



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA VIRAL FELINA UTILIZANDO LA
PROTEÍNA gp 70 (Epítotope p45)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

LUCÍA ELIZABETH CARRIÓN VALLADARES

ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

COASESOR: DR. HUGO RAMÍREZ 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 CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

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



Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicarle a usted que revisamos LA TESIS:

EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA VIRAL FELINA UTILIZANDO LA PROTEÍNA gp 70 (Epítope p45)

Que presenta la pasante: Lucía Elizabeth Carrión Valladares

Con número de cuenta: G9005010-1 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 ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 16 de Agosto de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. H. Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	MC. Raúl Arturo Mar Cruz	
SECRETARIO	MVZ. Melitón Lara Rocha	
1er SUPLENTE	MVZ. Solón Alfonso Zabre Santamaría	
2do SUPLENTE	MVZ. Silvia Leticia Bonilla Orozco	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres.

Por impulsarme a alcanzar mis metas, incluso en los momentos de mayor confusión y desasosiego, gracias por su apoyo incondicional.

A Fer.

Porque siempre estuviste ahí para apoyarme en todo lo que necesitaba, a pesar de tu cansancio y tus obligaciones.

A mi hijo Abraham.

Por ser el motivo para continuar y nunca rendirme.

A todos los que directa e indirectamente ayudaron en mis estudios y en la elaboración de mi tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Lilis y Cuti, por proveerme de lo necesario para realizar mis estudios y por el esfuerzo que hicieron para que esto fuera posible. Los quiero mucho.

A Fer, por tus consejos, tus recomendaciones, tu apoyo en todo lo que necesité durante la realización de esta tesis, muchísimas gracias. Te quiero Fa.

A Abraham, por darme la alegría de vivir y por entender mis ausencias. Te quiero Ccnt.

A mis hermanos Zeltzin, Arturo y Ángel, por su cariño y compañía. Los quiero.

A mi asesor Dr. Alejandro Martínez, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por el tiempo y la paciencia para asesorarme, muchas gracias.

A mi coasesor Dr. Hugo Ramírez, por la orientación, el tiempo y la ayuda proporcionada durante la elaboración de esta tesis, gracias.

A Normiguita, por apoyarme en todo el proyecto experimental y darme parte importante de tu tiempo, gracias.

A la M en C. Martha García, por el apoyo recibido en la elaboración de mi tesis, gracias.

Al Laboratorio de Inmuno-Virología de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología de la UMAE Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

A Lulú y Alma del laboratorio de virología que me aconsejaron y me brindaron su apoyo en la realización de mi tesis, gracias.

CONTENIDO

Glosario de abreviaturas	7
1. Resumen	9
2. Introducción	10
3. Virus de la leucemia felina	11
3.1 Estructura del virus	11
3.2 Subgrupos de FeLV	11
3.3 Epidemiología	12
3.4 Signos clínicos	13
3.4.1 Neoplasias	13
3.4.1.1 Linfoma	13
3.4.1.2 Leucemias	14
3.4.2 Supresión de la médula ósea	14
3.4.3 Inmunosupresión	14
3.5 Patogenia	15
3.5.1 Fases de la infección por FeLV	15
3.6 Respuesta inmune en FeLV	18
3.6.1 Inmunidad humoral	18
3.6.2. Inmunidad celular	18
3.6.3 Citocinas	18
3.6.4 Respuesta inmune frente a la vacunación	19
3.7 Pruebas de diagnóstico	19
3.7.1 ELISA	20
3.7.1.1 ELISA Directo	20
3.7.1.2 ELISA Indirecto	21

3.7.2 IFD (Inmunofluorescencia directa)	22
3.7.3 PCR	22
3.8 Tratamiento	22
3.8.1 Tratamiento de linfoma	22
3.8.2 Tratamiento de leucemia aguda	24
3.8.3 Tratamiento de enfermedades mielosupresoras	24
3.8.4 Recomendaciones para portadores sanos positivos a FeLV	25
3.8.5 Antivirales e inmunoterapia	25
3.9 Prevención	26
3.10 Control	26
4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
5. Materiales y métodos	29
5.1 Población de sueros	29
5.2 Antígeno	29
5.3 Determinación de la concentración de proteína	29
5.4 Electroforesis del antígeno	30
5.5 Inmunoelectrotransferencia (Western blot)	30
5.6 Estandarización de la técnica de ELISA indirecta	31
5.7 Análisis estadístico	32
6. Resultados	33
6.1 Concentración de proteína del antígeno vacunal	33
6.2 Western blot del antígeno vacunal	33
6.3 ELISA indirecta	34

6.4 Resultados obtenidos según el origen de los sueros	34
6.5 Resultados obtenidos según la edad de los gatos	35
6.6 Resultados obtenidos según el sexo	35
6.7 Resultados de las pruebas de ELISAi y Western blot	36
6.8 Análisis estadístico	37
7. Discusión	38
8. Conclusiones	42
9. Apéndice	43
10. Bibliografía	47

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figuras:

Figura 1. Esquema estructural del virus de leucemia felina (FeLV).....	11
Figura 2. Patogenia de la infección por FeLV	17
Figura 3. Desarrollo de un ELISA indirecto	21
Figura 4. Sándwich para transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa por el método húmedo	31
Figura 5. Western blot de sueros controles negativos y positivos que reconocen el antígeno vacunal	33
Figura 6. Resultados en la población de sueros analizados con el antígeno vacunal gp70 en ELISAI	34
Figura 7. Comparación de los resultados obtenidos en los sueros de gatos evaluados en ELISAI y Western blot	37

Tablas:

Tabla 1. Subgrupos de FeLV	12
Tabla 2. Resultados de laboratorio en las diferentes fases de la enfermedad de FeLV	16
Tabla 3. Indicadores del pronóstico en el linfoma felino	23
Tabla 4. Protocolo de la terapéutica COPA para el tratamiento de linfoma felino	23
Tabla 5. Vacunas de FeLV disponibles en México	26
Tabla 6. Diluciones realizadas para determinar la concentración de proteína de la vacuna Leucogen	30
Tabla 7. Resultados de la prueba de ELISAI con la proteína gp70 de FeLV	34
Tabla 8. Resultados de la prueba de ELISAI según la procedencia de los sueros felinos ..	35
Tabla 9. Resultados de la prueba de ELISAI según la edad de los gatos del estudio	35
Tabla 10. Resultados de la prueba de ELISAI según el sexo de los gatos utilizados en este estudio	35

Tabla 11. Resultados de los sueros evaluados con ELISAI y Western blot	36
Tabla 12. Comparación de los resultados obtenidos en los sueros de gatos evaluados en ELISAI y Western blot	36
Tabla 13. Tabla de contingencia donde se compara la técnica de ELISAI con respecto a WB	37

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AcN	Anticuerpos Neutralizantes
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
AZT	Zidovudina
CMHC	Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular
COP	Ciclofosfamida, Vincristina y Prednisona
COPA	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona y Doxorrubicina
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
ELISAI	ELISA indirecto
FeLV	Virus de la Leucemia Felina
FOCMA	Antígenos de Membrana Celular Asociados a Oncovirus Felino
IF	Interferón
IFA	Inmunofluorescencia indirecta
IFD	Inmunofluorescencia directa
IL	Interleucina
IgG	Inmunoglobulina G
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
MU	Millones de Unidades
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRq	PCR cuantitativa
PMEA	9-(2-fosfonil-metoxietil)adenina
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SC	Subcutánea
SSF	Solución Salina Fisiológica
Tc	Linfocitos citotóxicos
TM	Transmembrana
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UI	Unidades Internacionales
WB	Western blot
γGB	Gammaglobulina

1. RESUMEN.

El virus de la leucemia viral felina (FeLV) es causante del desarrollo de tumores y enfermedades asociadas a procesos de inmunosupresión de los gatos. Es la única enfermedad causada por retrovirus que se puede prevenir con la utilización de vacuna comercial; siendo muy importante antes de vacunar realizar un diagnóstico certero de la posible infección del FeLV en los gatos. En el presente estudio se evaluaron 81 sueros de gatos para la detección de anticuerpos que reconocieran la proteína vacunal gp 70 del FeLV, incluida en pruebas serológicas ELISAI y WB estandarizadas en la FES-Cuautitlán.

En los resultados obtenidos de la población de sueros evaluados en la prueba de ELISAI se encontró 69 (85%) sueros positivos, 11 (14%) sueros negativos y 1 (1%) suero sospechoso. Comparando las pruebas de ELISAI y WB se encontró 67 (83%) sueros positivos a ambas pruebas, 8 (10%) sueros negativos en ambas pruebas y 6 (7%) sueros discordantes. Al comparar la prueba de ELISAI con WB (estándar de oro) se obtuvo una sensibilidad, especificidad de 95.7%, 72.7% y un valor κ de 0.68 respectivamente, con lo cual se deduce que la prueba de ELISAI puede ser una técnica de diagnóstico adecuada para la detección de FeLV en México.

2. INTRODUCCIÓN.

El virus de la leucemia felina (FeLV) pertenece a la familia Retroviridae (Valenzuela *et al.*, 2002) y a la subfamilia *Orthoretrovirinae* y al género gammaretrovirus (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006; Palmero, 2008). Es responsable de la aparición de enfermedades neoplásicas como linfomas, leucemias y trastornos mieloproliferativos y enfermedades no neoplásicas como anemia no regenerativa e inmunosupresión en los gatos (Jackson *et al.*, 1996; Greene, 2000; Jarret, 2001; Schaer, 2006; Dunham *et al.*, 2008; Palmero, 2008; Tizard, 2009).

La leucemia viral felina es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo. Se encuentra presente en la sangre y médula ósea de animales infectados. La eliminación del virus es a través de la saliva principalmente, aunque también puede estar presente en cualquier tipo de secreción. La infección ocurre cuando los gatos acicalan a otro gato, son mordidos, estornudan o comparten platos con un animal infectado, por lo cual se requiere un contacto prolongado entre los gatos para la transmisión del virus, por tanto, los felinos poco sociables son menos susceptibles a contraer enfermedades (Arenas *et al.*, 1998; Yilmaz *et al.*, 2000).

Dependiendo de la respuesta inmune del gato, la infección puede ser eliminada, permanecer latente o como una viremia persistente. Cuando causa inmunodepresión pueden aparecer múltiples enfermedades asociadas, además de que por sí sola induce cambios que puede ocasionar la muerte, como las neoplasias o alteraciones hematológicas (Arenas *et al.*, 1998; Greene, 2000; Palmero, 2008).

