsables de la producción de anticuerpos virusneutralizantes en el gato vacunado. Entonces, al ser esta vacuna elaborada en líneas linfoides de felinos, no se garantiza 100% la eliminación de este tipo de residuos y posiblemente ésta sea la causa de la reacción positiva entre el suero del gato No. 24 y el suero hiperinmune.

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas ha sido tradicionalmente acompañado por el diagnóstico clínico en cuanto a observación de signos característicos de la enfermedad y el aislamiento del agente etiológico en un cultivo. Pero el aislamiento de los organismos es costoso, lento, requiere de equipo de laboratorio extenso y personal especializado, y no es práctico para los veterinarios que ejercen.

Un método más práctico y preciso para la identificación de un microorganismo infectante y, por lo tanto, el diagnóstico o causa de la enfermedad infecciosa es la directa identificación de antígenos de los microorganismos o anticuerpos para los antígenos de los especímenes clínicos. Debido a que muchos microorganismos infectantes contienen proteínas, glucoproteínas o polisacáridos como determinantes antigénicos que pueden ser bien distinguidos de los componentes celulares del huésped, ha sido posible el desarrollo de sistemas de detección inmunológicos o inmunoensayos capaces de identificar antígenos de microorganismos infecciosos en fluidos del cuerpo o células.

En general, las pruebas de inmunodetección deben ser sensibles, rápidas, convenientes y suficientemente específicas como para no interferir con constituyentes normales del animal, tales como fluidos o células (Tablas Nos. 11 y 12). Estudios en la inmunodetección de varios microorganismos, mediante varios sistemas de ensayos, indican que las pruebas más específicas y sensibles son inmunofluorescencia, radioinmunoensayo e inmunoblot (Western blot), seguidas por sensibilidad, pero menos específicas ELISA y aglutinación, y finalmente por aún menos sensible, pero muy específicas aislamiento y la técnica de doble Inmuno-difusión.

- Índice de verdaderos positivos: Sensibilidad (porcentaje)
- Índice de falsos positivos: Probabilidad de que el resultado de la prueba retroviral sea positivo cuando el virus no está presente en el gato
- Índice de verdaderos negativos: Especificidad (porcentaje)
- Índice de falsos negativos: Probabilidad de que el resultado de la prueba retroviral sea negativo cuando el virus está presente en el gato.
- Valor predictivo positivo: Probabilidad de que el retrovirus esté presente en el gato, cuando el resultado de la prueba es positivo.
- Valor predictivo negativo: Probabilidad de que el retrovirus no esté presente en el gato, cuando el resultado de la prueba es negativo (Hardy, 1991).

En estudios anteriores, se realizó una comparación entre las pruebas de IFA, con ID y aislamiento del virus en 1,549 gatos, con el fin de establecer un estándar para las pruebas de FeLV. En este estudio, se observó una excelente correlación entre IFA e ID. La sensibilidad para ID fue de 96.2% y especificidad de 99.8% con respecto a IFA. Pero debido a la facilidad de uso y el tiempo reducido para realizarla, la prueba de IFA es la más práctica de estas tres. Las principales limitantes de ésta es que se requiere de personal especializado y microscopio fluorescente para interpretarla.

Asimismo, se obtuvo otro estudio comparativo entre IFA y ELISA. En este estudio, el análisis de comparación de las pruebas de ELISA realizadas en consultorios veterinarios y la prueba de IFA, realizada por un laboratorio especializado, indicó que entre el 26 y 69% de los resultados ELISA positivos y el 13% de los resultados ELISA negativos fueron incorrectos. Por tal motivo se recomienda que todos los resultados ELISA positivos, deben ser inmediatamente confirmados por IFA (Hardy, 1991).

