



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

---

---

“Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina.”(Estudio preliminar)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

**NORMA EMILIA ZAGAL LÓPEZ**

**ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

**COASESOR: DR. HUGO RAMIREZ ÁLVAREZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

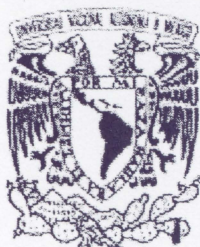


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

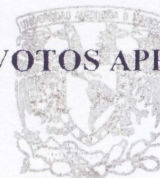
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNAM  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES

ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
 Jefa del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de  
 Leucemia Viral Felina. (Estudio preliminar)

Que presenta la pasante Norma Emilia Zagal López

Con número de cuenta: 09803647-9 para obtener el título de:  
 Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlan Izcalli, Mex. a 9 de Junio de 2011.

PRESIDENTE MVZ. Carlos Lorenzo García Alcaraz

VOCAL Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

SECRETARIO MVZ. Carlos Javier González López

1er SUPLENTE MVZ. Rocío Morales Mendez

2º SUPLENTE MVZ. Solón Alfonso Zabre Santamaría

## **DEDICATORIA.**

*A mi madre Gloria López, mi creadora, mi maestra, mi apoyo, mi heroína; t amo con todo  
mi corazón...*

*A mi padre José Zagal y hermana Xochitl Nashielly, por su apoyo total, mil gracias...*

*A mi hermana Nancy Rocío, el mayor reto de mi vida...*

*A Neko, mi eterno y leal compañero en los momentos más difíciles y oscuros de mi vida,  
gracias hijito...*

*A Rubén Pérez, el amor de todas mis vidas gatunas...*

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi madre Gloria López a quién le debo mi vida, mi carrera, mi filosofía... gracias por confiar en mí y ser mi ejemplo a seguir.

A mi padre José Zagal por tu apoyo en mi carrera universitaria.

A mis queridos amigos de la carrera: Yesica Torres, Margarita Aguilar, Adriana de Jesús, David Monroy, Claudia Campos, Ángeles Mendoza, Adriana Ciprián, Ernesto Butrón, Gaby Flores, Susan Rodríguez, Dulce Padilla, Delman Flores, Nelly Cano, Víctor Malvárez, Carmen Medina, Rodolfo Carrión y Alfonso Camela. Gracias por su compañía, amistad, apoyo y ayuda en los momentos buenos, malos y regulares. Los quiero mucho!!!!!!

A los amigos y colaboradores del laboratorio de virología: Flor Martínez, Luis López, Itzel Bautista, Miguel Lazcano, Carmen Tapia, Lulú Jara, Gerardo Arcila, y Alma Montes de Oca. Gracias por sus porras y cebollazos, por el apoyo con las muestras, la compañía y las noches de leche y pan en Xhala. Los quiero mucho!!!!!!

A mis amigas de Soka Gakkai Gladys Rico, Tlahuili y Citlalli Nava y Fabiola Ramírez. Mis compañeras y amigas de fe, cómplices y apoyo en la etapa más bella de mi vida: el Kotekitai!

A Rubén Pérez. Testigo del inicio de mi amor a los gatos. Por volver a mi vida cuando menos lo esperaba pero cuando más lo necesitaba. Te amo minino!!!

A mis “hijitos” desde el Gatuperio hasta el Neko, gracias por adoptarme como su mamá y ayudarme a descubrir mi vocación.

A mi asesor: Dr. Humberto Alejandro Martínez. Gracias por confiar en mí para trabajar con gatos (a pesar que no se parecen en nada a los chivos) y brindarme los recursos para realizar mi tesis... por darme la oportunidad de cumplir mi sueño de hacer una tesis con gatos, mil gracias!!!

A mi coasesor: Dr. Hugo Ramírez. Gracias por ser mi maestro, gurú, sensei y compartir tus valiosos conocimientos conmigo ayudándome a redescubrir mi vocación (no olvidare tus tardes conmigo frente a la computadora a pesar de tener muchísimo trabajo...). Por brindarme tu apoyo, tu tiempo, tu amistad y ser mi “papá de laboratorio” mil gracias!!!

A la Dra. María Martha García. Gracias por sus consejos y apoyo durante mi estancia en el laboratorio y ayudarme a completar partes del experimental en su laboratorio, gracias infinitas...

## **AGRADECIMIENTOS EN LA RELIZACIÓN DE ÉSTA TESIS.**

Tesis realizada con recursos de la Cátedra de Investigación: “Diagnóstico y estudio molecular de las enfermedades virales de los animales” Clave: GC-O7 en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES-Cuautitlán. Veterinaria campo 4. UNAM

Laboratorio de Inmuno-Virología de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología de la UMAE Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Especialmente a la Dra. María Martha García Flores y al Dr. Giménez Scherer Juan Antonio.

Hospital Veterinario “Fundación Mendoza” particularmente al Dr. Silvano Mendoza Gastón y al estudiante Luis Ángel Nájera por su valiosa colaboración en la obtención de muestras.

# ÍNDICE.

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Agente etiológico .....	1
1.2. Replicación .....	2
1.3. Subgrupos.....	2
1.4. TRANSMISIÓN .....	3
1.5. PATOGÉNESIS .....	4
1.5.1. <i>Infeción aguda</i> .....	4
1.5.2. <i>Viremia persistente</i> .....	4
1.5.3. <i>Inmunidad (infección latente o fin de la infección)</i> .....	5
1.5.4. <i>Infeción atípica</i> .....	5
1.6. RESPUESTA INMUNE .....	6
1.6.1. Inmunidad humoral.....	6
1.6.1.1. <i>Anticuerpos Virus Neutralizantes</i> .....	6
1.6.1.2. <i>FOCMA y los anticuerpos anti-FOCMA</i> .....	6
1.6.2. Inmunidad celular.....	7
1.6.2.1. <i>Anticuerpos contra otros antígenos virales e inmunidad mediada por células (IMC)</i> .....	7
1.6.2.2. Citocinas .....	8
1.6.2.3. <i>Consecuencias en linfocitos T</i> .....	8
1.6.2.4. <i>Consecuencias en linfocitos B</i> .....	9
1.7. SIGNOS CLÍNICOS.....	10
1.8. DIAGNÓSTICO .....	12
1.9. PREVENCIÓN Y CONTROL .....	13
1.9.1. <i>Vacunación</i> .....	13
1.9.2. <i>Los subgrupos y la vacunación</i> .....	14
1.9.3. <i>Anticuerpos neutralizantes del virus y la vacunación</i> .....	15
1.9.4. <i>Importancia del antígeno FOCMA en las vacunas</i> .....	15
1.9.5. <i>Gatos infectados</i> .....	15
1.9.6. <i>Terapia antiviral</i> .....	15
<b>2. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>16</b>

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	16
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>Colección de muestras</i> .....	17
3.3. <i>Antígenos vacunales</i> .....	17
3.3. <i>Determinación del perfil proteico de tres antígenos vacunales</i> .....	17
3.4. <i>Inmunoelctrotransferencia (Western blot)</i> .....	18
3.5. <i>Determinación de proteína por el método de Bradford (Micrométodo)</i> .....	18
3.6. <i>Estandarización de la técnica de ELISA indirecta</i> .....	19
3.7. <i>Análisis estadístico</i> .....	20
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
4.1. <i>Perfil proteico de tres vacunas comerciales</i> .....	21
4.2. <i>Resultados Western blot</i> .....	22
4.3. <i>Resultados de la prueba de ELISA indirecta</i> .....	22
4.4. <i>Resultados serológicos totales de la población de gatos estudiada por Western blot y ELISA</i> .....	23
4.5. <i>Análisis comparativo de las pruebas</i> .....	24
4.6. <i>Análisis de resultados por subgrupos</i> .....	24
4.6.1. <i>Gatos agrupados por sexo</i> .....	24
4.6.2. <i>Gatos agrupados por edad</i> .....	25
4.6.3. <i>Gatos agrupados por procedencia</i> .....	25
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>
<b>8. APÉNDICE 1 .....</b>	<b>37</b>
<b>9. APÉNDICE 2 .....</b>	<b>40</b>
<b>10 APÉNDICE 3 .....</b>	<b>42</b>
<b>11 APÉNDICE 4 .....</b>	<b>44</b>
<b>12 APÉNDICE 5 .....</b>	<b>46</b>



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

### FIGURAS.

1. Estructura de FeLV .....	1
2. Electroforesis de tres antígenos vacunales .....	21
3. Resultados del análisis de un grupo de sueros representativos de gatos por WB.....	22
4. Resultados de los sueros de gatos evaluados a Western blot (WB) y ELISA indirecta .....	24
5. Procedencia de los gatos. Particulares .....	26
6. Procedencia de los gatos. Clínica.....	26
7. Procedencia de los gatos. Antirrábico .....	26

### TABLAS.

1. Enfermedades y condiciones reportadas en gatos con infección latente o activa de FeLV .....	11
2. Comparación de sensibilidad y especificidad de diferentes Kits comerciales para la detección de FeLV .....	13
3. Vacunas comerciales disponibles en México .....	14
4. Preparación de muestras para la determinación de proteínas por el método de Bradford .....	19
5. Estandarización de la técnica de ELISA indirecta para el FeLV.....	19
6. Parámetros evaluados y utilizados en la estandarización de la prueba de ELISA indirecta .....	23
7. Resultados de la detección de animales seropositivos y seronegativos en cada prueba utilizada (ELISA indirecta y Western blot) del total de gatos muestreados .....	23
8. Comparación de los resultados obtenidos de los sueros de gatos evaluados a Western blot (WB) y ELISA indirecta .....	23
9. Gatos seropositivos y seronegativos agrupados por sexo .....	25
10. Gatos seropositivos y seronegativos agrupados por edad .....	25
11. Gatos seropositivos y seronegativos agrupados por procedencia .....	26
12. Población de gatos totales del estudio .....	37
13. Gatos (+) y (-) concordantes en ambas pruebas .....	46
14. Gatos discordantes de ambas pruebas .....	48
15. Procedencia Particulares. Concordantes .....	48
16. Procedencia Particulares. Discordantes.....	49
17. Procedencia Fundación Mendoza. Concordantes .....	49
18. Procedencia Fundación Mendoza. Discordantes.....	50
19. Procedencia Antirrábico. Concordantes .....	51
20. Procedencia Antirrábico. Discordantes.....	51

## **ABREVIATURAS.**

FeLV: Por su nombre en inglés, Virus de Leucemia Viral Felina.

RNA: Ácido RiboNucléico.

p10: Nucleoproteína de 10 kilodaltones de peso.

p12: Proteína de matriz de 12 kilodaltones de peso.

p15c: Proteína de núcleo de 15 kilodaltones de peso.

p15E: Proteína de transmembrana de 15 kilodaltones de peso

p27: Proteína de cápside de 27 kilodaltones de peso.

gp70: Glicoproteína de superficie de 70 kilodaltones de peso.

ADN: Ácido DesoxiRiboNucléico.

ARNm: Ácido RiboNucléico mensajero.

AVN: Anticuerpos Virus Neutralizantes.

Anticuerpos anti-FOCMA: células de membrana antigénica asociadas a oncornavirus.

FOCMA: Feline oncornavirus cell membrane antigen o antígeno de membrana de células infectadas por oncornavirus feline.

IMC: Inmunidad mediada por células.

IFN- $\alpha$ : Interferón alfa.

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma.

FeLIX: FeLV infectivity X-essory protein ó proteína accesoria de infectividad del FeLV.

IL-1: Interleucina 1.

IL-2: Interleucina 2.

IgM: Inmunoglobulina M.

IgG: Inmunoglobulina G.

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

PAGE-SDS: Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

WB: Western blot

LC: Línea de corte.

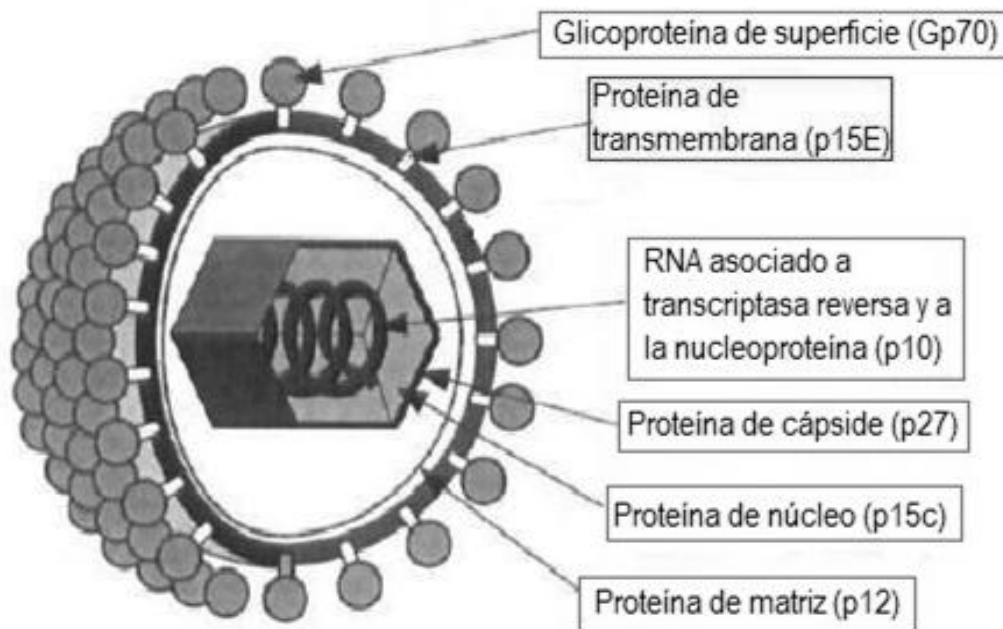
# 1. INTRODUCCIÓN

La Leucemia Viral Felina es causada por un retrovirus que se transmite de forma horizontal, y menos frecuente de forma vertical. Fue descrito por vez primera por Jarrett y cols. en 1964 cuando se buscaba la causa de la aparición de linfomas múltiples en gatos caseros. Hoy en día es conocido como el causante de una enfermedad fatal en gatos, es de importancia veterinaria y sirve como modelo animal para determinados aspectos de enfermedades humanas como el cáncer, anemia, e inmunodeficiencias (Lutz, 1990; Sparkes, 1997; Gomes-Keller *et al.*, 2005; Jarret, 1999).