El diagnóstico que se realiza en las clínicas veterinarias principalmente es por medio de pruebas de diagnóstico comerciales que detectan la proteína p27 en sangre, suero o plasma. Estas pruebas son de importación y precio elevado, por tal motivo, es importante elaborar una prueba diagnóstica en México para bajar el costo del mismo (Arenas *et al.*, 1998).

La vacunación como medio preventivo es esencial para impedir la proliferación de la enfermedad. Gatos que permanecen dentro de casa pueden sobrevivir más tiempo a comparación de los gatos que deambulan por las calles, ya que tienen menos posibilidades de contraer infecciones secundarias y también ayuda a no diseminar el virus a otros gatos (Carter *et al.*, 2005; Schaer, 2006).

El tratamiento está encaminado a prolongar la vida del paciente, y no de curar la enfermedad. El protocolo a seguir depende de los signos clínicos, también a aumentar la inmunidad y a controlar la replicación del virus (Greene, 2000; Schaer, 2006; Palmero, 2008).

La importancia de FeLV no solo se limita a la medicina veterinaria, ya que es un modelo para la investigación del SIDA en humanos (Hardy *et al.*, 1976).

3. VIRUS DE LA LEUCEMIA FELINA

3.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS

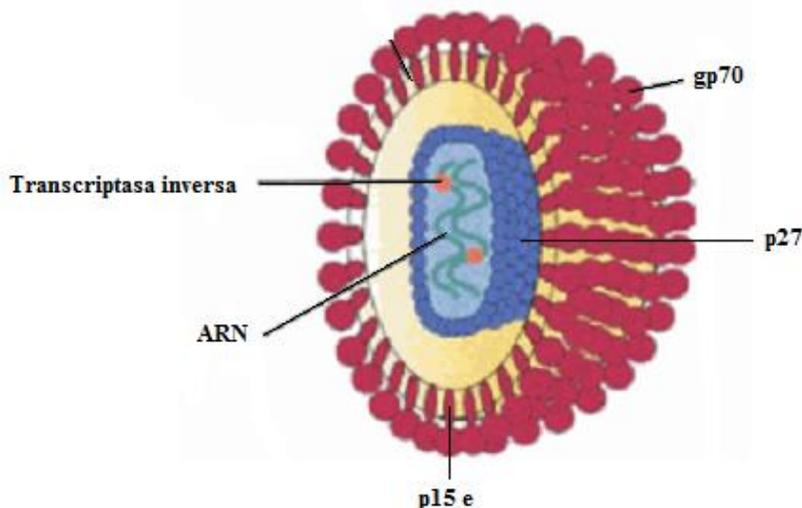
En la estructura viral se reconocen 3 partes.

1.- La más interna es la nucleocápside encargada de proteger el material genético que corresponde a una cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) y algunas enzimas como la transcriptasa inversa. La nucleocápside está constituida por 3 proteínas denominadas p10, p15 interna y p27.

2.- La capa media es el segundo componente, la cual rodea a la nucleocápside y está formada por un solo tipo de proteína, la p12.

3.- La tercera parte es la envoltura externa, se origina de la membrana citoplasmática de la célula infectada, cuyo componente principal es la glicoproteína gp70, que está sostenida por la proteína de transmembrana (TM) p15e (Ver figura 1) (Greene, 2000; Jarret, 2001; Muñoz, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002).

Figura 1. Esquema estructural del virus de leucemia felina (FeLV).



Modificado de Tizard 2009.

3.2 SUBGRUPOS DE FeLV

El virus se clasifica en 3 subgrupos, los subgrupos A, B y C. FeLV-A es el más predominante y está presente en todos los gatos infectados. Los otros dos subgrupos solo se

aíslan en asociación con FeLV-A. El subgrupo FeLV-B se aísla alrededor del 50% de los gatos virémicos y se relaciona con el desarrollo de tumores. FeLV-C se aísla en el 1-2% de los gatos infectados y se relaciona con anemia no regenerativa (Ver tabla 1) (Greene, 2000; Jarret, 2001; Muñoz, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002; Tilley *et al.*, 2008; Tizard, 2009).

Tabla 1. Subgrupos de FeLV.

Subgrupos de virus	Frecuencia de aislamiento en gatos positivos a FeLV.	Enfermedad relacionada.
A	100% de los gatos virémicos.	Neoplasia hematopoyética, experimentalmente puede causar hemólisis.
B	Ocurre con el subgrupo A en alrededor de 50% de gatos con enfermedad neoplásica.	No es patógeno solo; cuando se encuentra con A puede aumentar la virulencia.
C	Rara vez se aísla; tal vez replicación defectuosa.	Anemia no regenerativa.

Modificado de Greene, 2000.

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

El FeLV infecta a gatos domésticos en todo el mundo y esporádicamente algunos felinos no domésticos (Weijer *et al.*, 1989; Valenzuela *et al.*, 2002; Gomes-Keller *et al.*, 2006). Se elimina por las secreciones de gatos virémicos, principalmente la saliva en la cual la concentración de virus es alta y en menor proporción por orina, lágrimas y leche (Weijer *et al.*, 1989; Gomes-Keller *et al.*, 2006). La transmisión por mordedura es la vía más eficaz para extender la infección. La transmisión es más eficiente en los hogares donde viven varios gatos y es frecuente el aseo mutuo y el compartir comederos y bebederos. Los gatitos recién nacidos pueden infectarse por vía transplacentaria, pero casi todos adquieren la infección cuando la madre los lame y amamanta (Pastoret *et al.*, 1998; Greene, 2000; Jarret, 2001; Muñoz, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002; Schaer, 2006; Dunham *et al.*, 2008; Palmero, 2008; Tizard, 2009).

La envoltura viral es liposoluble y susceptible a desinfectantes, jabones, calentamiento y desecación. El virus se inactiva con facilidad en el ambiente, aun así puede sobrevivir de 24 a 48 hrs, si se conserva en un ambiente húmedo y a temperatura ambiente. Por ello se requiere un contacto cercano para que la infección se propague (Greene, 2000; Muñoz, 2001).

Los factores de riesgo para la presentación de FeLV son la edad, el sexo, el estado de salud y estilo de vida de los gatos (Little, 2009). Tienen mayor riesgo de infección los gatos

machos que las hembras, los gatos adultos que los jóvenes, gatos que salen a la calle que los gatos confinados, así como los gatos de comportamiento agresivo en contraste con los menos agresivos (Gleich *et al.*, 2009).

La prevalencia de la infección es mayor para gatos entre 1 y 6 años con promedio de 3 años (Muñoz, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002).

3.4 SIGNOS CLÍNICOS

3.4.1 Neoplasias.

3.4.1.1 Linfoma.

Es el tumor más común asociado a FeLV. El linfoma puede originarse en cualquier órgano y diseminarse a otras zonas, se denominan según el lugar primario de afectación: mediastínico (tímico), alimentario o multicéntrico. El linfoma asociado a FeLV tiende a originarse en los linfocitos T (Jarret, 2001; Schaer, 2006; Dunham *et al.*, 2008; Tizard, 2009), no obstante FeLV no debe ser considerado como la principal causa de tumores en los felinos (Stützer *et al.*, 2011).

El linfoma mediastínico surge en el área del timo y finalmente causa un derrame pleural maligno. El signo más frecuente es la disnea, pero puede observarse regurgitación por presión en el esófago o síndrome de Horner por compresión de nervios simpáticos en la entrada torácica. Tres cuartas partes de los casos con linfoma tímico se asocian a FeLV y la mayoría se generan en gatos jóvenes (Pastoret *et al.*, 1998; Greene, 2000; Dunham *et al.*, 2008).

Los signos clínicos del linfoma alimentario incluyen vómitos o diarrea, sin embargo algunos gatos presentan solo anorexia y pérdida de peso. Los tumores del estomago y los intestinos pueden ser focales o difusos y por lo general se afectan los linfonodos mesentéricos. Es más prevalente en gatos mayores, aproximadamente el 25% de los casos de linfoma digestivo se asocian a FeLV (Pastoret *et al.*, 1998; Greene, 2000; Dunham *et al.*, 2008).

En los linfomas que se clasifican como multicéntrico hay una invasión importante de varios sitios. Puede afectarse cualquier órgano, como el área retrobulbar, cavidad nasal, encías, piel, hígado, vejiga urinaria, cerebro y pulmones. El linfoma renal suele ser bilateral y no causa signos de afección hasta que se infiltran de manera extensa los riñones y ocurre insuficiencia renal. Los riñones están aumentados de tamaño y siempre son irregulares. El linfoma epidural puede causar el inicio súbito o gradual de parálisis posterior. El 90% de los casos de linfoma multicéntrico se han asociado a FeLV y estos tienden a producirse en gatos con una edad aproximada de 4 años (Greene, 2000; Dunham *et al.*, 2008).

3.4.1.2 Leucemias.

Todas las líneas de células hematopoyéticas son susceptibles a transformación por FeLV. Los signos clínicos de la leucemia aguda se relacionan con la pérdida de células hematopoyéticas normales: anemia (letargo), granulocitopenia (sepsis) y trombocitopenia (hemorragias). Suele haber esplenomegalia, en ocasiones con infiltración maligna y a veces con hematopoyesis extramedular (Greene, 2000; Schaer, 2006).

Las leucemias crónicas son raras en gatos y no se sabe que tengan relación con FeLV (Greene, 2000).

3.4.2 Supresión de la médula ósea.

Anemia.- Algunos gatos virémicos presentan anemia leve (Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular-CMHC 20-30%), que se denomina anemia de la enfermedad crónica, posterior a una infección o de estrés. Si se trata el problema subyacente suele aumentar el CMHC espontáneamente aún cuando el gato permanece positivo a FeLV. Si la anemia es más grave (CMHC <20%) puede estar indicado aspirar medula ósea para descartar leucemia y determinar si existen números adecuados de precursores eritroides con maduración normal. La anemia aislada grave (CMHC <15%) sin regeneración sugiere infección con el subgrupo C (Greene, 2000; Jarret, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002; Dunham *et al.*, 2008). La pancitopenia o anemia aplásica grave incluye todas las líneas celulares y la citología de la médula ósea suele ser hipocelular. Estos gatos casi siempre son positivos a FeLV y refleja una etapa avanzada de la enfermedad hematológica (Greene, 2000).

Anormalidades de las plaquetas.- Es posible que ocurra trombocitopenia secundaria y disminución de la producción de plaquetas por supresión medular o infiltración leucémica. Algunas plaquetas pueden tener casi el tamaño de los eritrocitos e incrementar de manera falsa la cuenta de eritrocitos y disminuir la de las plaquetas. En algunos gatos la cuenta de plaquetas puede aumentar (Greene, 2000).