En lo que concierne a los resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, falsos positivos y negativos de la prueba de Inmudifusión con respecto a ELISA, se hace la aclaración de que se trata de valores muy relativos y poco confiables, debido a la baja especificidad para la prueba de ELISA y el consiguiente alto índice de falsos positivos que en ésta se han reportado. Para obtener resultados reales de sensibilidad, especificidad, etc., de una prueba, se requiere de la comparación de ésta con una prueba confiable, altamente sensible y específica, como sería la técnica de Inmunofluorescencia.

Las pruebas de hipótesis practicadas en las técnicas de ELISA e Inmudifusión y sus respectivas correlaciones con biometría hemática y médula ósea reportaron que tanto las cifras de glóbulos rojos y la relación M:E de gatos positivos y negativos a FeLV, mediante la técnica de ELISA, fueron altamente significativas, utilizando un nivel α de 0.01 ($p < 0.01$); esto significa que existe gran diferencia entre medias de glóbulos rojos y la relación M:E de los gatos positivos con respecto a los negativos mediante la técnica de ELISA. Con excepción de estos parámetros, ningún otro valor fue considerado como significativo ($p < 0.05$); estando incluida entre éstos la correlación de Inmudifusión con biometría hemática y médula ósea.

- Índice de verdaderos positivos: Sensibilidad (porcentaje)
- Índice de falsos positivos: Probabilidad de que el resultado de la prueba retroviral sea positivo cuando el virus no esté presente en el gato
- Índice de verdaderos negativos: Especificidad (porcentaje)
- Índice de falsos negativos: Probabilidad de que el resultado de la prueba retroviral sea negativo cuando el virus está presente en el gato.
- Valor predictivo positivo: Probabilidad de que el retrovirus esté presente en el gato, cuando el resultado de la prueba es positivo.
- Valor predictivo negativo: Probabilidad de que el retrovirus no esté presente en el gato, cuando el resultado de la prueba es negativo (Hardy, 1991).

En estudios anteriores, se realizó una comparación entre las pruebas de IFA, con ID y aislamiento del virus en 1,549 gatos, con el fin de establecer un estándar para las pruebas de FeLV. En este estudio, se observó una excelente correlación entre IFA e ID. La sensibilidad para ID fue de 96.2% y especificidad de 99.8% con respecto a IFA. Pero debido a la facilidad de uso y el tiempo reducido para realizarla, la prueba de IFA es la más práctica de estas tres. Las principales limitantes de ésta es que se requiere de personal especializado y microscopio fluorescente para interpretarla.

Asimismo, se obtuvo otro estudio comparativo entre IFA y ELISA. En este estudio, el análisis de comparación de las pruebas de ELISA realizadas en consultorios veterinarios y la prueba de IFA, realizada por un laboratorio especializado, indicó que entre el 26 y 69% de los resultados ELISA positivos y el 13% de los resultados ELISA negativos fueron incorrectos. Por tal motivo se recomienda que todos los resultados ELISA positivos, deben ser inmediatamente confirmados por IFA (Hardy, 1991).

En lo que concierne a los resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, falsos positivos y negativos de la prueba de Inmunodifusión con respecto a ELISA, se hace la aclaración de que se trata de valores muy relativos y poco confiables, debido a la baja especificidad para la prueba de ELISA y el consiguiente alto índice de falsos positivos que en ésta se han reportado. Para obtener resultados reales de sensibilidad, especificidad, etc., de una prueba, se requiere de la comparación de ésta con una prueba confiable, altamente sensible y específica, como sería la técnica de Inmunofluorescencia.

Las pruebas de hipótesis practicadas en las técnicas de ELISA e Inmunodifusión y sus respectivas correlaciones con biometría hemática y médula ósea reportaron que tanto las cifras de glóbulos rojos y la relación M:E de gatos positivos y negativos a FeLV, mediante la técnica de ELISA, fueron altamente significativas, utilizando un nivel α de 0.01 ($p < 0.01$); esto significa que existe gran diferencia entre medias de glóbulos rojos y la relación M:E de los gatos positivos con respecto a los negativos mediante la técnica de ELISA. Con excepción de estos parámetros, ningún otro valor fué considerado como significativo ($p < 0.05$); estando incluida entre éstos la correlación de Inmunodifusión con biometría hemática y médula ósea.