## 1.1. Agente etiológico.

El virus de Leucemia Viral Felina (FeLV) pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Orthoretrovirinae y género Gammaretrovirus, el cual representa un grupo de retrovirus oncogénico de mamíferos, típicamente caracterizados por un largo estado de latencia e inducción de leucemia y linfoma en sus huéspedes naturales (Rojko, *et al.*, 1984; ICTV, 2009; Hartmann, 2006; Levy, 2008). Tiene una sola banda de RNA de polaridad positiva, protegida por una cápside icosaédrica. FeLV es un agente exógeno y se replica en diversos tejidos del huésped (Hartmann, 2006).

**Fig. 1. Estructura de FeLV.**



(Adaptado de Sparkes 1997).

El genoma tiene 3 genes principales identificados como *gag* o “antígeno específico de grupo” el cual codifica las proteínas p10, p12, p15, p27, el gen *pol* que codifica la transcriptasa reversa y otras enzimas virales y el gen *env* que codifica los componentes de la envoltura. Los lípidos contenidos en la envoltura componen a la transmembrana la cual es altamente hidrofóbica (p15E) y a la que está unida por puentes de disulfuro la glicoproteína gp70 (Lutz, 1990; Jarret, 1999).

### **1.2. Replicación.**

Es llevada a cabo en varios pasos, primero comienza en la mucosa orofaríngea, específicamente en linfocitos y macrófagos. Entonces la propagación del virus ocurre en nódulos linfáticos y sangre tras el desarrollo de la viremia, el FeLV es capaz de propagarse rápidamente en los tejidos blanco como son: el mieloide, linfoide y células epiteliales; una vez que el provirus se ha integrado en las células madre hematopoyéticas, como las células de la progenie también llevan el ADN proviral, la eliminación total de la infección es muy improbable (Dunham, *et al*, 2008). Posteriormente ocurre la fijación del virus y la entrada en la célula en donde la transcriptasa inversa cataliza la primera síntesis de ADN a una molécula de cadena sencilla y posteriormente da lugar a una molécula de ADN de doble cadena, para todo esto utiliza el ARN viral. El ADN viral se transfiere al núcleo donde es integrado en el ADN cromosómico. Después de la transcripción, el ARNm se traduce en grandes poli-proteínas que se rompen en proteínas virales maduras antes del ensamble del virus (Rojko, *et al*, 1984; Haffer *et al.*, 1987). Después el ARN viral se incorpora en el núcleo, se ensambla el virión y sale de la célula por gemación. Por lo general las células infectadas no son destruidas durante la replicación viral (Lutz, 1990).

### **1.3. Subgrupos.**

El FeLV es un retrovirus oncogénico que puede producir en los gatos enfermedades de tipo proliferativo o de tipo degenerativo. Según la estructura de la proteína gp70 los virus que infectan a los gatos de forma natural se clasifican en 3 subgrupos. El FeLV-A es el subgrupo predominante y está presente en todos los gatos infectados por FeLV. Los virus de los otros 2 subgrupos solo se aíslan en asociación con FeLV-A. FeLV-B se forma cuando FeLV-A se combina, por recombinación o mutación del ADN proviral, con

secuencias retrovirales endógenas (secuencias que están integradas establemente en el genoma felino y que generalmente no se expresan pero se transmiten genéticamente) y se aísla en alrededor del 50% de los gatos virémicos, se relaciona con el desarrollo de tumores. FeLV-C se aísla en el 1-2% de los gatos infectados y surge de una mutación del gen de la envoltura de FeLV-A y tiene un carácter mucho más supresor de la médula ósea que el virus del que procede, puede causar degeneración, proliferación o cambios neoplásicos en células hematopoyéticas (Osterhaus *et al.*, 1989; Sparkes, 1997; Tique, *et al.*, 2009; Tizard, 2009).

Es importante destacar que esto significa que la proteína gp70 del FeLV-A muestra estabilidad antigénica, y por lo tanto, no hay reacción cruzada de anticuerpos neutralizantes entre los diferentes subgrupos (Sparkes, 1997).

Los diferentes subgrupos también varían en su patogenicidad. FeLV-A sólo, es el menos patógeno, siendo el más lento para causar enfermedad en comparación con FeLV-B y C, pero es el subgrupo más comúnmente asociado con infecciones latentes. Aunque más patógenos, los virus de los subgrupos B y C tienen una replicación defectuosa. En los virus aislados se ha descrito que la alteración de la estructura de la molécula de gp70 en FeLV-B y C restringe su tropismo celular y por tanto, evita que se replique en títulos altos. FeLV-A se mezcla fenotípicamente con FeLV-B o C, permitiendo la infección productiva en células que normalmente no son permisivas para éstos. Estudios experimentales han demostrado que inevitablemente FeLV-B o C requieren la transmisión simultánea de FeLV-A para que estos virus puedan replicarse (Sparkes, 1997).

#### **1.4. TRANSMISIÓN.**

El FeLV se elimina por secreciones, especialmente de saliva y nasales, por lo tanto se transmite entre gatos por el acicalamiento mutuo, mordidas derivadas de peleas y el intercambio de platos para comer y beber representando la principal fuente de transmisión de FeLV. Se han contabilizado hasta  $10^6$  partículas infecciosas de FeLV por mililitro de saliva (Rojko, *et al.*, 1984; Jarret, 1999; Arjona *et al.*, 2000; Gomes-Keller *et al.*, 2005; Dunham, *et al.*, 2008; Tizard, 2009).

Cuando los gatos se exponen naturalmente, tan solo el 70% de ellos se infectan, de los cuales alrededor del 60% desencadenan una respuesta inmune y el 40% presentan viremia;

de estos gatos virémicos el 10% se curan espontáneamente, mientras que el 90% permanecen infectados de por vida. De los gatos virémicos persistentes, solo alrededor del 15% desarrollan vida normal asintomática (Tizard, 2009).

### **1.5.PATOGÉNESIS.**

Dependiendo del modo de transmisión se reconocen 4 formas de infección:

- A. Infección aguda.
- B. Viremia persistente.
- C. Inmunidad (infección latente o fin de la infección).
- D. Infección atípica (localizada, restringida). (Lutz, *et al*, 1980; Sparkes, 1997).

#### **1.5.1. Infección aguda.**

En la mayoría de los gatos, la infección aguda se debe a la exposición oro-nasal. El virus se replica inicialmente en células mononucleares (linfocitos, macrófagos) de las tonsilas faríngeas y otros tejidos linfoides regionales (Haffer, *et al.*, 1987). Alrededor de los 14 días post-infección en las células blanco (linfocitos y monocitos) se replica el virus abundantemente y se desarrolla la viremia que permite la propagación viral a tejidos linforreticulares distantes, células de división rápida del epitelio intestinal y sobre todo a la médula ósea (Lutz, *et al.*, 1987; Sparkes, 1997).

#### **1.5.2. Viremia persistente.**

La infección hemolinfática (médula ósea), se establece generalmente entre 2 y 6 semanas después de la exposición. En esta etapa si no hay una respuesta inmune adecuada no se puede contener la infección y existe la posibilidad de una producción masiva de virus que abruma al sistema y de esta manera se establece la viremia persistente. Hay difusión de la infección a múltiples tejidos glandulares y epiteliales, incluyendo las glándulas salivales y la mucosa de la faringe y nariz, en este estado se da la eliminación oronasal del virus y, por tanto, aumenta la posibilidad de transmisión (Lutz, 1990; Sparkes, 1997).

### **1.5.3. Inmunidad (infección latente o fin de la infección).**

Si se presenta la infección con FeLV y hay una respuesta inmune adecuada generalmente se restringe la replicación y expresión del virus en un plazo de 4 a 8 semanas posterior a la infección. Algunos autores sugieren que esta forma de infección es la más frecuente por el FeLV (Suntz *et al.*, 2010).

En la mayoría de los gatos se desarrolla inmunidad antes o durante la infección de médula ósea y no desarrollan viremia asociada a este tejido linfoide. Por otro lado, en una pequeña proporción de gatos la inmunidad protectora no se desarrolla hasta poco después de que la viremia se establece en la médula y se presenta un período de viremia transitoria que por lo general dura sólo unos días o semanas. Las células de la médula ósea, los linfocitos T y los macrófagos fueron identificadas como células blanco para las infecciones latentes. (Lutz, *et al.*, 1980; Ogilvie, *et al.*, 1988; Sparkes, 1997; Suntz, *et al.*, 2010).

Los gatos inmunes son los que han eliminado por completo todas las células infectadas por el virus, pero en una proporción sustancial de gatos inmunes (tal vez 30 a 70 %) la infección latente persiste en forma de provirus integrado en el genoma de ciertas células. Estas células (por lo general en la médula ósea) no expresan FeLV, pero aún tienen el potencial para reactivar una infección activa si el gato es inmunodeprimido (Haffer, *et al.*, 1987; Suntz, *et al.*, 2010). El período de latencia varía entre los individuos, puede durar de semanas a meses, pero a veces está presente por años o incluso toda la vida del gato (Sparkes, 1997).

### **1.5.4. Infección atípica.**

Una pequeña proporción (menos del 5 al 10%) de los gatos infectados por FeLV presentan una infección restringida parcialmente en varios tejidos, por una respuesta inmune protectora. Estos gatos pueden presentar intermitente viremia y con el tiempo es probable que se presente una viremia persistente o que el progreso infeccioso sea extinguido totalmente (Sparkes, 1997).

## **1.6. RESPUESTA INMUNE.**

### **1.6.1. Inmunidad humoral.**

Muchas investigaciones de la respuesta inmune protectora se han centrado en la importancia de los anticuerpos virus neutralizantes (AVN) y anticuerpos anti-FOCMA (anticuerpos de células de membrana antigénica asociadas a oncornavirus) (Sparkes, 1997).

#### **1.6.1.1. Anticuerpos Virus Neutralizantes**

El FeLV infecta a las células a través de la unión de la glicoproteína de envoltura (gp70) a receptores específicos de células y a p15E. Los AVN son dirigidos contra epítopes de esta glicoproteína que cuando se unen al virus evitan la fijación de éste y la entrada a la célula blanco, además de ayudar a eliminar el virus de la sangre (Sparkes, 1997; Porras, *et al.*, 2007; Dunham, *et al.*, 2008). También se producen anticuerpos frente a otros antígenos, como la proteína de la cápside p27 (Porras *et al.*, 2007).

En los gatos que de forma natural y experimentalmente han sido expuestos al virus, la viremia persistente es casi siempre asociada con muy bajos o nulos títulos de AVN, mientras que un título alto de anticuerpos han sido encontrados en gatos expuestos y que lograron resistir a la infección o a la viremia transitoria (Lutz, *et al.*, 1980).

Por otra parte es importante para la vacunación la transferencia pasiva de AVN (ya sea artificial o natural a través de calostro a los gatitos). También se ha demostrado que funcionan para proteger contra la viremia tras posteriores desafíos con FeLV (Sparkes, 1997; Dunham, *et al.*, 2008) ya que la infección prenatal o temprana de los gatitos con FeLV también puede provocar viremia persistente (Tizard, 2009).

#### **1.6.1.2. FOCMA y los anticuerpos anti-FOCMA.**

Los genes de retrovirus endógenos del genoma felino codifican FOCMA (Feline oncornavirus cell membrane antigen o antígeno de membrana de células infectadas por oncornavirus felino) que destruye las células neoplásicas mediante la lisis dependiente del complemento (Porras *et al.*, 2007). Pero no se expresa en las células normales ya que es un antígeno expresado solo en la superficie de las células transformadas por el FeLV (Sparkes, 1997; Tizard, 2009).