Anormalidades de leucocitos.- La cuenta de granulocitos o linfocitos puede estar reducida en gatos virémicos. Los gatos con granulocitopenia suelen presentar infecciones bacterianas recurrentes o persistentes (Greene, 2000; Schaer, 2006).

3.4.3 Inmunosupresión.

Los gatos virémicos están predispuestos a infecciones sobre todo por inmunosupresión, al estar alterada la función de las células T; además tienen mayor riesgo de infecciones bacterianas (estomatitis, piodermas, salmonelosis), rickettsiales (hemobartolosis), virales

(inmunodeficiencia felina, peritonitis infecciosa, infección de vías respiratorias superiores, panleucopenia felina), protozoarias (toxoplasmosis) y micóticas (aspergilosis y criptococosis) (Greene, 2000; Jarret, 2001; Schaer, 2006; Tizard, 2009).

Mueren más gatos debido a la inmunosupresión que con otros cuadros clínicos de la enfermedad. En estudios *in vitro* se han visto supresión funcional de los linfocitos T y B en gatitos infectados de forma persistente, aunque los linfocitos T estaban más afectados. Las respuestas inmunitarias humorales a los antígenos dependientes de linfocitos T fueron más débiles en los gatos infectados, lo que indica que una función incorrecta de linfocitos T CD4⁺ temprana en los gatos con viremia persistente podría afectar negativamente a la respuesta humoral. El número de linfocitos B disminuye notablemente en las primeras fases de la enfermedad, pero después se recupera. También hay un deterioro de los polimorfonucleares. FeLV actúa directamente produciendo un deterioro general y temporal de la capacidad de los linfocitos T para producir y responder a determinadas citocinas (Dunham *et al.*, 2008).

3.5 PATOGENIA

La infección inicial se genera principalmente por vía oronasal en contacto con secreciones nasales, saliva, heces, leche y orina, para posteriormente el virus se replique en el tejido linfático local y área orofaríngea. Sin embargo, en gatos inmunocompetentes el sistema inmune puede eliminar completamente el virus, sin diseminarse sistémicamente y sin ser detectado, a diferencia de los felinos con un sistema inmune ineficaz en donde el virus se replica en linfocitos, monocitos y se disemina por todo el organismo (Greene, 2000; Muñoz, 2001; Palmero, 2008).

3.5.1 Fases de la infección por FeLV.

En la VIREMIA PRIMARIA el gato tiene fiebre y linfadenopatía. El virus se disemina al timo, bazo, nódulos linfáticos y glándulas salivales. Esta fase dura entre 3 y 16 semanas y en algunas ocasiones hasta 1 año (Ver figura 2) (Palmero, 2008).

En la fase de VIREMIA TRANSITORIA el sistema inmune puede eliminar el virus antes de que éste llegue a médula ósea y esto ocurre en el 30-40% de los gatos infectados. Desarrollan respuesta inmune eficaz por neutralización de anticuerpos que los protege frente a futuras infecciones, sin una duración permanente (Ver figura 2). Se recomienda vacunar anualmente contra leucemia felina para aumentar su inmunidad natural (Jarret, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002; Palmero, 2008).

En el felino VIREMICO PERSISTENTE cuando el sistema inmune no logra eliminar el virus, éste llega a médula ósea (30-40%). Las células hematopoyéticas producen granulocitos y plaquetas infectadas que circulan por el cuerpo. El provirus, se mantiene de por vida en las células de la médula ósea del animal con niveles altos de virus (1 ml de saliva con 1 millón de virus) (Ver figura 2) (Jarret, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002; Palmero, 2008).

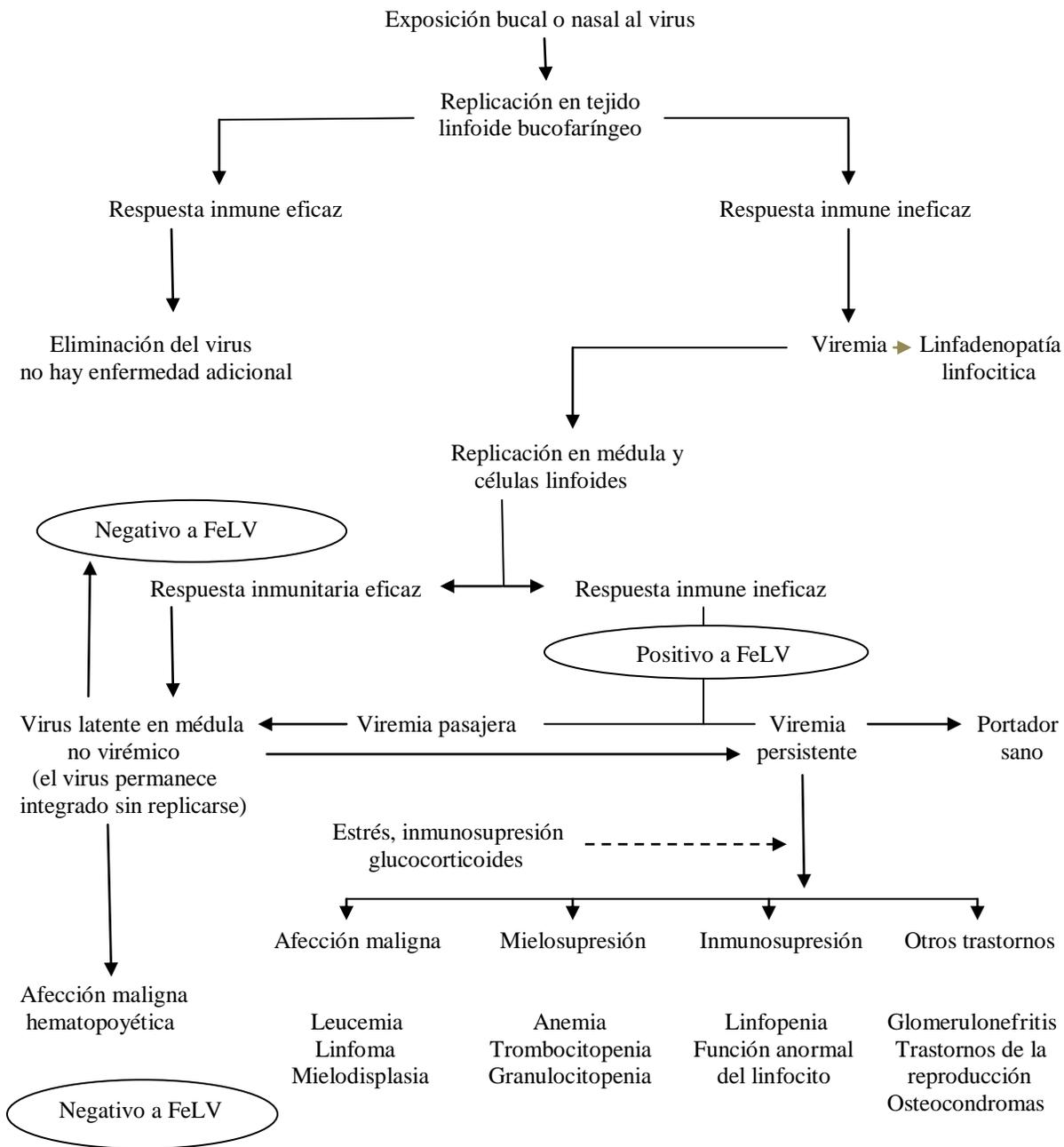
En el PORTADOR LATENTE cuando la viremia desaparece, el provirus se localiza en las células de la médula ósea y solo la división de estas células producirá nuevas partículas virales, en un porcentaje bajo de gatos (Jarret, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002; Palmero, 2008). No son infecciosos, pero la infección latente se puede reactivar mediante inmunosupresión y estrés intenso como en la etapa de preñez y lactación, donde puede aparecer viremia con eliminación de virus por saliva y leche (Ver figura 2) (Jarret, 2001; Palmero, 2008). Los resultados de laboratorio encontrados en cada fase se pueden ver en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de laboratorio en las diferentes fases de la enfermedad de FeLV.

PRUEBA	RESULTADO					
	VIREMIA PRIMARIA	VIREMIA TRANSITORIA	VIREMIA TRANSITORIA meses después	VIREMIA PERSISTENTE	VIREMIA PERSISTENTE meses después	LATENCIA
ELISA	+	+	-	+	+	-
IFA	-	+/-	-	+	+	-
PCR sangre	+	+	-	+	+	-
PCR médula	-	+	+	+	+	+

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente, IFA: Inmunofluorescencia Indirecta, PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Figura 2. Patogenia de la infección por FeLV.



Modificado de Greene, 2000.

3.6 RESPUESTA INMUNE EN FeLV

Los mecanismos con los que cuenta el sistema inmune del gato para enfrentar la infección por FeLV son:

3.6.1 Inmunidad humoral

Anticuerpos neutralizantes (AcN).

Los AcN se generan predominantemente contra los epítopes localizados en la cubierta del virus (gp70) y a la proteína transmembranal (p15). Impiden la unión del virus al receptor celular, por lo que no se produce la entrada al interior de la célula. Felinos recién nacidos de madres inmunes al FeLV pueden protegerse mediante la transferencia pasiva de anticuerpos maternos; los AcN se presentan en concentraciones elevadas en gatos que se han recuperado. Los AcN pueden estar presentes en sueros de gatos que están infectados y son virémicos de forma persistente; sin embargo, la mayoría de los gatos que se recuperan producen títulos altos de AcN al principio de la infección. Por lo tanto, la presencia de un título alto de AcN es un buen indicador de la infección (Flynn *et al.*, 2002; Porras, 2007; Dunham *et al.*, 2008). También se generan anticuerpos frente a otros antígenos virales, como la proteína de la cápside p27 y contra antígenos en la membrana celular asociados a oncovirus felinos (anti-FOCMA) (Porras, 2007).

3.6.2. Inmunidad celular

Aparecen linfocitos T CD8+ citotóxicos una o dos semanas después de que se produce la infección y previo a la aparición de anticuerpos neutralizantes. Los linfocitos T citotóxicos (Tc) tienen la capacidad de controlar la replicación del FeLV y mediar la recuperación de los gatos. Los gatos recuperados a la exposición experimental del FeLV desarrollan respuestas tempranas de Tc y se mantienen hasta que el virus infeccioso se elimina del torrente sanguíneo. Los gatos que no se recuperan, tras el desafío experimental, los Tc son de vida corta y retardada. Los Tc se encuentran en concentraciones más altas en los gatos vacunados y gatos que se han recuperado, si se comparan con aquellos con viremia persistente que no han sido vacunados (Flynn *et al.*, 2002; Porras, 2007; Dunham *et al.*, 2008).