CONCLUSIONES

Entre los signos clínicos predominantes de los gatos estudiados, excluyendo a los dos gatos sanos, destacaron depresión, anorexia, pérdida de peso y caquexia. Estos signos se hicieron aparentes tanto en gatos ELISA positivos, como en los negativos.

El porcentaje de gatos que resultaron positivos a antígeno de FeLV por medio de la prueba de ELISA, rebasó el 50%, y por medio de ID, se registró el 47.6% de gatos positivos a antígeno.

Los resultados de la biometría hemática en los gatos ELISA (+), reportaron manifestación de anemias en un 75%, tanto regenerativas como no regenerativas. Las anomalías leucocitarias representaron el 69% de los gatos a los que se les practicó BH; encontrando los tres tipos de leucemias (leucémica, subleucémica y aleucémica).

En la médula ósea, hubo una notoria disminución de las células granulocíticas en los gatos positivos mediante ELISA, con respecto a los negativos. Comparativamente con esto, los valores de las células linfoides se encontraron más aumentados en los gatos positivos. Por último, el valor porcentual de células eritroides en gatos positivos fué casi el doble que el de los gatos negativos.

En general, se hicieron aparentes varios síndromes clínicos desencadenantes de la infección persistente por FeLV, tales como leucemias linfoides, reticuloendoteliosis, anemias, inmunosupresiones e infecciones oportunistas secundarias. En algunos casos se diagnosticó por palpación la presencia de linfosarcoma en cavidad abdominal. No se realizó necropsia en ningún gato, aunque hubiese sido de interés en ciertos casos.

En lo que respecta a la técnica de inmunodifusión, determinamos que la reacción de precipitación en el agar más intensa y delimitada, resultó ser la que produjo la vacuna Fevaxyn de laboratorios Solvay, la cual hubo que importar, ya que no está disponible en el mercado mexicano.

El número de muestras positivas a antígeno por ID, fueron 5, 4 más fueron positivas sólo a anticuerpos; 5 fueron positivas a ambos; antígenos y anticuerpos y en 7 muestras no se detectó reacción alguna.

Por medio de la comparación de la prueba de ID, contra la de ELISA, se obtuvieron como resultados el 23% de muestras ELISA (+), ID (+); ELISA (+), ID (-); ELISA (-), ID (+) y el 28.6% de muestras ELISA (-), ID (-).

Los resultados de sensibilidad y especificidad para la prueba de ID en relación a ELISA, fueron de 50% y 54.5% respectivamente.

Se recomienda realizar estudios posteriores, utilizando otras variables para mejorar la técnica de ID, y así poder ser utilizada por personal especializado en laboratorios clínicos como otra opción de diagnóstico de FeLV, además de la prueba de ELISA y/o IFA.

Debido a la alta sensibilidad y especificidad para la prueba de IFA, se aconseja realizar pruebas comparativas con ésta, en caso de obtener resultados ELISA (+) ó ID (-).