Hay una cierta reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-FOCMA y anticuerpos contra la proteína gp70 del FeLV subgrupo C. El desarrollo de anticuerpos anti-FOCMA confiere una protección contra el desarrollo de la enfermedad neoplásica relacionada con FeLV. Gatos que desarrollan linfoma o leucemia tienen un bajo o nulo título de anticuerpos anti-FOCMA, mientras que títulos elevados se asocian con la protección contra el desarrollo de estas neoplasias. La administración pasiva de anticuerpos anti FOCMA puede resultar en la regresión de los linfomas establecidos (Sparkes, 1997). Por desgracia, los anticuerpos frente a FOCMA no confieren protección frente a las enfermedades degenerativas inducidas por el FeLV, y los gatos virémicos que no sintetizan anticuerpos anti-FOCMA son totalmente susceptibles a todos los síndromes de FeLV, incluyendo linfosarcoma. Algunas células de linfosarcoma pueden expresar FOCMA en ausencia de infección por FeLV detectable (Tizard, 2009).

Un análisis más detallado de la respuesta de anticuerpos revela que prácticamente la totalidad de la actividad está dirigida a las proteínas de envoltura del virus. No hay respuesta a las proteínas codificadas por el gen *gag* por lo que los gatos que se recuperan de la infección por FeLV forman una fuerte respuesta inmunológica a anticuerpos contra gp70, p15E y p12, las proteínas de transmembrana codificadas por el gen *env* y en menor medida hacia las codificadas por *gag* (Jarret, 1999).

### **1.6.2. Inmunidad celular.**

#### **1.6.2.1. *Anticuerpos contra otros antígenos virales e inmunidad mediada por células (IMC).***

Investigadores han encontrado que los gatos infectados por el FeLV pueden desarrollar anticuerpos para una amplia gama de proteínas del FeLV como las de envoltura (p15E, gp70), antígenos de núcleo (p10, p12, p15, p27) y la transcriptasa inversa del FeLV (Lutz, 1990). La respuesta de anticuerpos a estas proteínas tienden a ser mayores en los gatos que se resisten a la evolución de la viremia persistente, pero el patrón (rango) de los anticuerpos producido es similar tanto en viremia persistente como en gatos inmunes (recuperados) (Sparkes, 1997).

El papel potencial de la IMC a la infección por el FeLV ha sido en gran parte inexplorado. Los estudios han documentado respuestas con células asesinas naturales hacia células transformadas por FeLV. Se ha especulado del papel potencial que puede tener la IMC en las respuestas de protección a la infección. Aunque el desarrollo de AVN en un gato infectado puede evitar la propagación de la infección a las células susceptibles, la eliminación de las células ya infectadas con el virus ocurre por otros medios como la lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos o, muy probablemente, la misma respuesta de la IMC (Sparkes, 1997).

Se ha descrito que aparecen linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos una o dos semanas después de que se produzca la infección, y previo a la aparición de anticuerpos neutralizantes. En los gatos infectados por FeLV la presencia de anticuerpos, y sobre todo, el desarrollo eficaz de la respuesta inmune celular son capaces de eliminar totalmente el virus en muchos animales al comienzo de la exposición (Porras *et al.*, 2007).

#### **1.6.2.2. Citocinas.**

El IFN- $\alpha$  (glicoproteína con efecto antiviral) y el IFN- $\gamma$  (activador de macrófagos e inmunomodulador) tiene una acción directa aumentando la respuesta inmune e impide la replicación viral de células ya infectadas. El IFN- $\alpha$  también puede tener efectos directos sobre la expresión viral (Linenberger, *et al*, 1999; Porras *et al*, 2007).

#### **1.6.2.3. Consecuencias en linfocitos T.**

Como resultado de las mutaciones en los genes que codifican las proteínas de la envoltura del virus, el FeLV puede evolucionar hacia variantes con tropismo por los linfocitos T. Las variantes virales que inducen inmunodeficiencia pueden replicarse en los linfocitos T hasta alcanzar números elevados de partículas virales; penetran en ellos al unirse a 2 receptores, uno de los cuales es una proteína transportadora de fosfato (Pit1) y el otro es una proteína nueva de la superficie celular denominada FeLIX (FeLV infectivity X-essory protein; proteína accesoria de infectividad del FeLV). La linfopenia en los gatos infectados por FeLV es debida a la pérdida de linfocitos T CD4<sup>+</sup> aunque los recuentos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> también pueden disminuir en las etapas iniciales de la enfermedad, de forma que el cociente CD4/CD8 puede permanecer en un rango normal (el cociente CD4/CD8 en los

gatos normales oscila entre 0.4 y 3.5, con una media de 1.9) (Dunham, *et al*, 2008). No obstante, a medida que los recuentos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se recuperan, el cociente CD4/CD8 puede disminuir. Los recuentos de linfocitos B también pueden estar deprimidos, pero esto depende de la gravedad de las infecciones secundarias. Los gatitos infectados por FeLV desarrollan un síndrome de desgaste cuya consecuencia es atrofia tímica e infecciones recurrentes. Dependiendo de la gravedad de las infecciones secundarias, puede estar asociado bien a atrofia linfoide o hiperplasia linfoide. En los gatos sin infección secundaria, la atrofia linfoide se asocia con la pérdida de células de las áreas paracorticales de los nódulos linfáticos. Los cambios que se observan en los bazo de estos animales son menos marcados, pero pueden derivar en la reducción total de la pulpa blanca. Como resultado de la pérdida de linfocitos T en los gatos infectados por FeLV, la inmunidad mediada por células está deprimida, posiblemente por los efectos de la proteína inmunosupresora de la envoltura vírica p15e que se produce en cantidades muy elevadas en las células moribundas ya que ésta proteína suprime la respuesta de los gatos a FOCMA, así como a los mitógenos (inductores de la proliferación de linfocitos B/T) de los linfocitos y bloquea la respuesta de los linfocitos T a la IL-1 y a la IL-2 (Rojko, *et al*, 1984). Los leucocitos de los gatos infectados por FeLV producen cantidades de IL-2 significativamente inferiores que los gatos normales, un efecto especialmente marcado en gatos con leucemia o linfosarcoma en el timo. Esta inmunosupresión predispone también a los gatos virémicos a enfermedades secundarias, como la peritonitis infecciosa felina, micoplasmosis, toxoplasmosis, septicemia e infecciones fúngicas. Las células madre de la médula ósea también se inhiben por p15e, lo que impide la producción de células eritroides y origina una anemia no regenerativa (Ogilvie, *et al*, 1988; Tizard, 2009).

#### **1.6.2.4. Consecuencias en linfocitos B.**

A diferencia de la disfunción grave de los linfocitos T, la actividad de los linfocitos B en gatos infectados por FeLV apenas se ve afectada. Puede haber disminución de la respuesta inmune a dosis bajas de antígeno, así como síntesis reducida de IgM, pero las concentraciones normales de IgG permanecen normales. Dado que la función de los linfocitos B y la síntesis de anticuerpos son relativamente normales en los gatos crónicamente infectados, se producen grandes cantidades de anticuerpos contra el virus, los

cuales se combinan con los viriones circulantes o con las proteínas solubles para formar complejos inmunes, éstos se depositan en los glomérulos renales y provocan glomerulonefritis membranoproliferativa grave por acción mecánica que finalmente causa la hipoproteinemia, el edema, la uremia y la muerte que se observan en la infección por FeLV. Los antígenos víricos unidos a los eritrocitos también pueden originar anemia hemolítica positiva a la antiglobulina. Los complejos inmunes también activan al complemento por la vía clásica, que puede consumirse en grandes cantidades, por lo que los gatos infectados por FeLV pueden tener niveles de complemento extraordinariamente bajos. Ésta pérdida puede reducir la resistencia a tumores, ya que el suero de los gatos normales infundido a gatos leucémicos puede producir la regresión del tumor (Tizard, 2009).

### **1.7. SIGNOS CLÍNICOS.**

Los signos clínicos asociados al FeLV incluyen una variedad de enfermedades neoplásicas como linfoma, leucemia y trastornos mieloproliferativos; y no neoplásicas como anemia, leucopenia, trombocitopenia, alteraciones neurológicas, fallas en la reproducción en gatas como son infertilidad, reabsorción fetal, abortos y gatitos virémicos que mueren dentro de las dos primeras semanas de vida y una variedad de infecciones secundarias causadas por inmunosupresión (Lutz, *et al.*, 1987; Lineneberg, *et al.*, 1999; Tique, *et al.*, 2009; Suntz, *et al.*, 2010).

La signología de la enfermedad raramente es detectada durante la primera fase de la infección, cuando la viremia comienza. En los gatos persistentemente infectados son más evidentes las enfermedades oportunistas asociadas con el FeLV como son los diferentes tipos de linfosarcomas (tímico o mediastínico, multicéntrico, alimentario, cutáneo, ocular, renal y de sistema nervioso), leucemia mieloide, anemia no regenerativa, inmunosupresión, desordenes neurológicos. También puede presentarse el síndrome mielodisplásico o preleucemia que cursa con una anemia no regenerativa que puede asociarse a trombocitopenia ó a falta de granulocitos ya que la médula presenta una falta de maduración de una o varias líneas celulares por lo que el gato muere por la anemia ó por infecciones asociadas a ésta y finalmente evoluciona a leucemia verdadera. (Egberink, *et al.*, 1992; Lutz, 1990; Dunham, *et al.*, 2008).

Los fenómenos inmunopatológicos como la glomerulonefritis o poliartritis se presentan en las infecciones por el FeLV exógeno, como también algunas enfermedades poco frecuentes pero específicamente definidas como es un síndrome parecido a panleucopenia, enteritis, dermatosis, osteopetrosis y exostosis (Suntz, *et al.*, 2010).

Se ha determinado que una tercera parte de las muertes por cáncer en gatos están asociadas al FeLV y un gran número de animales infectados mueren por anemia y enfermedades infecciosas oportunistas por los efectos inmunosupresivos del virus en la médula ósea como se muestra en la Tabla 1 (Ogilvie, *et al.*, 1988; Hartman, 2006).

**Tabla 1. Enfermedades y condiciones reportadas en gatos con infección latente o activa de FeLV.**

<b>Referencia</b>	<b>Enfermedad o condición</b>
Pacitti y Jarret (1885)	Piometra
Swenson <i>et al.</i> (1990)	Alta incidencia de enfermedad en tracto respiratorio alto.
Swenson <i>et al.</i> (1987)	Neutropenia
Jackson <i>et al.</i> (1996)	
Francis <i>et al.</i> (1980)	Linfosarcoma/ leucemia
Hardy <i>et al.</i> (1980)	
Francis <i>et al.</i> (1981)	
Jackson <i>et al.</i> (1993)	
Tobey <i>et al.</i> (1994)	
McClellan <i>et al.</i> (1980)	Alto rango de mortalidad.
Pedersen <i>et al.</i> (1984)	Variedad de enfermedades/condiciones.
Uthmann <i>et al.</i> (1996)	Gingivitis crónica.

(Adaptado de Stuntz, *et al.*, 2010)

## 1.8. DIAGNÓSTICO

La prueba de ELISA usando anticuerpos monoclonales, hasta hace algunos años, fue considerada la más sensitiva para el diagnóstico de FeLV. Con esta prueba es posible detectar la p27 no solo en suero y plasma, sino también en saliva de gatos infectados (Lutz, 1990). En México algunos laboratorios particulares realizan el diagnóstico para FeLV pero se desconocen los datos de sensibilidad y especificidad así como la prueba que realizan.

La viremia por FeLV actualmente se puede detectar mediante una variante de la prueba de ELISA o por el uso de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta de proteínas FeLV presente en los leucocitos y plaquetas en frotis hecho de sangre periférica o por inmunocromatografía rápida usando muestras de sangre. Algunas de éstas pruebas pueden detectar la infección antes del desarrollo de la viremia, ya que la corriente sanguínea distribuye antígenos solubles del virus originados en la médula ósea. Todos estos procedimientos requieren una muestra de sangre que normalmente se recoge por punción venosa (Lutz, *et al.*, 1987; Dunham, *et al.*, 2008; Tizard, 2009).

En una gran proporción de gatos, hay una respuesta inmune efectiva inmediatamente después de la infección, y estos gatos no se convertirán en positivos perceptibles en la prueba de p27 (Gomes-Keller *et al.*, 2005).

La saliva se ha utilizado como sustrato para la detección de diversas enfermedades sistémicas. La toma de muestras de saliva para el diagnóstico en el gato es bien aceptado por el propietario en función de su escasa agresividad (Lutz, *et al.*, 1987). Además, no se requiere personal capacitado para la recolección de muestras, y la saliva se puede obtener fácilmente de los gatitos muy jóvenes y pacientes difíciles con un mínimo esfuerzo (Gomes-Keller *et al.*, 2005).

Existen Kits comerciales cuya base es la prueba de ELISA e Inmunocromatografía como lo muestra la tabla 2 en la que se muestran algunas especificaciones de éstas. Solo las pruebas de IDEXX están de venta en México.