3.6.3 Citocinas

La infección por FeLV induce cambios en la síntesis de citocinas originando alteraciones de las funciones de las células inmunes (proliferación, desarrollo de apoptosis) que contribuyen a la patogenicidad (Collado, 2007; Porras, 2007; Gómez-Lucía, 2009).

Se ha descrito un incremento del Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y una disminución de la interleucina-2 (IL-2) e IL-4, con reportes variables sobre la producción de interferón γ (IF- γ) (Pastoret *et al.*, 1998; Porras, 2007).

Se menciona que un aumento de TNF- α favorece la patogenia de la enfermedad. Los subgrupos de FeLV presentan diferencias en la proteína de superficie gp70. El subgrupo A y el subgrupo C presentan tropismo por los macrófagos los cuales tienen un papel importante en la síntesis de citocinas, pero se ha visto que el FeLV-C es el que se expresa en mayor cantidad en macrófagos, produciendo niveles mayores de TNF- α . Los mayores niveles de expresión de FeLV-C en los macrófagos se correlacionan con los altos niveles de TNF- α , por lo que parecen jugar un papel en la supresión de la hematopoyesis induciendo la aplasia eritrocitaria observada en la infección por FeLV (Khan, 1993; Porras, 2007).

La inmunosupresión de los linfocitos T CD4+ en los gatos infectados es previa al desarrollo de la fase clínica, lo que puede agravar la patogenia de la enfermedad, ya que con el progreso de la fase clínica los linfocitos T CD4+ tienen menor capacidad de responder a la estimulación con mitógenos (que induce mitosis de linfocitos) y por lo tanto hay menor producción de IL-2 (Porras, 2007).

Es posible que el IF- α y el IF- γ ejerzan una acción directamente inmunomoduladora al aumentar la respuesta inmune e impedir la expansión del virus desde las células ya infectadas. Así mismo el IF- α también puede tener efectos directos sobre la expresión vírica (Porras, 2007).

3.6.4 Respuesta inmune frente a la vacunación.

La mayor parte de las vacunas inducen una respuesta inmune humoral. Todas las vacunas estimulan la formación de anticuerpos neutralizantes frente a la glucoproteína gp70 de FeLV, ya que es altamente inmunogénica (Palmero, 2010).

3.7 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO.

El uso de pruebas de diagnóstico para detectar FeLV se recomienda en diferentes circunstancias como son:

- Debido a la inespecificidad de los signos clínicos asociados a la infección de FeLV, se recomienda realizar pruebas para la detección de la infección por este virus a todos los gatos enfermos (Schaer, 2006).
- Gatos nuevos en el hogar (adopciones) (Carter *et al.*, 2005).
- Gatos con exposición reciente o de alto riesgo (Carter *et al.*, 2005).
- A todos los gatos antes de vacunarlos (Carter *et al.*, 2005).

Existen pruebas de diagnóstico para detectar la proteína de la cápside p27 del FeLV, el virus completo o el ADN proviral integrado. Además, existen pruebas de detección

selectiva como las pruebas de inmunocromatografía comerciales y las pruebas de ELISA que detectan la proteína p27 del FeLV libre en el plasma (Dunham *et al.*, 2008; Palmero, 2008).

Se han desarrollado diferentes pruebas para confirmar la enfermedad como son: el aislamiento del virus por lo que resultados positivos indican viremia activa. Sin embargo la prueba puede requerir tiempo para el cultivo, ya que requiere de hasta de 10 días como mínimo para un diagnóstico, además es caro y laborioso. La prueba de inmunofluorescencia detecta la presencia de p27 del virus dentro de los leucocitos circulantes en un frotis de sangre fijado y por lo tanto detecta con precisión el estado de viremia (Jackson *et al.*, 1993). La prueba de PCR es una prueba específica y sensible que se utiliza para detectar ADN proviral del FeLV en los leucocitos circulantes (Jackson *et al.*, 1993). Es probable que todos los gatos que hayan tenido contacto con el virus FeLV sean provirus-positivos y lo sigan siendo incluso tras la recuperación. La PCR cuantitativa puede usarse para determinar carga viral (Dunham *et al.*, 2008).

Las pruebas de laboratorio se pueden realizar a gatos de cualquier edad no obstante en caso de cachorros, deben hacerse 2 pruebas desde que nacen y con un intervalo de 12 semanas. A los gatos virémicos debe repetirse la prueba a las 12-16 semanas, con el fin de predecir la evolución de la infección y proporcionar un tratamiento para una mejor calidad de vida de los animales (Dunham *et al.*, 2008).

3.7.1 ELISA

La prueba de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno anticuerpo quedará inmovilizada, y por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Coll, 1993; Cultek, 2006; Tizard, 2009).

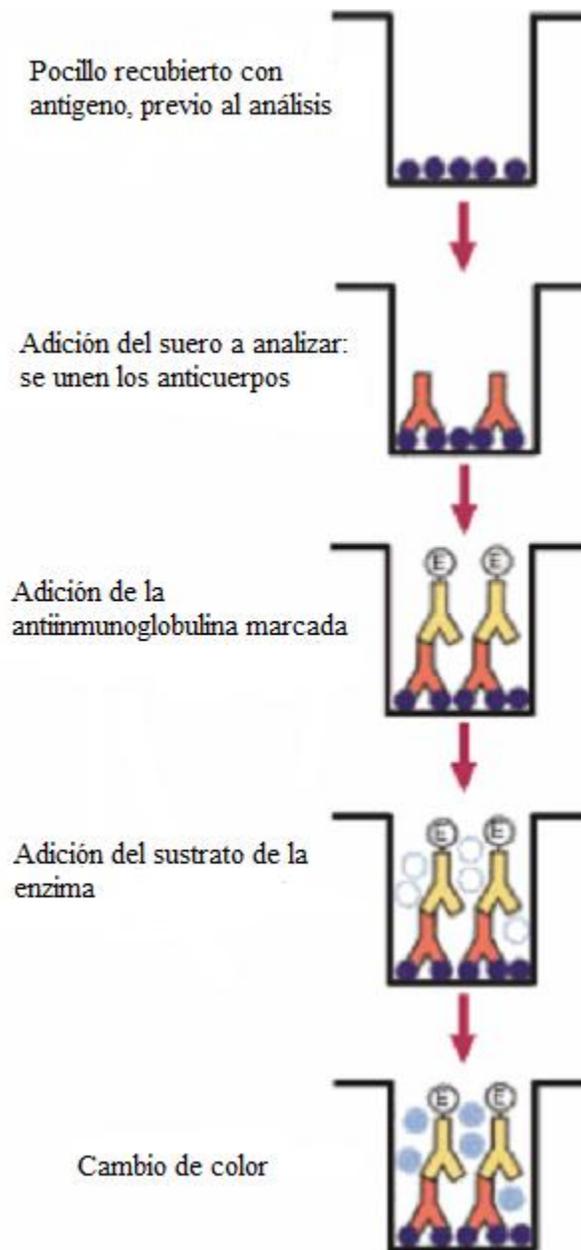
3.7.1.1 ELISA Directo.

Permite la fijación y detección de antígenos virales de FeLV a partir de muestras clínicas, con la adición de anticuerpos marcados con una enzima (conjugado); si los anticuerpos reaccionan con los antígenos el sustrato es capaz de reaccionar con la enzima y permite leer en forma visual o colorimétrica el producto final (Coll, 1993; Cultek, 2006).

3.7.1.2 ELISA Indirecto.

Esta variante permite detectar anticuerpos, (Ver figura 3) sin embargo las pruebas comerciales solo detectan antígeno vírico extracelular libre en plasma (proteína de la cápside vírica p27). Las cuales parecen tener buena sensibilidad y especificidad (Coll, 1993; Cultek, 2006).

Figura 3. Desarrollo de un ELISA indirecto.



Tizard, 2009.

3.7.2 IFD (Inmunofluorescencia directa).

La inmunofluorescencia directa es una prueba serológica aplicada fundamentalmente a la detección de antígenos en una muestra clínica (sangre o médula ósea) (Benito *et al.*, 2005).

Detecta antígeno vírico intracelular (p27) en el citoplasma de linfocitos y plaquetas. Estas células se liberan infectadas a sangre desde la médula ósea invadida por el virus. Se requiere sangre completa con anticoagulante y refrigerada. Un resultado positivo indica viremia persistente (Palmero, 2008).

Los falsos negativos pueden ser gatos virémicos con leucopenia (neutropenia y trombocitopenia) donde solo un pequeño porcentaje de leucocitos periféricos están infectados (Palmero, 2008).

3.7.3 PCR.

A partir de células mononucleares de sangre periférica y células de médula ósea, se puede realizar una PCR cuantitativa (PCRq) y detectar el número de copias de provirus. Siendo factible detectar viremia persistente y virus latente. Es una técnica muy sensible y específica. Sin embargo no se realiza de forma rutinaria en el diagnóstico clínico. Además de la cuantificación del virus se puede realizar a partir de sangre completa, suero, plasma, saliva o heces. Es de gran utilidad en colonias de gatos positivos poco manejables utilizando saliva y/o secreciones (Palmero, 2008).

3.8 TRATAMIENTO.

Las modalidades de tratamiento específico para los gatos infectados por FeLV se dirigen hacia la manifestación clínica de la enfermedad (Greene, 2000; Schaer, 2006; Palmero, 2008).

3.8.1 Tratamiento de linfoma.

La quimioterapia puede ayudar a muchos gatos y unos cuantos presentarán remisiones que tal vez les permitan vivir unos cuantos años más. Antes de considerar el tratamiento, debe confirmarse el diagnóstico de linfoma mediante un diagnóstico complementario, como es: la citología o histología y valorar las condiciones del paciente para determinar el pronóstico (Ver tabla 3) (Greene, 2000; Schaer, 2006).

Tabla 3. Indicadores del pronóstico en el linfoma felino.

Indicador pronóstico	Descripción
Bueno	Tamaño de tumor pequeño. Linfonodos periféricos, cavidad nasal o mediastino como sitio primario. Función normal de órgano vital. Buen apetito, pérdida de peso mínima.
Adverso	Anemia, neutropenia o trombocitopenia. Invasión medular. Parálisis prolongada con linfoma raquídeo. Fiebre, sepsis o infección focal (p. ej., gingivitis, rinitis crónica). Afección de piel o alimentaria. Emaciación o anorexia.

Modificado de Greene, 2000.