El uso preciso y correcto de las pruebas de inmunodetección para la detección de las infecciones por Retrovirus en felinos (FeLV y Virus de Inmunodeficiencia Felina- FIV), es responsabilidad de los médicos veterinarios. Los propietarios de los gatos domésticos dependen del juicio del clínico para determinar el método de detección de la infección retroviral felina. Ellos esperan que su médico use la prueba más exacta y estar seguros del resultado de la prueba antes de hacer recomendaciones con respecto al manejo de sus gatos. Por supuesto, la velocidad de obtener los resultados y el costo de la prueba, son factores para el clínico y el propietario. De cualquier modo, estos factores no deben ser tomados en cuenta para determinar qué prueba se usa, y si es o no recomendada una prueba confirmatoria, especialmente cuando el resultado de la prueba es positivo. Es responsabilidad del médico veterinario de explicar las limitaciones de todas las pruebas retrovirales y recomendar que todos los resultados positivos deben ser confirmados por la prueba confirmatoria más precisa. Es imperativo que los gatos no sean eliminados de sus casas o aislados de otros gatos con la base de resultados incorrectos de pruebas retrovirales.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- August, J. R.: "Retrovirus Infections of cats". Octava Jornada Médica (Memorias) FMVZ UNAM, México, 1993.
- 2.- Benjamin, M. M. : Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Limusa, México, 1984.
- 3.- Blue, J. T. : "Myelofibrosis in Cats with myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia" Vet. Path 25 (5) 154-160 (1988).
- 4.- Carlyle, T.: Veterinary Pathology. Lea & Febiger. U.S.A., 1974.
- 5.- Chaudler, E. A., Gaskell, C. S. & Hilbery A. D. R.: Feline Medicine and Therapeutics. Blackwell Scientific Publications Inc. U.S.A., 1990.
- 6.- Childs, J. E.: "Feline Leukemia Virus (FeLV)" Fel. Prac. 20(2): 15-18 (1992).
- 7.- Clark, N., Kushner, N. N., Barret, C.B. & Cotter S.: " Efficacy and Safety field trials of recombinant DNA vaccine agains Feline Leukemia Virus Infection " JAVMA 199(10): 1433-1443 (1991).
- 8.- Coles, E. H.: Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª ed. Interamericana. México, 1986.
- 9.- Cottz, S. M.: " Management of Healthy Feline Leukemia Virus positive cats " JAVMA 199 (10) 1470-1473 (1991).
- 10.- Daniel, W. W. Biocstadística. Limusa, México, 1984.
- 11.- Fan, L. C., Dorner, J. L. & Hoffman, W. E.: " Reticulocyte response and maturation in experimental acute blood loss anemia in the cat " JAAHA 14: 219-224 (1978).
- 12.- Fenner, F., Bachmann, P. Veterinary Virology. Academic Press Inc. U.S.A., 1987.
- 13.- Ford, R. B. Clinical Signs and Diagnosis in Small Animal Practice. Churchill Livingstone. U.S.A, 1988.
- 14.- Gordon, A. H. Electroforesis de Proteínas en geles de Poliacrilamida y de almidón. El Manual Moderno, México, 1975.
- 15.- Hagan & Bruners: Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. Comstock Publishing Associates. U.S.A., 1988.
- 16.- Hardy, W. D.: " General Principles of Retrovirus Immunodetection Tests.. " JAVMA 199 (10): 1282-1286 (1991).
- 17.- Hardy, W. D., Zuckerman E. E.: " Development of the Immunofluorescent Antibody Test for Detection of Feline Leukemia Virus in cats " JAVMA 199 (10): 1327-1335 (1991).