**Tabla 2. Comparación de sensibilidad y especificidad de diferentes Kits comerciales para la detección de FeLV.**

Test	Witness	Snap Combo Plus	Fastest	Duo Speed	Virachek FeLV	PetChek FeLV	One-Step	Mapic FeLV
Detecta	Ag p27	Ag p27	Ag p27	Ag p27	Ag p27	Ag p27	Ag p27	Ag p27
Laboratorio	Synbiotics	IDEXX	MegaCor	Bio Veto Test	Synbiotics	IDEXX	Biotech	EVL
País	USA	USA	Alemania	Francia	USA	USA	USA	Países bajos
Sensibilidad (%)	92.1	92.3	94.7	94.7	94.9	92.1	nd	96.8
95% IC	79.7-97.3	79.7-97.3	82.7-98.5	87.2-98.5	83.1-98.6	79.2-97.3	nd	83.9-100
Especificidad (%)	97.5	97.3	98.8	99.2	98.4	99.8	nd	95.4
95% IC	95.7-98.6	95.5-98.4	97.3-99.4	97.9-99.7	96.8-99.2	97.3-99.4	nd	93.2-96.8
Valor predictivo positivo	74.5	73.5	85.7	90.0	82.2	85.4	nd	62.0
Valor predictivo negativo	99.4	99.4	99.6	99.6	99.6	99.4	nd	99.7

IC=intervalo de confianza. nd=no determinado (Adaptado de Hartmann, 2007)

Para la detección de infecciones no activas con técnicas moleculares, debe ser demostrado el provirus en el genoma del huésped exógenamente adquirido, en ausencia de producción de proteínas virales y/o anticuerpos (Suntz, *et al.*, 2010).

El aislamiento viral y el PCR son consideradas las pruebas de oro para el diagnóstico de FeLV (Dunham, *et al.*, 2008) pero a nivel investigación se realizan particularmente Inmunohistoquímica para detectar antígenos virales en un tejido fresco o congelado, Western blot para la identificación de las proteínas del virus y pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección del ácido nucleico vírico o secuencias provirales. (Mastro, *et al.*, 1986; Osterhaus, *et al.*, 1989; Marion, *et al.*, 1993; Fujino, *et al.*, 2004; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2001; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2006; Tizard, 2009).

## 1.9. PREVENCIÓN Y CONTROL.

### 1.9.1. Vacunación.

La vacunación contra el FeLV es un tema controversial, en parte, por las diferencias entre sus formulaciones, debido a la competencia entre fabricantes por la mejor vacuna y por otro lado, porque los ensayos experimentales han demostrado que ninguna de las

vacunas proporciona el 100% de protección contra la infección (Sparkes, 1997). La vacunación ha demostrado reducir la tasa de infecciones activas pero no es eficiente para prevenir la infección latente por el FeLV (Suntz, *et al.*, 2010)

El tipo de vacuna más reciente para el FeLV es un producto recombinante que utiliza como vector el *canarypox*. La vacunación generalizada ha reducido significativamente la prevalencia de esta enfermedad en Estados Unidos (Hoffmann-Lehmann, *et al.*, 2006; Dunham, *et al.*, 2008; Tizard, 2009).

### 1.9.2. Los subgrupos y la vacunación.

De las 3 vacunas comerciales (Tabla 3), una (Leucogen del laboratorio Virbac) contiene antígenos derivados del FeLV subgrupo A solamente y el resto contienen mezclas de FeLV-A con B o con C.

La protección se da principalmente a través de la inducción de AVN contra FeLV-A, por tanto, es todo lo que se requiere de una vacuna. También se ha confirmado en 2 estudios diferentes, que los gatos inmunizados con Leucogen o un prototipo de esta vacuna que sólo contenían el FeLV-A, mostraron ser igualmente protegidos contra el desafío hecho con una mezcla de los FeLV-A y B (Sparkes, 1997).

**Tabla 3. Vacunas comerciales disponibles en México.**

Vacuna	Distribuidor	Tipo de vacuna	Subgrupos de FeLV incluidos
<b>Leucogen</b>	<b>Virbac</b>	Producida por ingeniería genética, no glicosilada, adyuvada con Quil A e Hidróxido de Aluminio	Subgrupo A
<b>FEL-O-VAX LV-K.</b>	<b>Fort Dodge</b>	Virus de FeL inactivado con un sistema de adyuvantes múltiples. Virus completo	Subgrupos A y B
<b>Leukocell 2</b>	<b>Pfizer</b>	Cultivo múltiple de antígenos de virus inactivado químicamente	Subgrupos A, B y C; antígeno FOCMA.

(Adaptado de Sparkes, 1997).



### **1.9.3. Anticuerpos neutralizantes del virus y la vacunación.**

Aunque la IMC y la inducción de anticuerpos contra otras proteínas virales pueden desempeñar un papel secundario en la protección de los gatos, es la inducción de AVN lo que es necesario para prevenir la viremia por lo que se les considera de primordial importancia en la vacunación (Sparkes, 1997).

### **1.9.4. Importancia del antígeno FOCMA en las vacunas.**

Si una vacuna protege contra la infección por el FeLV, se entiende que también protegerá al gato de la aparición de enfermedades relacionadas con el FeLV y no hay pruebas que la inclusión de FOCMA tenga algún papel en la protección de los gatos contra la infección (Sparkes, 1997).

### **1.9.5. Gatos infectados.**

El riesgo de enfermedad entre gatos caseros infectados y no infectados que conviven, no es muy alto, porque los gatos que han convivido con los gatos positivos a FeLV ya han sido infectados y son más propensos a ser inmunes a nuevas infecciones (Hartman, 2006).

### **1.9.6. Terapia antiviral.**

Se han probado muchos tratamientos antivirales o inmunomoduladores tanto para la infección por FeLV como para cualquier otra enfermedad infecciosa, pero desafortunadamente estos son caros y difíciles de administrar. Algunos de estos son: Zidovudina (AZT), Dianosina (ddI), Zalcitabidina (ddC), Ribavirina (RCTA) y Foscarnet (PFA) (Hartman, 2006).

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Estandarizar una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina.

### **2.1.OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Obtener sueros de gatos de una población heterogénea que incluyan diferentes procedencias, edades, sexos y estados serológicos contra el virus de la Leucemia Viral Felina.
- b) Establecer animales clínicamente infectados de Leucemia Viral Felina y animales clínicamente sanos contra la infección para ser usados como controles.
- c) Estandarizar una prueba de ELISA indirecta de tipo cuantitativa.
- d) Estandarizar la prueba de Western blot para comparar los resultados que se obtengan de la evaluación de los mismos en el ELISA indirecto.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Colección de muestras.**

Se colectaron un total de 89 muestras de sangre obtenidas de gatos de diferentes procedencias, edades y sexos (Apéndice 1, tabla 12); de éstas muestras se escogieron 4 sueros para ser usados como controles (2 muestras control positivo y 2 control negativo) que fueron evaluados previamente a la enfermedad con las técnicas desarrolladas en éste trabajo. La sangre se obtuvo por venipunción de vena cefálica en gatos mayores de 1 año y en menores de un año por vena yugular. El suero fue separado de la sangre por centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos y fue conservado a -20° C hasta su uso.

#### **3.2. Antígenos vacunales.**

El antígeno que se utilizó en los diferentes ensayos fue seleccionado a partir de una evaluación previa de tres vacunas comerciales disponibles en el mercado en el momento de desarrollar este trabajo (Tabla 3). Las vacunas se centrifugaron a 2000 rpm por un minuto para obtener dos fases, sobrenadante y fondo.

#### **3.3. Determinación del perfil proteico de tres antígenos vacunales.**

Se realizó una comparación del perfil proteico y concentración de los antígenos contenidos en las tres vacunas comerciales utilizadas, realizando electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). Para esto, el antígeno (12.5µl) se mezcló con 6.25 µl de buffer de lisis (Apéndice 2, D) y 6.25 µl de buffer de muestra (Apéndice 2, E). El gel de electroforesis inferior se preparó al 12% (gel separador, Apéndice 2, I) y el superior al 4% (gel concentrador, Apéndice 2, H) ambos geles se dejaron polimerizar y enseguida se preparó la cámara de electroforesis la cual contenía buffer de corrida 1x (Apéndice 2, F). Posteriormente las muestras preparadas con buffer de lisis y de muestra (25 µl totales) fueron colocadas en los diferentes carriles y las proteínas fueron separadas con una corriente constante de 100 volts. El gel fue teñido con Azul de Coomassie (Biorad®) durante media hora en agitación y finalmente se cambió la solución por una mezcla desteñidora (Apéndice 2, G) por un tiempo de 3 horas en agitación.

### **3.4. Inmunoelectrotransferencia (Western blot).**

Con el análisis efectuado previamente con los antígenos vacunales se seleccionó el proveniente de la vacuna FEL-O-VAX y se preparó con buffer de lisis y buffer de muestra como fue descrito anteriormente. Las proteínas virales fueron separadas por PAGE-SDS a 100 volts constantes. Posteriormente el gel fue lavado con buffer de transferencia (Apéndice 3, B) y se realizó la transferencia activa. Para ello se preparó un “sándwich” donde cada componente previamente humedecido en buffer de transferencia se colocó en el siguiente orden: fibra del cassette, 3 hojas de papel filtro, 1 hoja de nitrocelulosa de 0.22 nm de diámetro y el gel de poliacrilamida. Enseguida se completó el sándwich colocando los componentes antes citados pero en orden inverso (3 hojas de papel filtro y fibra). La transferencia se realizó a 0.20 amperes por una hora y 20 minutos. Después de transferidas las proteínas, la nitrocelulosa se bloqueó con PBS más leche al 3% (Apéndice 3, E) por 1 hora a 37° C. Al finalizar la incubación se lavó 3 veces en agitación por 5 minutos con buffer de lavado (Apéndice 3, D) y se dejó secar. Una vez seca se cortó en tiras de 3 milímetros que se colocaron en carriles para procesarse por separado. A continuación se colocó el primer anticuerpo (suero problema) diluido en buffer de dilución (Apéndice 3, F) y se incubó por una hora a 37° C. Nuevamente se lavó como se describió anteriormente y luego se adicionó el conjugado (cabra anti IgG de gato peroxidado) diluido 1:1000 y se incubó por una hora a 37° C y posteriormente se realizaron los lavados. Finalmente se reveló la membrana con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno al 0.5% (Apéndice 3, G).

### **3.5. Determinación de proteína por el método de Bradford (Micrométodo).**

Se preparó una solución estándar de  $\gamma$  globulina bovina a una concentración de 1 mg/ml para utilizarse como muestra patrón. Las diluciones realizadas en la muestra patrón se describen en la Tabla 4.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se depositaron 20  $\mu$ l de la dilución de la muestra patrón correspondiente y se agregaron 180  $\mu$ l del reactivo Bradford® (diluido 1:5 y filtrado) a cada pozo. Se prepararon las muestras por duplicado.

Para la muestra problema (vacuna) se realizaron 2 diluciones: 1:10 (5 µl de proteína problema y 45 µl de solución salina) y 1:25 (2 µl de proteína problema y 48 µl de solución salina) y posteriormente se colocaron 150 µl de reactivo Bradford® diluido y filtrado.

La lectura de la placa se realizó a 595 nm, con esta lectura se graficó la curva y se obtuvo el valor de r por regresión lineal. Se interpoló la lectura de la proteína problema y con ello la concentración en mg/ml de proteína.

**Tabla 4. Preparación de muestras para la determinación de proteínas por el método de Bradford.**

Tubo	µl de agua inyectable	µl de γ globulina	Concentración en µg/ µl
A	60	0	0
B	57	3	1.52
C	54	6	3.04
D	48	12	6.08
E	36	24	12.16
F	20	40	20.26

### 3.6. Estandarización de la técnica de ELISA indirecta.

Se estandarizó la técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra el FeLV realizando diferentes aproximaciones, variando la concentración de antígeno, anticuerpo primario y conjugado. Se realizaron y valoraron diferentes variables para determinar las condiciones óptimas de la prueba las cuales se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Estandarización de la técnica de ELISA indirecta para el FeLV.**

Parámetro evaluado	µg/µl de proteína	Solución de Bloqueo	Dilución de suero	Dilución de Conjugado
Valores evaluados	1	PBS T + Albúmina 2%	1:10	1:3,000
	3	PBS T + Albúmina 5%	1.20	1:5,000
	5	PBS + Leche descremada 3%	1:40	1:10,000
	10	PBS + Leche descremada 3% + 1:10 Suero de cerdo	1.80	1:40,000
	13	PBS + Leche descremada 3% + 1:20 Suero de cerdo		
	18			
	23			

Las condiciones finales del ELISA fueron las siguientes:

Se sensibilizaron placas Nunc F Maxisorp® de 96 pozos con 50 µl de antígeno del virus del Leucemia Viral Felina a una concentración de 1µg/µl de proteína/pozo, disuelto en buffer del antígeno (Apéndice 4, A) y se incubó a 4° C por 48 horas. Posteriormente se realizaron 4 lavados con buffer de lavado (Apéndice 4, B) utilizando 200 µl/pozo para enseguida bloquearse con 150 µl/pozo de buffer de bloqueo (Apéndice 4, E) por 1 hora a 37° C. Al termino de la incubación se realizaron 4 lavados y posteriormente se colocaron 100 µl/pozo de suero problema previamente diluido a 1:10, 1:20,1:40 y 1:80 (con la finalidad de cuantificar el titulo de anticuerpos) en buffer de dilución (Apéndice 4, D) por duplicado y se incubaron por 1 hora a 37° C. Se realizaron nuevamente 4 lavados y se colocó 100 µl/pozo de conjugado (cabra anti IgG de gato peroxidado) diluido 1:10,000 y fue incubado por una hora a 37° C. Finalmente la placa se lavó 4 veces y se le adicionó 50 µl/pozo de sustrato (Apéndice 4, I) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para detener la reacción se utilizaron 50 µl/pozo de solución de paro (Apéndice 4, H). La lectura de la densidad óptica se realizó con un espectrofotómetro a 492 nm. Se usaron como controles un suero positivo y negativo previamente evaluado en Western blot. La línea de corte de la prueba se estableció a partir del promedio de la densidad óptica de los sueros negativos a WB más dos desviaciones estándar. De manera que el valor de la densidad óptica de cada suero se dividió entre la línea de corte para determinar su valor final.