Los fármacos que se administran con mayor frecuencia en combinaciones incluyen ciclofosfamida, vincristina y prednisona (COP). En ocasiones estos medicamentos se combinan con doxorrubicina (COPA). El protocolo para COPA se muestra en la Tabla 4, en el cual la ciclofosfamida se da a una dosis de 300 mg/m² vía oral, redondear la dosis a los 25 mg más cercanos en el extremo bajo de la dosis; la vincristina a 0.75 mg/m² Intravenosa (IV); la prednisona 2 mg/kg vía oral diario. A partir de la semana 7 doxorrubicina (25 mg/m² IV) en sustitución de la ciclofosfamida y la vincristina. El tratamiento se continúa cada 3 semanas hasta una recaída o 22 semanas de remisión continua. En seguida se suspende el tratamiento y se disminuye de manera gradual la prednisona durante 3 semanas (Greene, 2000; Schaer, 2006).

Tabla 4. Protocolo de la terapéutica COPA para el tratamiento de linfoma felino.

Terapéutica	Número de semana																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	19	22	
Ciclofosfamida	1			1													
Vincristina	1	1	1	1													
Prednisona	1
Doxorrubicina							1			1			1	1	1	1	

Greene, 2000.

Todos estos medicamentos son inmunosupresores y algunos mielosupresores, por lo que los propietarios deben vigilar la presencia de signos de enfermedad. El problema más frecuente que se relaciona con la quimioterapia en gatos es la anorexia secundaria a la afección maligna, el tratamiento o ambos. La ciproheptadina (2-4 mg/día) o el acetato de megestrol

(2.5 mg/día durante 3-4 días) ayudan a estimular el apetito. El tratamiento se suspende después de 6 meses de remisión completa continua (Greene, 2000). Algunos gatos pueden sobrevivir 2 años más (Palmero, 2008).

3.8.2 Tratamiento de leucemia aguda.

Es difícil tratar a estos gatos porque la médula se llena con células blasto neoplásicas, que deben eliminarse, incluso hasta suprimir por completo la médula para eliminar las células neoplásicas, antes de que sea posible que invadan de nuevo precursores hematopoyéticos normales. En el tratamiento de leucemia o linfoma maligno no se utilizan de manera profiláctica los antibióticos. Se utilizan antibióticos bactericidas si se observa fiebre u otros signos de infección, en especial cuando la leucocitosis es más baja. De los gatos tratados con Vincristina y prednisona solo el 25% presenta remisión (Greene, 2000).

3.8.3 Tratamiento de enfermedades mielosupresoras.

La transfusión sanguínea es el tratamiento más importante en la anemia no regenerativa. La prednisona puede aumentar el tiempo de vida de los eritrocitos si algún componente de la anemia es de mediación inmunitaria, aunque los glucocorticoides solo tienen eficacia en ocasiones debido a que no es probable que la hemólisis de mediación inmunitaria sea un componente mayor de la anemia por FeLV (Greene, 2000).

En gatos con anemia relacionada a FeLV a veces es útil el tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (100 U/kg subcutánea (SC) 3 veces a la semana) para aumentar la CMHC (Greene, 2000).

En cuadros de anemia por FeLV aplicar Interferon ω felino (Virbagen Omega®) 1MU/kg/SC durante 5 días. En el día 14 revisar el hematocrito, si se ha recuperado el tratamiento es eficaz y la esperanza de vida aumenta. Se deberá volver a inyectar otras 2 veces durante 5 días consecutivos a los 14 días y a los 60 días. Si el hematocrito no aumenta no debería seguirse utilizando (Palmero, 2008).

En algunos gatos FeLV (+), neutropénicos, es posible que la maduración en la médula ósea se detenga en las etapas de mielocito y metamielocito. En estos pacientes el conteo de neutrófilos se corrige mediante dosis antiinflamatorias a inmunosupresoras de glucocorticoides (posible mecanismo de mediación inmunitaria). En gatos con hipoplasia mieloide y ausencia de precursores mieloides se sospechan efectos directos de FeLV. El tratamiento con G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) recombinante humano produce respuestas pasajeras pero se forman anticuerpos en el transcurso de 2-3 semanas (Greene, 2000).

3.8.4 Recomendaciones para portadores sanos positivos a FeLV.

Cualquier enfermedad que se presente debe diagnosticarse y tratarse de la misma forma que se trataría un gato negativo a FeLV (Greene, 2000).

Se debe dar tratamiento precoz y agresivo a las complicaciones bacterianas, parasitarias etc. a las que son más susceptibles debido a la inmunosupresión que padecen aunque no sea detectable ya que la respuesta inmune mediada por anticuerpos está afectada en todos los gatos infectados por FeLV (Palmero, 2008).

El FeLV no causa fiebre por sí mismo, de modo que en gatos febriles es necesario identificar la infección concurrente. Las fiebres de origen desconocido que no responden a antibióticos pueden ser virales, protozoarias o micóticas. La neutropenia secundaria a la supresión de médula ósea por FeLV puede ser otro factor que dificulte el tratamiento de infecciones bacterianas. Los glucocorticoides deben evitarse a menos que un problema específico lo indique (Greene, 2000).

3.8.5 Antivirales e inmunoterapia.

Ningún tratamiento es eficaz para suprimir la infección por FeLV. Como el virus se integra al genoma es difícil eliminarlo de la célula infectada. Los medicamentos antirretrovirales que se emplean en gatos incluyen Zidovudina (AZT) y 9-(2-fosfonil-metoxi-etil) adenina (PMEA) (Greene, 2000; Schaer, 2006).

Los inhibidores de la transcriptasa inversa como el AZT, suprimen la replicación viral pero no eliminan el virus. La dosis es de 5-10 mg/12 hrs vía oral. Se debe realizar biometría hemática cada semana, si el hematocrito llega a 20% se debe suspender el tratamiento, sólo en infección temprana. Se ha observado en estudios experimentales que el tratamiento evita la llegada del virus a médula ósea. En infecciones naturales, sin embargo, no se obtienen tan buenos resultados. Sí mejora el estado clínico y la calidad de vida, aumentando la esperanza de vida en algunos gatos (Greene, 2000; Schaer, 2006; Palmero, 2008).

El PMEa tiene una respuesta clínica más satisfactoria pero con mayores efectos adversos que aquellos tratados con AZT (Greene, 2000).

Se ha utilizado interferon- α humano experimentalmente para estimular la respuesta inmune contra el virus en los gatos, pero aún hacen falta más estudios en gatos con infección natural. Se utiliza protocolo de 60 UI/24 hrs. vía oral en semanas alternadas. Se prepara una dilución que contenga 60 UI en 1 ml y se aplican semanalmente vía parenteral, el resto del producto se mantiene congelado. Con esta dosis reducida es posible utilizarla sin que exista riesgo de estimulación y desarrollo de anticuerpos anti-interferon por el gato. Mejora la

supervivencia y el estado general del gato (Pastoret *et al.*, 1998; Greene, 2000; Schaer, 2006; Palmero, 2008).

El Interferón omega felino disminuye las manifestaciones clínicas y aumenta el tiempo de sobrevida, pero no ayuda a revertir la viremia. Se utiliza el mismo protocolo que en la anemia por FeLV (Palmero, 2008).

3.9 PREVENCIÓN

En la prevención se incluyen la vacunación y la restricción en la salida de gatos al exterior de sus hábitats para disminuir la exposición (Birchard *et al.*, 1996). En la actualidad existen varias vacunas en el mercado que ofrecen una protección relativamente buena frente a FeLV (Ver tabla 5) (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006; Jarrett *et al.*, 1996). La realización sistemática de las pruebas, así como la vacunación de gatos con riesgo de infección, son los factores clave en la prevención del FeLV (Carter *et al.*, 2005; Schaer, 2006).

En México se comercializan las siguientes vacunas:

Tabla 5. Vacunas de FeLV disponibles en México.

Vacuna	Laboratorio	Adyuvante	Vía de administración	Otras características
Leucogen	Virbac	Quil A Hidróxido de aluminio	SC e IM	Contiene el epítotope de la glicoproteína gp70 llamado p45.
PUREVAX RCPCh FeLV	Merial	No tiene	SC	Vacuna recombinante expresada en el virus de la viruela del canario.
Leukocell 2	Pfizer	Hidróxido de aluminio	SC	Virus inactivado.

3.10 CONTROL

Detectar gatos portadores del FeLV mediante pruebas de diagnóstico (Weijer *et al.*, 1989; Birchard *et al.*, 1996; Jarret, 2001; Palmero, 2008).

Vacunar gatos seronegativos al virus (Muñoz, 2001; Tilley *et al.*, 2008).

Evaluar a todos los gatos que habitan un inmueble donde conviven gatos positivos a FeLV. Deben separarse los gatos positivos y los gatos negativos. Idealmente realizar otra prueba a las 12 semanas separar a los seropositivos (Birchard *et al.*, 1996; Palmero, 2008).

Además los gatos infectados no deben salir a la calle para no diseminar la infección (Muñoz, 2001; Palmero, 2008). Mantener un calendario de vacunación para prevenir otras infecciones (Weijer *et al.*, 1989; Jarret, 2001; Palmero, 2008), así como una desparasitación interna y externa (Palmero, 2008).

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar en una prueba de ELISA indirecta la proteína gp70 (p45) del Virus de la Leucemia Felina (FeLV), para determinar su eficacia como antígeno inmunodominante en la detección de anticuerpos en sueros de gatos con infección natural por FeLV.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Utilizar placas de ELISA tapizadas con una fracción de la proteína vacunal gp70 (p45) del Virus de la Leucemia Felina (FeLV) y estandarizar la técnica de ELISA indirecta evaluando una población de sueros felinos infectados naturalmente.
- b) Estandarizar la técnica de Western blot (WB) con la proteína p45 y probar la población de sueros evaluados en la ELISA indirecta.
- c) Comparar los resultados obtenidos en las pruebas serológicas (ELISA indirecta y WB) con la población de sueros felinos evaluados.
- d) Realizar los cálculos de los valores de sensibilidad, especificidad y concordancia (valor κ).

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 POBLACIÓN DE SUEROS.

Se utilizó un lote de 81 sueros de gatos previamente obtenidos y evaluados por otras metodologías diagnósticas (Zagal 2011), conservados a -20° C. Estos sueros fueron recolectados de clínicas veterinarias, de gatos de casa y de antirrábico, además, los sueros provenían de machos (n= 42) y hembras (n= 35) de diferentes edades.

5.2 ANTÍGENO.

Se utilizó como antígeno para tapizar placas de 96 pozos de ELISA y para realizar el Western Blot la proteína recombinante contenida en la vacuna Leucogen® (Virbac) que es parte de las proteínas de envoltura del FeLV responsables de la respuesta protectora inmune (p45 parte proteica de la glicoproteína gp70) del subtipo viral A.

El fabricante del biológico indica que las dosis son únicas y que cada ml. contiene 102µg de p45, con adyuvantes Quil A (10µg/dosis) e hidróxido de aluminio (3mg/dosis).