- 18.- Hardy, W. D. " Feline Leukemia Virus " JAAHA 17: 951-980 (1981).
- 19.- Hathaway, J. E.: " Feline Anemia ". Vet. Clin. N. Am./ S. Anim. Prac. 6 (2): 495-510 (1976).
- 20.- Hayhoe, S. G., Flemans. Atlas de Citología Hematológica. Científico Médica. Barcelona, 1980.
- 21.- Herbert, W. J. Inmunología Veterinaria. Acribia. España, 1972.
- 22.- Hines, D. L., Cutting, J. A. & Walsh, J. A.: " Evaluation of efficacy and safety of an inactivated virus vaccine against Feline Leukemia Virus Infection ". JAVMA 199 (10): 1428-1430 (1991).
- 23.- Howard, J. F. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. La Prensa Médica Mexicana. México, 1988.
- 24.- Idexx lab: Feline Leukemia virus Antigen Test Kit. CITE/FelV. Portland, U.S.A.
- 25.- Jacobson, R. H.: " How well do Serodiagnostic Test predict the Infection or Disease Status of cats ? " JAVMA 199 (10): 1343-1347 (1991).
- 26.- Jacobson, R. H.: " Sensitivity and Specificity of blood test kits for Feline Leukemia Virus Antigen. " JAVMA 195 (6): 747-751 (1989).
- 27.- Jain, N. C.: Schalm's Veterinary Hematology. 4ª ed. Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A., 1986.
- 28.- Jarret, O., Pacitti, A. M., Hosie, M. H. & Reid, G.: " Comparison of Diagnostic Methods for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. " JAVMA 199(10): 1362-1364 (1991).
- 29.- Lafrado, L. J., Dezzutti, Ch. S. & Olsen, R. G.: " Immunodeficiency in latent Feline Leukemia Virus infections. " Vet. Immunol. Immunopathol 21: 39-46. (1989).
- 30.- López, G. G.: Determinación de la prevalencia de Leucemia Viral Felina, diagnosticada por medio de una prueba modificada de ELISA (UNI-TEC FelV) en el área metropolitana. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán. U.N.A.M. México, 1993.
- 31.- Manual de Laboratorio Clínico. FES-Cuautitlán U.N.A.M. México, 1993.
- 32.- Marin, H. J.: Enfermedades Infecciosas de los gatos. Esfera editores S.A. México, 1989.
- 33.- Medway, W., Prier, E. J. & Wilkinson, S. J: Patología Clínica Veterinaria. UTEHA, México, 1986.
- 34.- Morales, R. G.: Diagnóstico del Virus de Leucemia Viral Felina (FeLV) y del Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV) a través de la prueba de ELISA y su correlación con la biometría hemática y posibles hallazgos a la necropsia en gatos enfermos en la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán. U.N.A.M. México, 1993.

- 35.- Morgan, A. P.: "Regulatory considerations for licensing Feline Leukemia Virus antigen or antibody test kits." JAVMA 199 (10): 1325-1327. (1991).
- 36.- Mullins, J. I., Hoover, E. A.: "Feline Leukemia Virus Infection and Diseases." JAVMA 199 (10): 1287-1294 (1991).
- 37.- Nettifee, J. A.: "Biotechnology and Feline Leukemia Virus Testing: The advance of diagnostics in the 1990s". Veterinary Technician (10): 654-656. (1991).
- 38.- Olsen, R.G. Immunología e inmunopatología de animales domésticos. El Manual Moderno. México, 1983.
- 39.- Pacitti, A. M.: "Latent Feline Leukemia Virus Infection: a review." J. Small Anim. Prac. 28: 1153-1159 (1987).
- 40.- Pedersen, N. C. Feline Infectious Diseases. American Veterinary Publications Inc. U.S.A., 1988.
- 41.- Pollock, R. V. H. & Haffer, K. N.: "Review of the first Feline Leukemia Virus vaccine." JAVMA 199 (10): 1406-1409. (1991).
- 42.- Rojko, J. L. & Kociba, G. J.: "Pathogenesis of infection by the Feline Leukemia Virus." JAVMA 199 (10): 1305-1310. (1991).
- 43.- Scarlett, O. W.: "Feline Leukemia Virus antigen tests". Veterinary Medicine Report. 1 (2): 268-272. (1989).
- 44.- Siegal, M. The Cornell book of cats. Villard Books. U.S.A., 1991.
- 45.- Steel, R. G. D. & Torrie, J. H. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Mc. Graw Hill. México, 1985.
- 46.- Tizard, I.: Immunología Veterinaria. 3ª ed. Interamericana, México, 1987.
- 47.- Tompkins, M. B., Ogilvie, G. K.: "Immunopathogenesis of Feline Leukemia Virus Infections." Companion Animal Practice. 12 (3): 15-26. (1988).
- 48.- Tompkins, M. B. & Novotney, C.: "Early events in the immunopathogenesis of feline Retrovirus infections". JAVMA 199 (10): 1336-1339. (1991).
- 49.- Snyder, H.W. Feline Leukemia Virus. Virbac laboratories . (1993).
- 50.- Wayne, W. Bioestadística. Limusa. México, 1988 .