### **3.7. Análisis estadístico.**

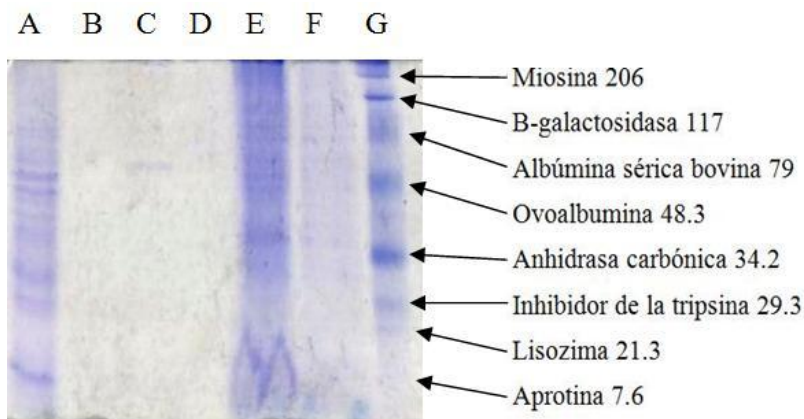
El análisis estadístico utilizado para comparar los resultados obtenidos fue con la prueba de  $\chi^2$  y la prueba de Fisher's, utilizando el programa GraphPad InStat®.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil proteico de tres vacunas comerciales.

Los resultados obtenidos del análisis electroforético realizado en tres vacunas comerciales se muestran en la Figura 2. Se procesaron dos porciones de cada vacuna, obtenidas después de centrifugarse, la primera se denominó **sobrenadante** y la segunda **fondo** (pellet).

**Figura 2. Electroforesis de tres antígenos vacunales.**



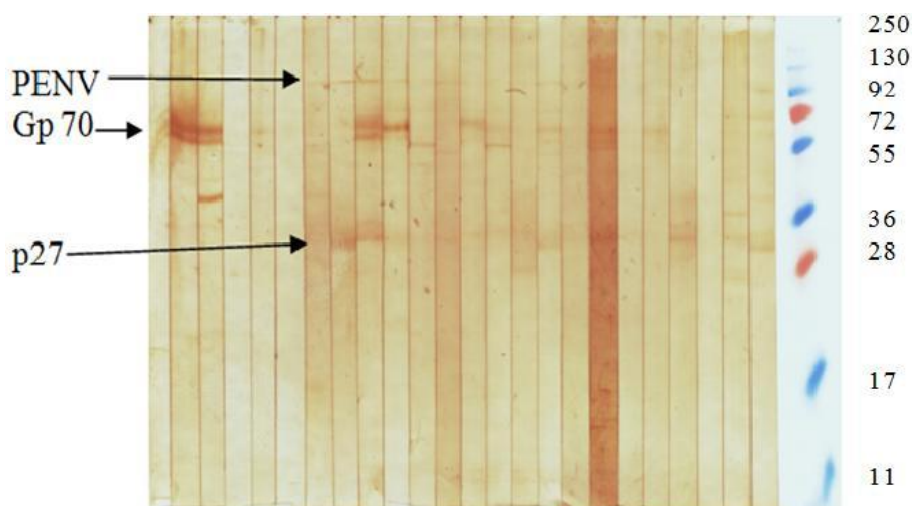
A.- Leukocell fondo, B.- Leukocell sobrenadante, C.- Leucogen fondo, D.- Leucogen sobrenadante, E.- Fel-O-Vax fondo, F.- Fel-O-Vax sobrenadante y G.- Marcador de peso molecular.

La mayor detección de bandas proteicas fueron identificadas en las muestras de los carriles A, E y F, sin embargo en la vacuna Leukocell (Carril A) se identificaron muchas proteínas que no estaban relacionadas con el FeLV y que además no se observaron en la porción del sobrenadante (Carril B), por lo cual, es probable que estas proteínas fueran de algún componente de acompañamiento de la vacuna. Por otro lado, la vacuna Fel-O-Vax (Carriles E y F) mostro un patrón de proteínas muy similar, tanto en el fondo como en el sobrenadante, y una adecuada concentración de las mismas, además se identificaron proteínas coincidentes con las descritas para el FeLV. Con esta información se decidió utilizar el antígeno de la vacuna FEL-O-Vax para la estandarización de las pruebas serológicas utilizadas en este trabajo.

#### 4.2. Resultados Western blot.

Los resultados obtenidos para los 85 sueros de gatos estudiados por Western blot, mostraron que contenían anticuerpos específicos para dos proteínas virales principales, codificadas por dos genes diferentes; la **proteína de envoltura gp70** y la **proteína de cápside p27** (Figura 3).

**Figura 3. Resultados del análisis de un grupo de sueros representativos de gatos por WB.**



Reconocimiento de proteínas virales de Leucemia por sueros de gatos. pENV (precursor de ENV), Gp70 (glicoproteína de envoltura), p27 (proteína de cápside) y marcadores de peso molecular.

#### 4.3. Resultados de la prueba de ELISA indirecta.

La evaluación de los diferentes parámetros evaluados para la estandarización de la prueba de ELISA indirecta determinó que los más adecuados fueron los que están resaltados en la Tabla 6. Con respecto a las diluciones de sueros empleadas de 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 mostraron ser adecuadas para determinar la concentración de anticuerpos, los cuales disminuían gradualmente en todas las muestras conforme se aumentaba la dilución de la misma.



**Tabla 6. Parámetros evaluados y utilizados en la estandarización de la prueba de ELISA indirecta.**

Parámetro evaluado	µg/µl de proteína	Solución de Bloqueo	Dilución de Suero	Dilución de Conjugado
Valores evaluados	1	PBS T + Albúmina 2%	1:10	1:3,000
	3	PBS T + Albúmina 5%	1.20	1:5,000
	5	PBS + Leche descremada 3%	1:40	1:10,000
	10	PBS + Leche descremada 3% + 1:10 Suero de cerdo	1.80	1:40,000
	13	PBS + Leche descremada 3% + 1:20 Suero de cerdo		
	18			
	23			

#### 4.4. Resultados serológicos totales de la población de gatos estudiada por Western blot y ELISA.

Los resultados obtenidos de la evaluación de 85 sueros de gatos en las pruebas de Western blot y ELISA se muestran en las Tablas 7 y 8 así como en el Apéndice 5, tabla 13. La prueba de Western blot mostró la mayor detección de animales seropositivos a la enfermedad como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7. Resultados de la detección de animales seropositivos y seronegativos en cada prueba utilizada (ELISA indirecta y Western blot) del total de gatos muestreados.**

Prueba	Positivos	% Positivos	Negativos	% Negativos
WB	52	61.1 %	33	38.8 %
ELISA	41	48.2 %	44	51.7 %

**Tabla 8. Comparación de los resultados obtenidos de los sueros de gatos evaluados a Western blot (WB) y ELISA indirecta.**

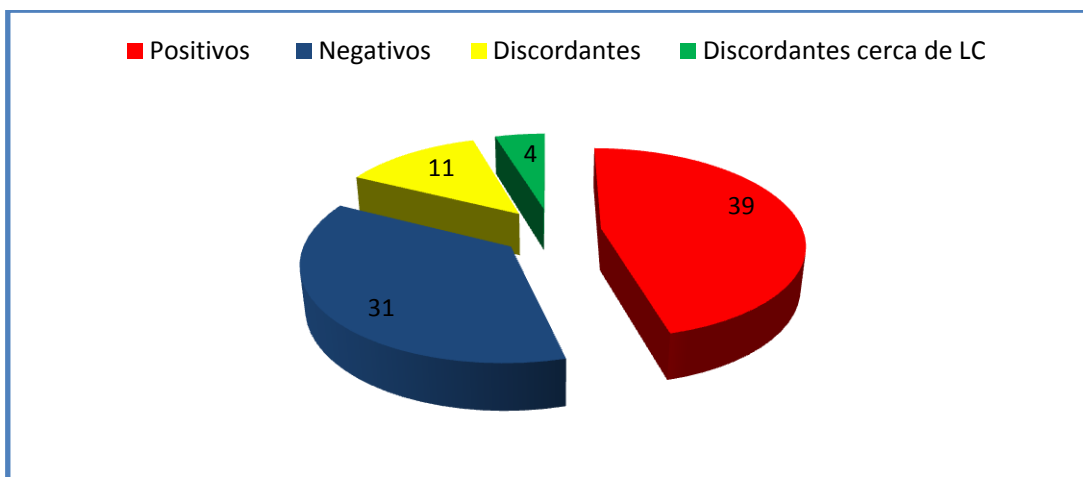
PRUEBAS	NÚMERO DE ANIMALES
WB (+) ELISA (+)	39
WB (-) ELISA (-)	31
WB (+) ELISA (-). Cerca de LC	4
WB (+) ELISA (-)	9
WB (-) ELISA (+)	2
TOTAL	85

(+) positivo, (-) negativo y LC.- línea de corte

#### 4.5. Análisis comparativo de las pruebas.

Los resultados de ambas pruebas se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 4 en donde de los 85 animales que se evaluaron se obtuvieron 39 positivos, 31 negativos, 11 discordantes y 4 discordantes cerca de la línea de corte (LC).

**Figura 4. Resultados de los sueros de gatos evaluados a Western blot (WB) y ELISA indirecta.**



Discordantes: sueros con resultados diferentes en Western blot y ELISA y LC.- línea de corte.

#### 4.6. Análisis de resultados por subgrupos.

Se realizó un análisis pormenorizado de la población de gatos estudiados, solo fueron considerados los que tuvieron resultados concordantes entre las pruebas de ELISA y Western blot (70 gatos) o que el valor obtenido en ELISA fue cercano de la LC (4 gatos), agrupándolos según el sexo, edad y origen de los animales.

##### 4.6.1. Gatos agrupados por sexo.

El análisis de la población de gatos estudiada y agrupada por sexo (Tabla 9) mostró que de los 74 gatos analizados, 38 fueron machos, 32 hembras y 4 se desconoció su sexo. El porcentaje de machos seropositivos resulto mayor que el de las hembras pero al realizar el análisis estadístico se concluyó que la diferencia de porcentaje no fue significativa ( $P=0.1768$ ) lo que implica que los machos y las hembras son igualmente susceptibles a la enfermedad.

**Tabla 9. Gatos seropositivos y seronegativos agrupados por sexo.**

Sexo	% de Positivos	No. Positivos	% Negativos	No. Negativos
Machos	65.8%	25	34.2%	13
Hembras	46.9%	15	53.1%	17

#### **4.6.2. Gatos agrupados por edad.**

El análisis de la población de gatos estudiada y agrupada por edad (Tabla 10) fue dividido en 2 subgrupos, los gatos menores de un año y los mayores de un año. De los 74 gatos que tuvieron muestras concordantes, de 31 de ellos se desconocía la edad, por lo que solo se consideraron 24 gatos mayores de un año y 19 menores de un año. En la Tabla 9 se presenta el porcentaje de seropositivos y seronegativos de los que en el análisis estadístico se obtuvo un valor de  $P=0.7777$ , lo cual implica que la diferencia no fue significativa. Se realizó un segundo análisis con prueba de Fisher's que mostró un valor de  $P= 0.7563$  lo que reconfirmo el valor obtenido previamente con la prueba de  $\chi^2$ .