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

Para determinar la concentración de proteínas de la vacuna de Leucogen® se utilizó un micrométodo utilizando el reactivo de Bradford. Para esto se preparó una solución estándar de proteína a una concentración de 10 mg/ml de gammaglobulina (γGB) para posteriormente realizar una dilución 1:10 (30µl/270µl) de SSF (solución de trabajo).

Con la solución de trabajo se hicieron las siguientes diluciones mostradas en la Tabla 6 las cuales se realizaron por duplicado.

Se realizó una dilución de 1:25 de la vacuna en SSF (4µl vacuna en 96µl SSF) realizando al mismo tiempo una dilución de la solución Bradford 1:5 (1.2 ml sol. Bradford en 4.8 ml SSF). Posteriormente se realizaron diferentes diluciones 1:10, 1:50 y 1:70 de la vacuna con SSF. Se utilizó una placa de 96 pozos para colocar 20µl de muestra problema y 180µl de solución Bradford; posteriormente se realizó la lectura de la densidad óptica de la curva de proteína a una longitud de onda de 570nm. De la lectura de las diferentes diluciones de la curva patrón y de la vacuna se determinó la concentración de proteína expresada en mg/ml de proteína.

Tabla 6. Diluciones realizadas para determinar la concentración de proteína de la vacuna de Leucogen®.

µg	µl γGB	µl SSF
0	0	80
	0	80
1	4	76
	4	76
2	8	72
	8	72
4	16	64
	16	64
8	32	48
	32	48
16	64	16
	64	16

5.4 ELECTROFORESIS DEL ANTÍGENO.

Con el fin de valorar el perfil electroforético de las proteínas del antígeno vacunal, se preparó la muestra y se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS); para esto se prepararon diversas soluciones (Apéndice) para preparar el gel separador (12%), el gel concentrador (4%) y el buffer de corrida. El gel se colocó en la cámara de electroforesis y se adicionó 300 µl de muestra (150 µl del antígeno vacunal + 75 µl de buffer de lisis y 75 µl de buffer de muestra) y 5 µl de marcador de pesos moleculares. La cámara se llenó con buffer de corrida 1x y se corrió a 100 volts constantes el tiempo suficiente para que migraran las proteínas por el gel separador. Posteriormente se tiñó con azul de coomasie, se lavó y el exceso fue eliminado con solución desteñidora para su observación y análisis.

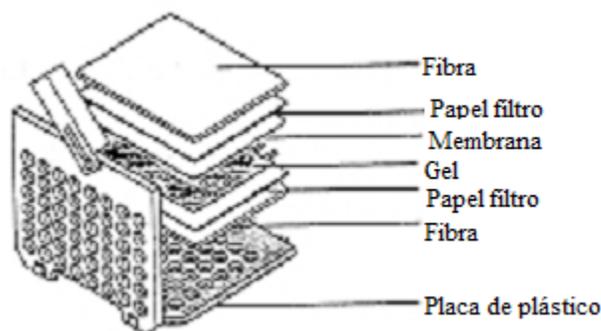
5.5 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Se preparó un sándwich con el gel de poliacrilamida como se muestra en la Figura 4. Este sándwich se colocó en la cámara de transferencia humedecido con buffer de transferencia (Apéndice) y se aplicó una corriente de 200 mA constantes durante 1hr 15 minutos. Ya transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, esta se lavó 3 veces durante 5 minutos con buffer de lavado (Apéndice) y fue colocada en una solución de buffer de bloqueo (Apéndice) a 4°C por 16 horas, al final se lavó y se secó la membrana y se almacenó a -20° C hasta su uso.

Para realizar el Western blot la membrana se cortó en tiras de 3mm. de ancho, en estas tiras de forma individual se evaluaron cada suero problema y se colocaron los respectivos

controles negativos y positivos diluidos 1:50 con buffer de dilución (Apéndice) incubándose a 37° C por una hora para posteriormente lavar con buffer de lavado durante 3 veces por 5 min. Después se adicionó a cada tira un anti IgG de gato peroxidado diluido 1:1000 en buffer de dilución y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados y se adicionó el sustrato (Apéndice), la reacción se detuvo con agua corriente hasta el momento de la aparición de color evidente en los controles positivos.

Figura 4. Sándwich para transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa por el método húmedo.



5.6 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA (ELISA_i).

Se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pozos con 50 µl por pozo del antígeno vacunal a una concentración de 1000 ng/pozo. Para lo cual se preparó 6 µl de antígeno en 5 ml. de buffer del antígeno para sensibilizar la placa. Se incubó a 4° C durante 72 horas. Posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS Tween con 300 µl por pozo cada 5 minutos.

Se bloqueó la placa con una solución que contenía 0.45gr de leche descremada (3%) y 15ml. de PBS-Tween a esta solución se le quitaron 1.5 ml. para adicionarle 1.5 ml. de suero de cerdo (10%). A cada pozo se le adicionó 150 µl de esta solución y se dejó incubar durante 1 hora a 37° C. Posteriormente se lavó 4 veces con PBS-Tween cada 5 minutos con 300 µl cada pozo.

Se le agregaron los sueros problema junto con los controles positivo y negativo, se realizaron diluciones 1:10 de cada suero y se trabajó por duplicado para los controles y sueros problema. Se colocaron 100µl/pozo de buffer de dilución con suero problema. La placa se incubó a 37° C durante 1 hora y al finalizar ésta se realizaron 4 lavados como previamente se ha descrito.

Se agregó el conjugado anti IgG de gato peroxidado (100µl/pozo) previamente diluido en buffer de dilución a una de concentración de 1:5000. Se incubó una hora a 37° C y

posteriormente se lavó 4 veces durante 5 minutos con PBS-Tween. Se adicionó el sustrato 100 μ l por pozo y se incubó en oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente se agregó la solución de paro 100 μ l/pozo y se realizó la lectura en el lector de ELISA a una longitud de onda de 490nm.

La línea de corte de la prueba se estableció a partir del promedio de la densidad óptica de 3 sueros controles negativos en WB adicionándole tres desviaciones estándar al primer valor. De tal forma que el resultado de la densidad óptica de cada suero se dividió entre la línea de corte para determinar su valor final.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se recopilaron con Excel (Microsoft) y se analizaron con el programa estadístico Episcopy Win 2.0.

Una prueba es sensible y específica si es capaz de identificar a todos los que están enfermos como tales y a todos los sanos como tales. La sensibilidad y especificidad máxima es de un 100%.

Para evaluar el nivel de concordancia entre las pruebas ELISAi y WB se calculó el valor kappa (κ). Kappa es una medida de concordancia más allá de lo que cabría esperar debido a la casualidad. Si no hay concordancia más allá del azar se obtiene un índice kappa de 0, y un kappa de 1 indica una concordancia perfecta. Concordancias moderadas son con un valor kappa de al menos 0.4 a 0.5 (Martin, 1987).

6. RESULTADOS.

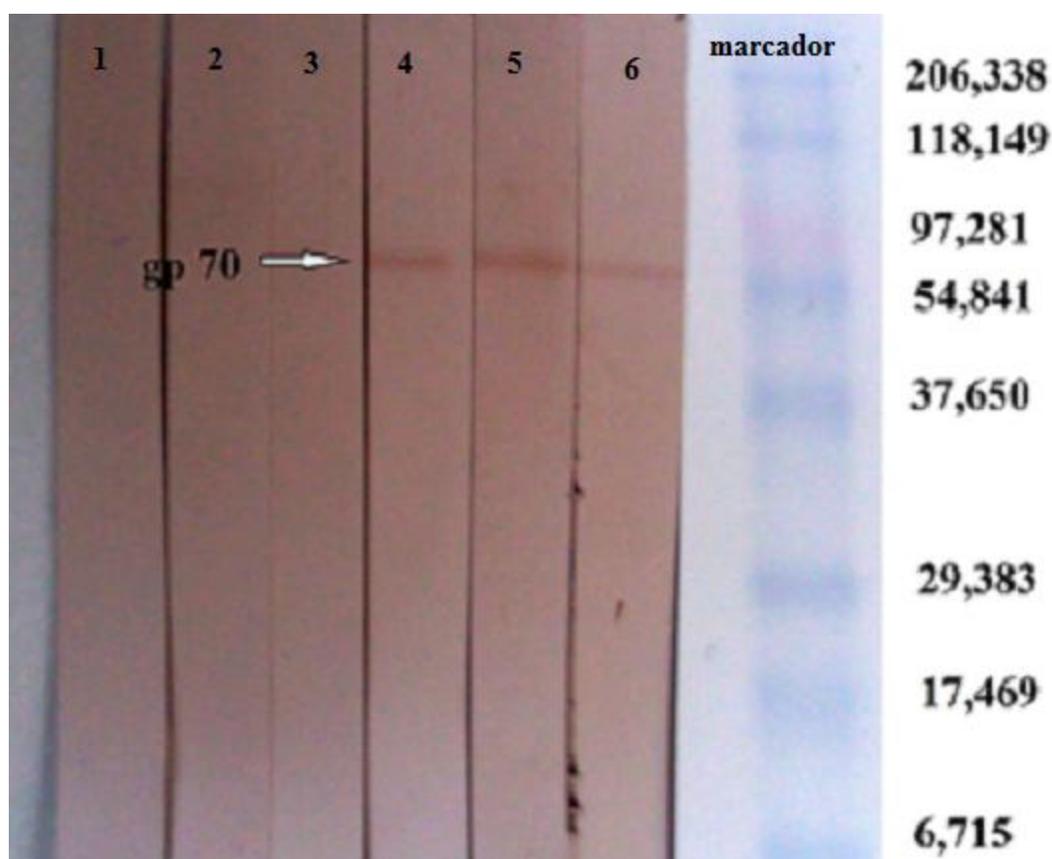
6.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DEL ANTÍGENO VACUNAL.

La concentración obtenida para el antígeno vacunal con el micrométodo de Bradford fue de 16.65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, es decir, 16,650 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6.2 WESTERN BLOT DEL ANTÍGENO VACUNAL.

Se identificó una sola proteína de 70,000 Daltons de peso molecular como se puede observar en la Figura 5; la cual entra dentro del rango del peso molecular de la proteína de envoltura externa gp70 del virus de leucemia viral felina.

Figura 5. Western blot de sueros controles negativos y positivos que reconocen el antígeno vacunal.



1), 2) y 3) Tres diferentes sueros controles negativos que no reconocen el antígeno vacunal gp70.

4), 5) y 6) Tres diferentes sueros controles positivos que reconocen el antígeno vacunal gp70.