**Tabla 10. Gatos seropositivos y seronegativos agrupados por edad.**

Edad	% de Positivos	No. Positivos	% de Negativos	No. Negativos
Mayores de un año	45.8%	11	54.2%	13
Menores de un año	36.8%	7	63.2%	12

#### **4.6.3. Gatos agrupados por procedencia.**

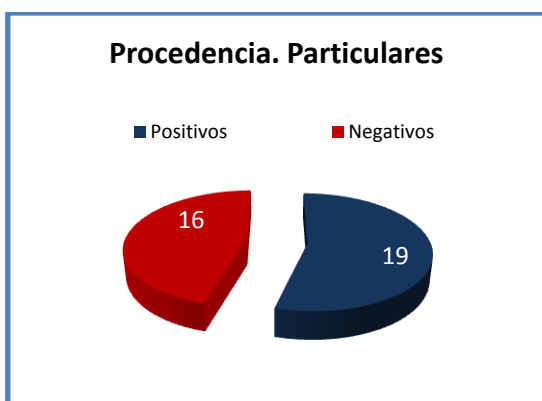
El análisis de la población de gatos estudiada y agrupada por procedencia (Tabla 11 y Figura 5, 6 y 7) fue dividido en 3 subgrupos clasificándose en: gatos de particulares (35 gatos), de clínica veterinaria (20 gatos) y de antirrábico (19 gatos). El análisis estadístico realizado a los subgrupos demostró que no hay una diferencia significativa entre los grupos de particulares, clínica y antirrábico, el valor de  $P$  de los 3 subgrupos fue de 0.9325 y el obtenido por comparación entre los subgrupos fue: entre antirrábico y clínica el valor de  $P=0.6164$ , entre antirrábico y particulares el valor de  $P=0.7366$  y entre particulares/antirrábico/clínica el valor de  $P=0.9931$ . Lo que demostró que ninguno de los subgrupos está correlacionado entre sí.

**Tabla 11. Gatos seropositivos y seronegativos agrupados por procedencia.**

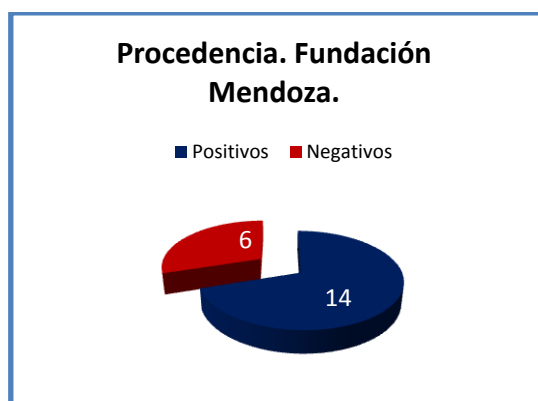
Procedencia	% Positivos	No Positivos	% Negativos	No Negativos
Particulares	54.3%	19	45.7%	16
Clínica	70%	14	30%	6
Antirrábico	52.6%	10	47.4%	9

En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran los resultados de seropositivos y seronegativos agrupados por procedencia de los sueros.

**Figura 5. Procedencia de los gatos. Particulares.**



**Figura 6. Procedencia de los gatos. Clínica.**



**Figura 7. Procedencia de los gatos. Antirrábico.**



## 5. DISCUSIÓN

La leucemia viral felina es una enfermedad que afecta frecuentemente a gatos domésticos y el diagnóstico que se realiza en México particularmente es por medio de kits comerciales basados en pruebas de ELISA y otras pruebas que ofrecen algunos laboratorios particulares de los cuales no están disponibles los datos de sensibilidad y especificidad. Estos indicadores son muy importantes ya que nos dan información de la validez de las pruebas que se utilizan en el diagnóstico de las enfermedades. Estudios relacionados al respecto con leucemia viral felina han sido descritos por López y Cols. en 1989, en dicho estudio evaluaron 7 kits comerciales para reconocer la presencia de anticuerpos contra p27 en suero y determinaron que entre ellos la sensibilidad era muy parecida, sin embargo encontraron una alta variación en la especificidad debido a la presencia de resultados falsos positivos y negativos.

El objetivo del presente trabajo fue proponer alternativas diagnósticas para la detección de la infección ocasionada por el FeLV utilizando como antígeno el disponible en vacunas comerciales y que fue seleccionado por electroforesis, en la cual se demostró que el antígeno vacunal utilizado tenía diversas proteínas del virus y en una mayor concentración, con lo que es posible esperar una mayor detección de anticuerpos como lo comprobó Sparkes en 1997 evaluando vacunas de antígeno completo las cuales generaron una mayor protección en gatos desafiados con el virus y con esta información es posible considerar que una mayor representación de antígenos virales en un test pudiera ayudar a una mayor detección de animales seropositivos.

Los resultados obtenidos en las dos pruebas serológicas realizadas en el presente trabajo (ELISA y WB) mostraron una alta concordancia entre sí (82%), como se muestra en la Gráfica 1 y un 18% de discordancia en donde el 13% (11 gatos) mostraron ser negativos a la prueba de Western Blot y positivos a la prueba de ELISA y 5% (4 gatos) resultaron discordantes cercanos a la LC en la prueba de ELISA los que finalmente fueron clasificados como positivos; el considerarlos así se fundamenta en el hecho de que el nivel de anticuerpos fue cercano al valor de positividad establecido en el ELISA estandarizado y existe la posibilidad de que se presenten resultados falsos negativos en los test ELISA

como lo describió López en 1989, además se obtuvieron resultados positivos en éstas muestras a Western blot (WB+ y ELISA-) y ésta prueba ha demostrado ser altamente específica (Myers-Evert y cols., 2006).

Las discrepancias encontradas en este trabajo entre las pruebas realizadas es relativamente frecuente, ya que se ha descrito en la comparación de otras pruebas como lo corroboró Hardy y Cols. en 1991, quienes realizaron un estudio en el cual compararon resultados discordantes obtenidos entre las pruebas de ELISA e inmunofluorescencia.

La prueba de Western Blot demostró mayor detección de sueros positivos comparada con el ELISA y que según Heberling en 2008, esto se debe a que en éste ensayo las placas son de poliestireno u otros materiales y éstos tienen una baja capacidad para la fijación de proteínas y en el caso de la nitrocelulosa ha demostrado tener una mayor capacidad de unión con el antígeno. No obstante la prueba de ELISA no se debe descartar como una prueba serológica tamiz para el diagnóstico de FeLV (Lutz y cols., 1987).

Akerblom y colaboradores en 1989 utilizaron WB para determinar las proteínas de un virus aislado reconociendo principalmente la gp70, p27 y p15E las cuales describieron que fueron de fácil reconocimiento con anticuerpos monoclonales dirigidos a epitopos neutralizantes. En éste estudio la mayoría de los sueros analizados por WB detectaron la gp70 (proteína de envoltura) y en menor proporción la proteína p27 lo que corrobora la importancia de la producción de anticuerpos contra la gp70 de los sueros de la población de estudio así como ser una proteína inmunodominante que induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Keith 1987; Weijer, 1993). Otros estudios han descrito la importancia de la p27 en pruebas de ELISA utilizando suero y otros fluidos para el diagnóstico de FeLV. Gómez-Lucía en 2006 y Gomes-Keller 2006

Como se describió previamente en el presente trabajo, se realizaron cuatro diluciones de los sueros problema (1:10, 1:20, 1:40 y 1:80) utilizados en la prueba de ELISA; esto tuvo como finalidad cuantificar el título de anticuerpos para discernir anticuerpos derivados de una infección activa y de los anticuerpos generados por vacunación. Sin embargo, no fue posible correlacionar la fuente que generó los anticuerpos en los animales de estudio, esto

debido a la falta de historias clínicas de éstos animales. Es importante que este aspecto pudiera esclarecerse utilizando un grupo de estudio con un mayor control de la información que incluya su condición de salud, edad, procedencia y tipos de vacunas a las que han sido sometidos de manera que se pueda establecer más claramente el estatus serológico del animal.

Arjona y cols. en el 2000 realizaron un estudio con 230 sueros de gatos de ambos sexos en el que encontraron la mayor seropositividad en machos que en hembras con lo cual afirman que el FeLV fue más frecuente en machos y que son la principal fuente de transmisión. En este estudio el porcentaje de machos positivos obtenido, aunque fue más alto, no resultó estadísticamente significativo al ser comparado con el porcentaje de hembras positivas; sin embargo, con la prueba estadística realizada se determinó que el porcentaje fue muy cercano a ser significativo si se hubiera incrementado la población de animales estudiada, lo cual sería concordante con lo descrito por Arjona y cols.

Aunque se ha descrito que los gatos mayores de un año son más susceptibles a la infección por el FeLV (Suntz y cols, 2010), en el presente estudio no se pudo determinar esta información, ya que no se tuvo disponible la información de la edad de los gatos en la mayoría de los casos y al realizar la prueba estadística de éste rubro se obtuvo un valor de  $P=0.7777$  lo que significa que la diferencia no es significativa. Se realizó un segundo análisis con Prueba de Fisher's que mostró un valor de  $P= 0.7563$  lo que reafirmó la conclusión anterior.

El análisis estadístico realizado a los subgrupos en base a la procedencia de los sueros demostró que no hay una diferencia significativa entre los grupos de particulares, clínica y antirrábico lo que demostró que independientemente del origen del gato se pueden infectar con igual facilidad, sin embargo hay variables que pueden afectar éstos resultados como es el caso de los animales de antirrábico ya que según las investigaciones de Haffer y cols. en 1987 la prueba de ELISA no se puede utilizar para distinguir entre gatos virémicos, latentes y vacunados, lo que podría explicar el hecho de que el porcentaje de gatos negativos de antirrábico sea tan alto, ya que aunque no se obtuvieron las historias clínicas de éstos

animales se puede hipotetizar que muchos de ellos no recibieron vacunación y dado el modo de transmisión es probable que estén infectados pero en fase latente.

Sparkes en 1997 afirmó que una vacuna ideal tendría que proporcionar una protección tanto contra la viremia persistente como la transitoria y, por lo tanto, también prevenir las infecciones latentes y el desarrollo de enfermedades relacionadas con el FeLV, como se puede deducir, es el caso de los gatos que van regularmente a consulta los cuales tienen un cuadro de vacunación completo y reciben una atención veterinaria adecuada, sin embargo se debe considerar que la presencia de anticuerpos vacunales pueden dar resultados falsos positivos a las pruebas serológicas convencionales como la prueba de ELISA utilizada en éste estudio y esto sería la causa de que el porcentaje de gatos positivos de la clínica veterinaria fuera tan alto.

Aunque hay varios métodos de diagnóstico para la infección por el FeLV como la prueba de ELISA e inmunofluorescencia, en éste trabajo se ha propuesto otra técnica serológica alternativa como es la prueba de WB, descrita como una prueba confirmatoria para otros retrovirus (Virus de Inmunodeficiencia Humana), con la que se obtuvieron resultados satisfactorios, sin embargo es necesario su comparación de sensibilidad y especificidad con tests comerciales para definir si es una técnica más adecuada para el diagnóstico del FeLV en México.

La prueba de PCR, que detecta secuencias específicas provirales en muestras de sangre, ha sido utilizada para el diagnóstico del FeLV en España; sin embargo no existe un protocolo estándar para PCR hasta el momento y cada laboratorio utiliza sus propias metodologías específicas por lo que la comparación directa entre los estudios es problemática (Gomes-Keller 2006). Es importante tomar esto en cuenta si se considera que ésta prueba pudiera establecerse para el diagnóstico de FeLV en México y en éste caso será necesario comparar su desempeño con las pruebas serológicas existentes y posiblemente se puede pensar, como sucede en otros retrovirus (Lentivirus de pequeños rumiantes) utilizar una combinación de pruebas (PCR-ELISA) para determinar un animal libre de infección.



## 6. CONCLUSIONES

- El antígeno vacunal seleccionado para estandarizar el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) fue adecuado para ofrecer una prueba de diagnóstico alternativa para la Leucemia Viral Felina.
- La estandarización de las pruebas serológicas resultó exitosa dado que logramos detectar un número alto de animales seropositivos con pocas discordancias.
- La prueba de Western Blot ayudó a confirmar los resultados provenientes de la prueba de ELISA, tal y como sucede en otras infecciones causadas por retrovirus, dándole sustento y validez a los resultados obtenidos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Akerblom L, Strömstedt K, Hoglund S, Osterhaus A, Morein B. 1989. Formation and characterization of FeLV ISCOMs. *Vaccine*. 7:142 - 146
2. Arjona A, Escolar E, Soto I, Barquero N, Martín D, Gómez-Lucía E. 2000. Seroepidemiological Survey of Infection by Feline Leukemia Virus and Immunodeficiency Virus in Madrid and Correlation with Some Clinical Aspects. *Journal of Clinical Microbiology* 38(9): 3448–3449.
3. Dunham SP, Graham E. 2008. Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinics. Small Animal Practice. Vet Clin Small Anim* 38: 879–901
4. Egberink H, Horzinek MC. 1992. Animal immunodeficiency viruses. *Veterinary Microbiology*. 33: 311-331
5. Fujino Y, Ma Z, Satoh H, Mizuno T, Hisasue M, Baba K, Masuda K, Ohno K, Onishi T, Tsujimoto H. 2004. Characterization of a newly established nonproducer lymphoma cell line for feline leukemia virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 429–439.
6. Gomes-Keller MA, Tandon R, Gonczi E, Meli ML, Hoffman-Lehmann R, Lutz H. 2006. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology* 112: 11–21.
7. Gomes-Keller MA, Gönczi E, Tandon R, Riondato F, Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Lutz H. 2006. Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Results with Those of Current Diagnostic Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 44(3): 916–922.
8. Gómez-Lucía DE, Arjona SA, Doménech GA, Barneto CA. 2006. Diagnóstico de la leucemia y de la inmunodeficiencia felinas. *Canis et felis* 82: 55-77.