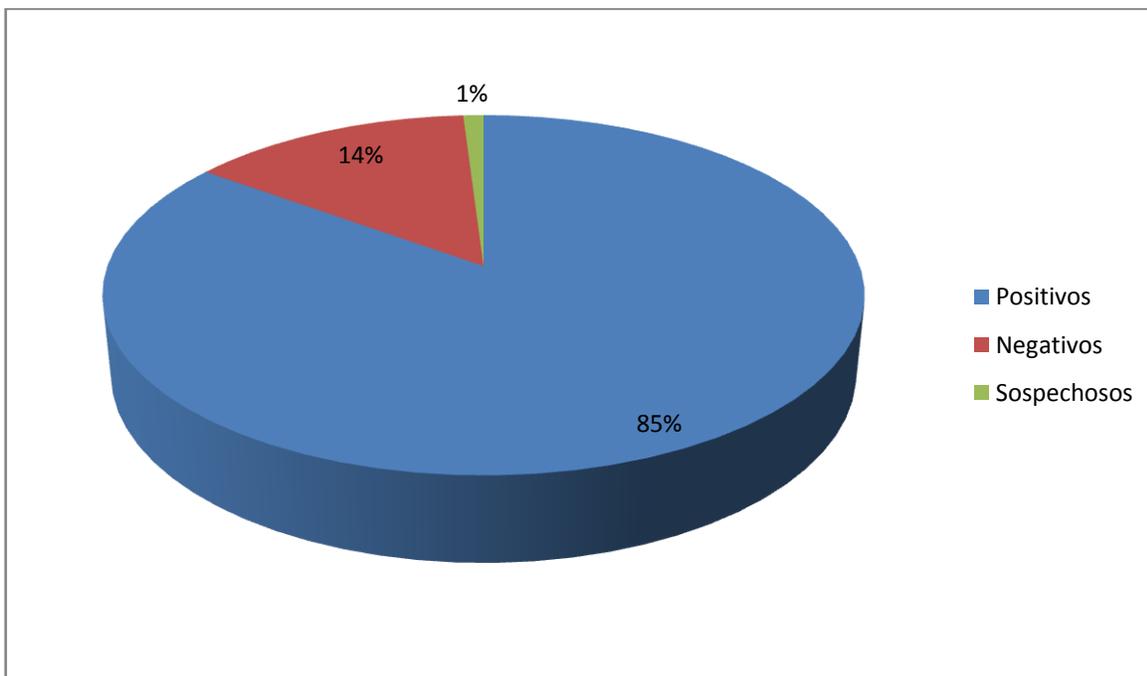
6.3 ELISA INDIRECTA.

De los 81 sueros evaluados con la prueba de ELISAI se obtuvieron los siguientes resultados: 69 gatos positivos (85%), 11 gatos negativos (14%) y 1 gato sospechoso (1%) el cual se consideró positivo para el análisis final de los resultados ya que se encontraba muy cerca de la línea de corte. La información se muestra en la Tabla 7 y Figura 6.

Tabla 7. Resultados de la prueba de ELISAI con la proteína gp70 de FeLV.

Resultado	Número de sueros	%
Positivos	69	85%
Negativos	11	14%
Sospechosos	1	1%

Figura 6. Resultados en la población de sueros analizados con el antígeno vacunal gp70 en ELISAI.



6.4 RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN EL ORIGEN DE LOS SUEROS.

Se analizaron los resultados de los sueros en la prueba de ELISAI de acuerdo al origen de los sueros, donde el 74% de sueros provenientes del antirrábico fueron positivos y 26% negativos; 85% de los sueros provenientes de consultorios fueron positivos y 15% negativos y por último, 94% de de los sueros de dueños particulares fueron positivos y 6% negativos, la Tabla 8 muestra estos resultados. El número de sueros analizados por origen

fue de 61 (población con información disponible) de los cuales 23 se obtuvieron del antirrábico, 20 de consultorios y 18 de particulares.

Tabla 8. Resultados de la prueba de ELISAI según la procedencia de los sueros felinos.

Procedencia	ELISA(+)	% ELISA (+)	ELISA(-)	% ELISA(-)
Antirrábico	17	74%	6	26%
Consultorio	17	85%	3	15%
Particular	17	94%	1	6%

6.5 RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN LA EDAD DE LOS GATOS.

También se realizó el análisis de los resultados en la prueba de ELISAI según la edad de los gatos y obtuvimos los resultados que se detallan en la Tabla 9. El mayor porcentaje de gatos positivos a FeLV fue en el rango de 1 a 3 años (94%), en los gatos mayores de 3 años se obtuvo un porcentaje de 92% y los sueros de gatos con menor porcentaje de positivos fue el del rango menor a 1 año (56%).

Tabla 9. Resultados de la prueba de ELISAI según la edad de los gatos del estudio.

EDAD	ELISA (+)	% ELISA (+)	ELISA (-)	% ELISA (-)
< 1 año	10	56%	8	44%
1 – 3 años	15	94%	1	6%
> 3 años	11	92%	1	8%

6.6 RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN EL SEXO.

Se analizaron los resultados obtenidos de la prueba de ELISAI de acuerdo al sexo de los felinos y nos dieron los resultados mostrados en la Tabla 10, en los cuales no hubo mucha diferencia entre ambos sexos (machos positivos 86% y hembras positivas 89%).

Tabla 10. Resultados de la prueba de ELISAI según el sexo de los gatos utilizados en este estudio.

SEXO	ELISA (+)	% ELISA (+)	ELISA (-)	% ELISA (-)
Macho	36	86%	6	14%
Hembra	31	89%	4	11%

6.7 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ELISAI Y WESTERN BLOT.

Para calcular la sensibilidad, especificidad y la concordancia se utilizó como prueba de oro el WB, los resultados de los sueros obtenidos en las diferentes técnicas se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de los sueros evaluados con ELISAI y Western blot.

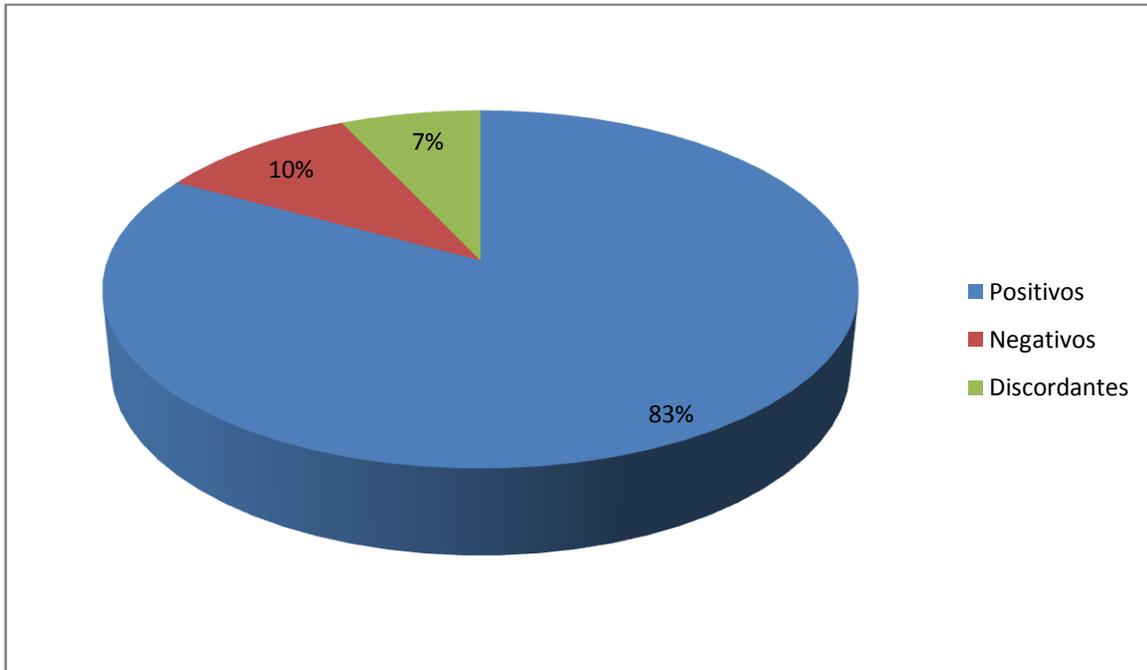
PRUEBA	POSITIVOS	% POSITIVOS	NEGATIVOS	% NEGATIVOS
ELISAI	70	86.4%	11	13.6%
WB	69	85.2%	12	14.8%

Comparando los resultados obtenidos en los sueros de la población de gatos estudiada y evaluados en las pruebas de ELISAI y WB se obtuvieron los siguientes resultados: 67 sueros positivos a las dos pruebas, 8 sueros negativos a las dos pruebas, 6 sueros discordantes, de los cuales 3 fueron positivos a WB y negativos a ELISA y 3 fueron negativos a WB y positivos a ELISA, esto se muestra en la Tabla 12 y la Figura 7.

Tabla 12. Comparación de los resultados obtenidos en los sueros de gatos evaluados en ELISAI y Western blot.

PRUEBAS	NÚMERO DE SUEROS	PORCENTAJE %
WB (+) ELISAI (+)	67	83%
WB (-) ELISAI (-)	8	10%
WB (+) ELISAI (-)	3	3.5%
WB (-) ELISAI (+)	3	3.5%
TOTAL	81	100%

Figura 7. Comparación de los resultados obtenidos en los sueros de gatos evaluados en ELISAI y Western blot.



6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para realizar el cálculo de sensibilidad, especificidad y concordancia (valor kappa) se elaboró el cuadro de contingencia de 2x2 (Tabla 13). Se utilizó el programa Episcopes win 2.0 para calcular dichos valores

Tabla 13. Tabla de contingencia donde se compara la técnica de ELISAI con respecto a WB.

	ELISA (+)	ELISA (-)	TOTAL
WB (+)	67	3	70
WB (-)	3	8	11
TOTAL	70	11	81

Los resultados obtenidos fueron:

Sensibilidad = 95.71%

Especificidad = 72.72%

Concordancia (valor κ) = 0.68

De aquí se deduce que la prueba de ELISAI es una prueba altamente sensible, con buena especificidad y buena concordancia entre ambas pruebas.

7. DISCUSIÓN.

Debido a la dificultad para diagnosticar FeLV por procedimientos clínicos convencionales, aunado a la gran variedad de signos clínicos que produce la enfermedad se requiere la confirmación con pruebas de laboratorio como ELISA, Inmunofluorescencia o PCR (Greene, 2000; Pinches *et al.*, 2007) o kits de diagnóstico rápido y de aplicación en los consultorios, basados en la técnica de ELISA directa. Todas las pruebas que hay disponibles en la actualidad en México son importadas y de elevado costo, por lo que es de suma importancia contar con pruebas disponibles para el diagnóstico de FeLV y sobre todo a un bajo costo y que detecte la infección por la detección de anticuerpos específicos en suero, lo cual fue el objetivo principal del presente trabajo.