9. Graham EM, Jarrett O, Flynn JN. 2003. Development of antibodies to feline IFN- $\gamma$  as tools to elucidate the cellular immune responses to FeLV. *Journal of Immunological Methods* 279: 69 - 78.
10. Haffer KN, Sharpee RL, Beckenhauer WH. 1987. Feline leukaemia vaccine protection against viral latency. *Vaccine* 5: 133-135.
11. Heberling RL, Kalter SS. 1986. Rapid Dot-Immunobinding Assay on Nitrocellulose for Viral Antibodies. *J. Clin. Microbiol* 23(1): 109-113.
12. Hardy WD Jr, Zuckerman EE. 1991. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 199(10):1365-73.
13. Hartmann K. 2006. Feline leukaemia virus infection. IN: *Infectious Diseases of the dog and cat*, 3<sup>a</sup> ed. (Greene CE, ed): Saunders Elsevier, St. Louis (Mo), pp 105-131.
14. Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, Boretti F, Sigrist B, H Lutz H. 2001. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of General Virology.* 82: 1589–1596
15. Hofmann-Lehmann R, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Willi B, Cattori V, Maria A. Gomes-Keller MA, Ossent P, Golder MC, Flynn JN, Lutz H. 2006. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine.* 24:1087–1094.
16. Hartmann. 2006. Feline Leukaemia virus Infection. IN: *Infectious Diseases.* Greene third edition.
17. Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, Craig E Greene CE, Vidyashankar AN, Jarrett O, Egberink HF. 2007. Quality of different in-clinic test systems for feline

- immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 9: 439-445. doi:10.1016/j.jfms.2007.04.003.
18. Jackson ML, Haines DH, Taylor SM, Misra V. 1996. Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. *J Vet Diagn Invest* 8:25-30.
  19. Jarrett, O. 1999. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology* 69: 99 - 107.
  20. Levy LS. 2008. Review. Advances in understanding molecular determinants in FeLV pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol* 123: 14–22
  21. Linenberger ML, Deng T. 1999. The effects of feline retroviruses on cytokine expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72: 343-368.
  22. López NA, Jacobson RH, Scarlett JM, Center SA, Randolph JF, Scott FW. 1989. Sensitivity and specificity of blood test kits for feline leukemia virus antigen. *J Am Vet Med Assoc.* 195(6):747-51.
  23. Lutz, H. 1990. Feline retroviruses: a brief review. *Veterinary Microbiology* 23: 131-146.
  24. Lutz H, Jarrett O. 1987. Detection of Feline Leukemia Virus Infection in Saliva. *J. Clin. Microbiol* 25(5): 827-831.
  25. Lutz H, Pedersen N, Higgins J, Hübscher U, Troy FA, Theilen GH. 1980. Humoral Immune Reactivity to Feline Leukemia Virus and Associated Antigens in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus. *Cancer Research* 40; 3642-3651.

26. Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V. 1993. Feline Leukemia Virus Detection by Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tumor Tissue from Cats with Lymphosarcoma. *Can J Vet Res.* 57: 269-276
27. Mastro JM, Lewis MG, Mathes LE, Sharpee R, Tarr MJ, Olsen RG. 1986. Feline leukaemia vaccine: efficacy, contents and probable mechanism. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11: 205-213
28. Myers-Evert DK, Herrmann-Hoesing LM. 2006. Ovine progressive pneumonia virus capsid is B-cell immunodominant using Western blot analysis: a comparison of sensitivity between Western blot analysis and immunoprecipitation. *J Virol Methods* 137. 339-342.
29. Ogilvie GK, Tompkins MB, Tompkins WAF. 1988. Clinical and Immunologic Aspects of FeLV-Induced Immunosuppression. *Veterinary Microbiology*, 17: 287-296.
30. Osterhaus A, Weijer K, UytdeHaag F, Knell P, Jarrett O, Akerblom L, Morein B. 1989. Serological responses in cats vaccinated with FeLV ISCOM and an inactivated FeLV vaccine. *Vaccine* 7: 137-141.
31. Porras MR, Doménech GA, Gómez-Lucía MR. 2007. Papel de las citoquinas en la infección por el virus de la leucemia felina. *RCCV* 1(2): 584 – 596.
32. Rojko JL, Olsen RG. 1984. The Immunobiology of the feline leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6: 107—165
33. Sparkes A. H. 1997. Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination. *Journal of Small Animal Practice* 38: 187-194.

34. Suntz, M., et al., High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2010), doi:10.1016/j.vetimm.2010.02.014.
35. Tique V, Sánchez A, Álvarez L, Mattar S. 2009. Seroprevalencia del virus de leucemia e inmunodeficiencia felina en gatos de Montería, Córdoba. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 56:85-94
36. Tizard IR. 2009. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8ª edición. ELSEVIER Print. España.
37. Weijer K, Pfauth A, Herwijnen RV, Jarrett O, Melen RH, Tomme C, Osterhaus A. 1993. Induction of feline leukaemia virus-neutralizing antibodies by immunization with synthetic peptides derived from the FeLV *env* gene. *Vaccine* 11(9): 946-956.

## 8. APÉNDICE 1.

**Tabla 12. Población de gatos totales del estudio.**

No de registro	Nombre del gato	Procedencia del suero	Edad	Sexo
1	Saúl	Particulares		Macho
2	Milton	Particulares	9 meses	Macho
3	x	Particulares		Macho
4	Gandhalf	Particulares	3 años	Macho
5	Mixtle	Particulares		Macho
6	Zeuz	Particulares		Macho
7	Morris	Particulares		Macho
8	Mao	Particulares		Macho
9	Frosty	Control Negativo	12 años	Macho
10	Bishy	Control Negativo	2 años	Hembra
11	Minina	Particulares		Hembra
12	Bumba	Particulares		Hembra
13	Mota	Particulares		Hembra
14	Ana	Particulares	5 años	Hembra
15	Shena	Particulares	5 años	Hembra
16	Moreno	Particulares	2 años	Macho
17	Tsuki	Particulares	2 años	Hembra
18	Cris	Particulares	8 meses	Hembra
19	Concho	Particulares	4 años	Macho
20	Mindi	Particulares	2 años	Hembra
21	Colouche	Particulares	2 años	Hembra
22	Stich	Particulares	1 año	Macho
23	Pelusa	Particulares		Hembra
24	Max	Particulares		Macho
25	Nisa	Particulares	5 años	Hembra
26	Mandi	Particulares	11 años	Hembra
27	Kiara	Particulares	7 años	Hembra
28	Chiquimiau	Particulares	6 años	Hembra
29	Nicolás	Particulares		Macho
30	Merlín	Particulares	10 años	Macho
31	Cindy	Particulares	2 años	Hembra
32	Tomás	Particulares	4 años	Macho
33	Negra	Particulares	1 año	Hembra
34	Mina	Particulares		Hembra
35	Patas blancas	Particulares	10 años	Macho
36	Wall-e	Fundación Mendoza	8 meses	Hembra
37	White	Fundación Mendoza	8 meses	Hembra
38	Coca	Fundación Mendoza		Macho

39	Ashito	Fundación Mendoza	1 año y medio	Macho
40	Garfield	Particulares	4 meses	Macho
41	Cx	Fundación Mendoza		?
42	Yuca	Fundación Mendoza		Hembra
43	Maraca	Fundación Mendoza		Hembra
44	Tuerca	Fundación Mendoza		Hembra
45	Tornillo	Fundación Mendoza		Macho
46	Lucas	Fundación Mendoza		Macho
47	Pichy	Fundación Mendoza		?
48	Gisa	Fundación Mendoza		Hembra
49	Pumy	Fundación Mendoza		?
50	Nala	Fundación Mendoza		Hembra
51	Zeuz (luis)	Fundación Mendoza		Macho
52	Güera	Fundación Mendoza		Hembra
53	Salem	Fundación Mendoza	10 meses	Macho
54	Winky	Fundación Mendoza		?
55	Gasparin	Fundación Mendoza		Macho
56	Huesitos	Fundación Mendoza		Macho
57	Bichirilinga	Particulares		Hembra
58	Tufi	Particulares		?
59	Persian	Fundación Mendoza		Macho
60	Miel	Fundación Mendoza		Macho
61	Salem (Itzel)	Control Positivo		Macho
62	Taby	Antirrábico	1 año	Macho
63	Siames	Antirrábico	2 años	Macho
64	Megue	Control Positivo		Macho
65	Flor	Antirrábico		Hembra
66	Lactante	Antirrábico		Hembra
67	Negro peluda	Antirrábico		Macho
68	Neon	Antirrábico	3 años	Macho
69	Silvestre	Antirrábico	2 meses	Macho
70	Bebe	Antirrábico	1 mes	Macho
71	Gris	Antirrábico	1 mes	Macho
72	Black	Antirrábico	2 meses	Macho
73	Grandote	Antirrábico	1 año y medio	Macho
74	Cacho 1	Antirrábico	2 meses	Macho
75	Cacho 2	Antirrábico	2 meses	Macho
76	Cacho 3	Antirrábico	2 meses	Macho
77	Retacito	Particulares	2 años	Hembra
78	Anti 1	Antirrábico	3 meses	Hembra
79	Anti 2	Antirrábico	3 meses	Hembra
80	Anti 3	Antirrábico	1 año	Macho
81	Anti 4	Antirrábico	3 meses	Macho



<b>82</b>	Anti 5	Antirrábico	6 meses	Hembra
<b>83</b>	Anti 6	Antirrábico	1 año	Hembra
<b>84</b>	Anti 7	Antirrábico	3 meses	Hembra
<b>85</b>	Anti 8	Antirrábico	3 meses	Hembra
<b>86</b>	Anti 9	Antirrábico	3 meses	Hembra
<b>87</b>	Moncho	Particulares	6 meses	Macho
<b>88</b>	Güero	Particulares	14 años	Macho
<b>89</b>	Fito	Particulares	10 años	Macho

## 9. APÉNDICE 2

### Electroforesis

#### A. Acrilamida Bis (30%)

29.2 g Acrilamida

0.8 g Bis

Colocar en 100 ml de agua bidestilada, regular pH a 7.0. Guardar a 4° C en oscuridad máximo 30 días.

#### B. Tris Base 1.5M pH 8.8

18.5 g en 100 ml de agua bidestilada. Guardar a 4° C en oscuridad.

#### C. Tris HCl 0.5M pH 6.8

7.8 g en 100 ml de agua bidestilada. Guardar a 4° C en oscuridad.

#### D. Buffer de lisis

Disolver 0.21775 g de PMSF en 1.25 ml de DMSO para obtener 100 µl

0.1 g de DOC (Deoxycholic acid)

9.8 ml de RIPA

Se conserva en refrigeración.

#### E. Buffer de muestra 2x

3.2 ml 0.5M Tris HCl Ph 6.8 (0.08M)

4 ml 10% SDS (2%)

2 ml glycerol (10%)

0.308 g DTT (Dithiothreitol) (0.1M)

Azul de Bromofenol

Llevar a 10 ml con agua bidestilada. Se conserva en refrigeración.

F. Buffer de corrida 5x pH 8.3

Tris Base 1.5M pH 8.8	7.5 g
Glicina	36 g
SDS	2.5 g

Aforar con agua bidestilada a 500 ml. Conservar a temperatura ambiente. Usar a 1x.

G. Solución Desteñidora

Metanol	40 ml
Acido acético	10 ml
Agua bidestilada	50 ml

H. Preparación del gel de poliacrilamida

Gel separador (12%)

H2O Destilada	1.675 ml
Tris Base 1.5M pH 8.8	1.25 ml
SDS-Stock 10%	50 µl
Acrilamida-Bis (stock 30%)	2 ml
Persulfato de amonio	25 µl
Temed	2.5 µl

-----  
5.25 ml

I. Gel concentrador (4%)

H2O Destilada	1.6 ml
Tris HCl 0.5M pH 6.8	0.625 ml
SDS-Stock 10%	25 µl
Acrilamida-Bis (stock 30%)	0.325 ml
Persulfato de amonio	12.5 µl
Temed	2.5 µl

-----  
2.5 ml

### 10. APÉNDICE 3

#### Western blot

##### A. Electrodo buffer 10x

Tris base (0.25M)	30.275 g
Glicina (1.920M)	144.134 g

Aforar con agua bidestilada hasta 1 litro.

##### B. Buffer de transferencia

Metanol	150 ml
Electrodo buffer 10x	150 ml
Agua bidestilada	450 ml
SDS	0.075 g

##### C. PBS 10x pH 7.0

Solución A	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.1 g (0.01M)
	NaCl	43.8 g (0.15M)
	H <sub>2</sub> O Destilada	aforar a 500 ml.
Solución B	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	6.9 g (0.01M)
	NaCl	43.8 g (0.15M)
	H <sub>2</sub> O Destilada	aforar a 500 ml.

##### D. Buffer de lavado

PBS	500 ml
Tween 20 (0.2%)	1 ml

##### E. Buffer de bloqueo

PBS	20 ml
Leche descremada (5%)	1 g

F. Buffer de dilución

Buffer de lavado	20 ml
Leche descremada (5%)	1 g

G. Revelador

Diaminobencidina (0.05%)	0.010 g
Peróxido de Hidrógeno	10 $\mu$ l
Disolver en 15 ml de PBS	

## 11. APÉNDICE 4

### ELISA

#### A. Buffer del antígeno pH 9.6

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.015M) 1.59 g

NaHCO<sub>3</sub> (0.0033M) 2.93 g

Aforar a 50 ml con agua bidestilada y se ajustar el pH a 9.6

#### B. Buffer de lavado. pH 7.2 (Solución salina amortiguadora de fosfatos).

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20 g

KCl 0.20 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g

NaCl 8 g

Aforar con agua bidestilada hasta 1000 ml y ajustar pH a 7.2.

#### C. PBS Tween.

PBS 500 ml

Tween 20 0.5 ml

#### D. Buffer de dilución.

PBS Tween 100 ml

Leche descremada 1.5 g

#### E. Buffer de Bloqueo.

Buffer de dilución 8 ml

Leche descremada 0.24 g

Suero de cerdo 400 µl

F. Solución amortiguadora de citratos A.

Ácido Cítrico 10.5 g

Aforar a 500 ml con agua bidestilada

G. Solución amortiguadora de citratos B.

Citrato de Sodio 14.55 g

Aforar a 500 ml con agua bidestilada

H. Solución de paro.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N 55.17 ml

Agua bidestilada 994.83 ml

I. Sustrato.

Solución amortiguadora de Citratos A 5 ml

Solución amortiguadora de Citratos B 5 ml

OPD 4 mg

Peróxido de Hidrógeno 4 µl

Se prepara media hora antes de usar.

## APÉNDICE 5.

Tablas de los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA indirecto y Western blot.

**Tabla 13. Gatos (+) y (-) concordantes en ambas pruebas**

Nombre del gato	Procedencia de suero	WB	ELISA DO/LC 1:10
Milton	Particulares	(+)	1.138
Zeuz	Particulares	(+)	2.314
Morris	Particulares	(+)	1.687
Mao	Particulares	(+)	2.828
Minina	Particulares	(+)	1.532
Bumba	Particulares	(+)	2.094
Mota	Particulares	(+)	3.001
Moreno	Particulares	(+)	1.615
Tsuki	Particulares	(+)	1.726
Pelusa	Particulares	(+)	1.002
Max	Particulares	(+)	1.952
Kiara	Particulares	(+)	1.616
Nicolás	Particulares	(+)	1.614
Merlín	Particulares	(+)	2.861
White	Fundación Mendoza	(+)	1.669
Coca	Fundación Mendoza	(+)	1.605
Tuerca	Fundación Mendoza	(+)	1.045
Tornillo	Fundación Mendoza	(+)	1.730
Pichy	Fundación Mendoza	(+)	1.200
Gisa	Fundación Mendoza	(+)	2.588
Pumy	Fundación Mendoza	(+)	1.859
Nala	Fundación Mendoza	(+)	1.061
Zeuz (luis)	Fundación Mendoza	(+)	1.313
Gasparin	Fundación Mendoza	(+)	2.374
Huesitos	Fundación Mendoza	(+)	3.034
Persian	Fundación Mendoza	(+)	1.059
Miel	Fundación Mendoza	(+)	4.549
Taby	Antirrábico	(+)	1.388
Siames	Antirrábico	(+)	2.836
Flor	Antirrábico	(+)	3.117
Neon	Antirrábico	(+)	2.571
Silvestre	Antirrábico	(+)	1.016
Bebe	Antirrábico	(+)	1.418
Black	Antirrábico	(+)	3.015
Grandote	Antirrábico	(+)	4.026
Retacito	Particulares	(+)	2.527
Anti 5	Antirrábico	(+)	2.784



Anti 7	Antirrábico	(+)	1.401
Fito	Particulares	(+)	1.716
Gandhalf	Particulares	(-)	0.927
Mixtle	Particulares	(-)	0.702
Ana	Particulares	(-)	0.414
Shena	Particulares	(-)	0.691
Cris	Particulares	(-)	0.340
Concho	Particulares	(-)	0.766
Mindi	Particulares	(-)	0.104
Colouche	Particulares	(-)	0.405
Stich	Particulares	(-)	0.266
Nisa	Particulares	(-)	0.818
Mandi	Particulares	(-)	0.954
Cindy	Particulares	(-)	0.676
Negra	Particulares	(-)	0.563
Mina	Particulares	(-)	0.441
Wall-e	Fundación Mendoza	(-)	0.367
Yuca	Fundación Mendoza	(-)	0.519
Cx	Fundación Mendoza	(-)	0.122
Maraca	Fundación Mendoza	(-)	0.083
Lucas	Fundación Mendoza	(-)	0.098
Salem	Fundación Mendoza	(-)	0.275
Gris	Antirrábico	(-)	0.494
Cacho 1	Antirrábico	(-)	0.415
Cacho 2	Antirrábico	(-)	0.468
Cacho 3	Antirrábico	(-)	0.497
Anti 1	Antirrábico	(-)	0.369
Anti 4	Antirrábico	(-)	0.224
Anti 6	Antirrábico	(-)	0.585
Anti 8	Antirrábico	(-)	0.327
Anti 9	Antirrábico	(-)	0.812
Moncho	Particulares	(-)	0.041
Güero	Particulares	(-)	0.809

**Tabla 14. Gatos discordantes de ambas pruebas**

<b>Nombre del gato</b>	<b>Procedencia de suero</b>	<b>WB</b>	<b>ELISA DO/LC 1:10</b>
<b>X</b>	Particulares	(+)	0.599
<b>Chiquimiau</b>	Particulares	(+)	0.289
<b>Patas blancas</b>	Particulares	(+)	0.630
<b>Ashito</b>	Fundación Mendoza	(+)	0.365
<b>Garfield</b>	Particulares	(+)	0.682
<b>Lactante</b>	Antirrábico	(+)	0.192
<b>Negro peluda</b>	Antirrábico	(+)	0.788
<b>Anti 2</b>	Antirrábico	(+)	0.237
<b>Anti 3</b>	Antirrábico	(+)	0.283
<b>Saúl</b>	Particulares	(+)	0.865
<b>Tomás</b>	Particulares	(+)	0.905
<b>Güera</b>	Fundación Mendoza	(+)	0.930
<b>Tufi</b>	Particulares	(+)	0.906
<b>Winky</b>	Fundación Mendoza	(-)	4.580
<b>Bichirilinga</b>	Particulares	(-)	1.914

**Tabla 15. Procedencia Particulares. Concordantes.**

<b>Nombre del gato</b>	<b>Procedencia de suero</b>	<b>WB</b>	<b>ELISA DO/LC 1:10</b>
<b>Milton</b>	Particulares	(+)	1.138
<b>Zeuz</b>	Particulares	(+)	2.314
<b>Morris</b>	Particulares	(+)	1.687
<b>Mao</b>	Particulares	(+)	2.828
<b>Minina</b>	Particulares	(+)	1.532
<b>Bumba</b>	Particulares	(+)	2.094
<b>Mota</b>	Particulares	(+)	3.001
<b>Moreno</b>	Particulares	(+)	1.615
<b>Tsuki</b>	Particulares	(+)	1.726
<b>Pelusa</b>	Particulares	(+)	1.002
<b>Max</b>	Particulares	(+)	1.952
<b>Kiara</b>	Particulares	(+)	1.616
<b>Nicolás</b>	Particulares	(+)	1.614
<b>Merlín</b>	Particulares	(+)	2.861
<b>Retacito</b>	Particulares	(+)	2.527
<b>Fito</b>	Particulares	(+)	1.716
<b>Gandhalf</b>	Particulares	(-)	0.927
<b>Mixtle</b>	Particulares	(-)	0.702

<b>Cris</b>	Particulares	(-)	0.340
<b>Concho</b>	Particulares	(-)	0.766
<b>Mindi</b>	Particulares	(-)	0.104
<b>Colouche</b>	Particulares	(-)	0.405
<b>Stich</b>	Particulares	(-)	0.266
<b>Nisa</b>	Particulares	(-)	0.818
<b>Mandi</b>	Particulares	(-)	0.954
<b>Cindy</b>	Particulares	(-)	0.676
<b>Negra</b>	Particulares	(-)	0.563
<b>Mina</b>	Particulares	(-)	0.441
<b>Ana</b>	Particulares	(-)	0.414
<b>Shena</b>	Particulares	(-)	0.691
<b>Moncho</b>	Particulares	(-)	0.041
<b>Güero</b>	Particulares	(-)	0.809
<b>Saúl</b>	Particulares	(+)	0.865
<b>Tomás</b>	Particulares	(+)	0.905
<b>Tufi</b>	Particulares	(+)	0.906

**Tabla 16. Procedencia Particulares. Discordantes.**

<b>Nombre del gato</b>	<b>Procedencia de suero</b>	<b>WB</b>	<b>ELISA DO/LC 1:10</b>
<b>Bichirilinga</b>	Particulares	(-)	1.914
<b>X</b>	Particulares	(+)	0.599
<b>Chiquimiaiu</b>	Particulares	(+)	0.289
<b>Patas blancas</b>	Particulares	(+)	0.630
<b>Garfield</b>	Particulares	(+)	0.682

**Tabla 17. Procedencia Fundación Mendoza. Concordantes.**

<b>Nombre del gato</b>	<b>Procedencia de suero</b>	<b>WB</b>	<b>ELISA DO/LC 1:10</b>
<b>White</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.669
<b>Coca</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.605
<b>Tuerca</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.045
<b>Tornillo</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.730
<b>Pichy</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.200
<b>Gisa</b>	Fundación Mendoza	(+)	2.588
<b>Pumy</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.859
<b>Nala</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.061
<b>Zeuz (luis)</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.313

<b>Gasparin</b>	Fundación Mendoza	(+)	2.374
<b>Huesitos</b>	Fundación Mendoza	(+)	3.034
<b>Miel</b>	Fundación Mendoza	(+)	4.549
<b>Persian</b>	Fundación Mendoza	(+)	1.059
<b>Yuca</b>	Fundación Mendoza	(-)	0.519
<b>Wall-e</b>	Fundación Mendoza	(-)	0.367
<b>Cx</b>	Fundación Mendoza	(-)	0.122
<b>Maraca</b>	Fundación Mendoza	(-)	0.083
<b>Lucas</b>	Fundación Mendoza	(-)	0.098
<b>Salem</b>	Fundación Mendoza	(-)	0.275
<b>Güera</b>	Fundación Mendoza	(+)	0.930

**Tabla 18. Procedencia Fundación Mendoza. Discordantes.**

<b>Nombre del gato</b>	<b>Procedencia de suero</b>	<b>WB</b>	<b>ELISA DO/LC 1:10</b>
<b>Ashito</b>	Fundación Mendoza	(+)	0.365
<b>Winky</b>	Fundación Mendoza	(-)	4.580

**Tabla 19. Procedencia Antirrábico. Concordantes.**

<b>Nombre del gato</b>	<b>Procedencia de suero</b>	<b>WB</b>	<b>ELISA DO/LC 1:10</b>
<b>Taby</b>	Antirrábico	(+)	1.388
<b>Siames</b>	Antirrábico	(+)	2.836
<b>Flor</b>	Antirrábico	(+)	3.117
<b>Neon</b>	Antirrábico	(+)	2.571
<b>Silvestre</b>	Antirrábico	(+)	1.016
<b>Bebe</b>	Antirrábico	(+)	1.418
<b>Black</b>	Antirrábico	(+)	3.015
<b>Grandote</b>	Antirrábico	(+)	4.026
<b>Anti 5</b>	Antirrábico	(+)	2.784
<b>Anti 7</b>	Antirrábico	(+)	1.401
<b>Cacho 1</b>	Antirrábico	(-)	0.415
<b>Cacho 2</b>	Antirrábico	(-)	0.468
<b>Cacho 3</b>	Antirrábico	(-)	0.497
<b>Gris</b>	Antirrábico	(-)	0.494
<b>Anti 1</b>	Antirrábico	(-)	0.369
<b>Anti 4</b>	Antirrábico	(-)	0.224
<b>Anti 6</b>	Antirrábico	(-)	0.585
<b>Anti 8</b>	Antirrábico	(-)	0.327
<b>Anti 9</b>	Antirrábico	(-)	0.812

**Tabla 20. Procedencia Antirrábico. Discordantes.**

<b>Nombre del gato</b>	<b>Procedencia de suero</b>	<b>WB</b>	<b>ELISA DO/LC 1:10</b>
<b>Lactante</b>	Antirrábico	(+)	0.192
<b>Negro peluda</b>	Antirrábico	(+)	0.788
<b>Anti 2</b>	Antirrábico	(+)	0.237
<b>Anti 3</b>	Antirrábico	(+)	0.283