El presente estudio fue complementario del trabajo realizado por Zagal, 2011 en donde el resultado de gatos positivos a FeLV fue de 48.2% con la prueba de ELISA indirecta, usando como antígeno para sensibilizar las placas un virus completo vacunal, sin embargo, en el presente estudio se utilizó para sensibilizar las placas la proteína gp70 (p45) vacunal, detectando un mayor número de animales seropositivos (85%) con una prueba de ELISAI similar a la descrita por Zagal, 2011. Una posible explicación de esta diferencia pudiera ser que el antígeno derivado de la envoltura está mucho mejor representado en la vacuna con la proteína gp70 y no así en la vacuna con virus completo, y por otro lado se ha descrito que las proteínas derivadas de la envoltura son inmunodominantes (Tizard, 2009); lo que hace que existan más anticuerpos contra estas proteínas. Es importante mencionar que los resultados de positividad en el ELISAI fueron parecidos a los obtenidos por WB utilizando el mismo antígeno.

Otro aspecto importante que hay que mencionar, es que no se pudo diferenciar los animales infectados naturalmente de los posibles vacunados, ya que al ser tan heterogéneo el grupo de estudio, en algunos casos no fue posible recabar la información con respecto a la vacunación; particularmente en los gatos de antirrábico. Ello podría explicar porque fue tan alto el número de animales seropositivos en el presente estudio. Sin embargo, también existe la posibilidad de que la prevalencia encontrada pueda ser indicativa de la verdadera importancia de la infección de FeLV en gatos domésticos de México, ya que por desgracia no hay datos disponibles de la seroprevalencia de la enfermedad.

En el análisis realizado por grupos, en el presente trabajo se encontró que el número de gatos seropositivos respecto al sexo (machos o hembras) no se muestra diferencia significativa, muy similar a lo descrito por Arjona *et al.*, 2000; Zagal, 2011. Esto indica que no existe diferencia en el riesgo de presentar infección por FeLV entre hembras o machos. Sin embargo, Gleich *et al.*, 2009 describen un mayor porcentaje de machos infectados con FeLV, lo cual puede ser debido al comportamiento de estos al aparearse (peleas).

En el estudio hecho por Zagal, 2011 los sueros de los gatos fueron agrupados por rangos de edad, teniendo en los gatitos menores a 1 año menos seropositivos (36.8%) que en aquellos mayores de 1 año (45.8%). En contraste, en el presente estudio el 56% de los gatos menores de un año resultaron seropositivos a FeLV, lo cual fue un porcentaje mayor en el grupo de gatos que no han alcanzado la etapa adulta, que lo descrito por Zagal, 2011 y muy diferente de los estudios realizados por Beatty *et al.*, 2011, en donde ningún gato menor al año de edad resultó serológicamente positivo a FeLV. La posible seropositividad de animales jóvenes pudiera deberse a la presencia de anticuerpos maternos por infección y/o vacunación o a la propia respuesta inmune a la infección de cada gato. Por otro lado Arjona *et al.*, 2000 dividieron los grupos de estudio en gatos menores a 3 años (jóvenes), gatos de 3 a 8 años (adultos) y en mayores a 8 años (viejos); y mencionan que el 70% (n=126) de los gatos menores de 3 años en su estudio resultaron positivos al FeLV, estos resultados coinciden en el global de animales seropositivos encontrados en el presente estudio, que fue de 71.9%. La mayoría de los animales estudiados en el presente trabajo fueron animales jóvenes, es decir, menores a 3 años de edad. El porcentaje de animales seropositivos fue alto, lo cual puede deberse a diversos factores, entre ellos la presencia de anticuerpos vacunales, lo que remarca que es de suma importancia conocer su historial de vacunación (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2007). Además, la pubertad de los animales puede propiciar la convivencia y la transmisión de la infección (apareamiento entre los 6 y 9 meses) (Feldman *et al.*, 2007); marcando esta edad como la de mayor riesgo de contagio y diseminación de la infección. En este estudio los gatos mayores de 3 años fueron más positivos, y no se sabe si fueron por vacunación o por enfermedad; ya que un número de estos individuos muestreados fueron provenientes de un antirrábico, por lo que se desconoce su estatus inmunológico frente al virus y solo algunos gatos adultos y viejos contaban con dueño y por ende se conocía su historial de vacunación.

Recio *et al.*, 2011 en su estudio, encontraron que los gatos de entre 1 y 3 años son los que tienen mayor incidencia, al igual que en el presente trabajo, en donde en ese mismo rango de edades se encontró la mayor cantidad de gatos positivos y además de concordar por lo descrito en la literatura por Muñoz, 2001.

En cuanto a la procedencia de los sueros se encontraron diferencias significativas comparando las tres fuentes de recolección de muestras con el trabajo realizado por Zagal, 2011. En el presente trabajo los sueros procedentes de gatos del antirrábico, 74% resultaron positivos; en contraste, los resultados obtenidos por Zagal, 2011 fue de 52.6% de seropositivos. De los sueros obtenidos en consultorio, 85% fueron positivos en esta tesis y en el estudio realizado por Zagal fue de 70% positivos. Finalmente en cuanto a los sueros procedentes de particulares, en este trabajo se encontró una seropositividad de 94% y Zagal, 2011 obtuvo una seropositividad de 54.3%. Los resultados obtenidos con el uso del ELISA_i utilizando la proteína gp70 mostraron ser más eficientes en el reconocimiento de gatos seropositivos. No obstante en muchos de estos gatos se desconoce su historia clínica

por lo que resultados positivos pueden deberse a gatos vacunados y es de esperarse que para el caso de los gatos de particulares y de consultorio, se encuentre un mayor porcentaje de gatos seropositivos, ya que generalmente los dueños vacunan a sus mascotas.

Por otro lado, para evaluar la confiabilidad de una prueba diagnóstica, esta debe cumplir algunos criterios. En este caso se evaluó la sensibilidad, la especificidad y la concordancia (valor κ) de la prueba de ELISAI con respecto a WB. La validación de la prueba de ELISAI se realizó con WB, la cual es considerada un estándar de oro para la infección con retrovirus (Ramírez, 2002). Los valores obtenidos fueron de 95.71% de sensibilidad, parecido a lo descrito por Hartmann *et al.*, 2007 quienes realizaron un estudio comparativo de 8 pruebas para la detección de FeLV en los cuales describieron 96.8% de sensibilidad con la prueba de One-step como porcentaje más alto, y 92.1% como más bajo en las pruebas Witness y PetCheck.

Por otro lado el valor de especificidad que se obtuvo en este estudio fue de 72.72% que se puede considerar como bueno, y que difiere de lo encontrado por Hartmann *et al.*, 2007 en donde el porcentaje más alto es de 99.2% para la prueba de PetCheck que utiliza la técnica de inmunocromatografía. La variación puede ser debida en primer lugar a que todos los kits de diagnóstico comerciales detectan antígeno y en la técnica de ELISAI estandarizada en el presente trabajo lo que se detecta son anticuerpos; por otro lado, otro factor importante es el antígeno utilizado, que si bien, se trató de una proteína recombinante, su origen es de una vacuna, la cual contiene otros componentes dentro de su elaboración y lo cual se pudo comprobar al determinar la concentración de proteína por el método de Bradford, en la cual se encontró una baja concentración de proteína, comparada con la descrita como concentración mínima en la ficha técnica del producto. En contraste, en otro estudio realizado por Sand *et al.*, 2010, se evaluó el kit de la prueba Anigen, que es una prueba de inmunocromatografía, en la cual se obtuvo una sensibilidad de 40% y una especificidad del 100%, a la inversa de lo obtenido en el presente estudio, donde la sensibilidad fue más alta (95.71%) y la especificidad más baja (72.72%).

Otro aspecto importante de mencionar con el antígeno vacunal fue que aunque la vacuna indica que contiene la proteína p45, la cual es un epítoto derivado de la proteína gp 70, en la prueba de Western blot no se pudo reconocer dicha proteína; mas sin embargo, si se encontró en los sueros positivos el reconocimiento de una proteína que por el peso molecular corresponde a la proteína de la envoltura gp 70. La razón de porque no fue reconocida la proteína p45, puede ser por diferentes razones que a continuación se pueden hipotetizar: a) la proteína p45 está en tan poca concentración que no es posible reconocerla con la prueba de WB, b) si la proteína p45 es un epítoto de la gp 70 y el sistema utilizado para la expresión fue bacteriano, donde se sabe que no se pueden obtener proteínas glicosiladas y siendo la gp 70 una proteína glicosilada los anticuerpos generados por una infección natural no serían capaces de reconocer la p45 como antígeno y c) que la proteína

p45 en realidad sea la proteína gp 70 la cual si se reconoció en los sueros considerados como positivos.

Gomes-Keller *et al.*, 2006 realizó un estudio de detección de FeLV utilizando la prueba de RT-PCR a partir de ARN viral obtenido de saliva, con lo cual encontraron una sensibilidad y especificidad de 98.1% y 99.2% respectivamente y una concordancia es de 0.96 (alta) con respecto a la prueba de ELISA. Sin embargo esta prueba detecta genoma viral, lo cual requiere equipo especializado y personal capacitado, lo que hace menos factible su establecimiento en los laboratorios de diagnóstico. Por otro lado Lutz *et al.*, 1989 realizaron otro estudio donde compararon la prueba de ELISA para detectar virus activo en saliva y suero; son muestras fáciles de obtener y adecuadas para un diagnóstico rutinario de FeLV. En el presente estudio se estandarizó una prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos en suero y que podría evaluarse para la detección de anticuerpos en otros fluidos como la saliva o el semen, sin embargo, lo que se propone es que esta prueba sea complementaria a las pruebas actuales que se utilizan para la identificación de antígeno viral (inmunocromatografía) y que cuando la carga viral sea baja, una prueba serológica pueda ser adecuada detectando anticuerpos en gatos antes de ser vacunados.

8. CONCLUSIONES.

La prueba de ELISAI estandarizada con antígenos vacunales de una proteína derivada (p45) de la proteína de envoltura gp70, fue altamente sensible, con buena especificidad y buena concordancia.

La prueba serológica de ELISAI puede ser una técnica complementaria a las técnicas comerciales disponibles actualmente en México que detectan antígeno.

Se encontró una alta concordancia entre los resultados obtenidos en el ELISAI y WB utilizando la proteína p45, lo cual hace que esta proteína pueda ser utilizada para la estandarización de pruebas serológicas caseras, con lo cual disminuirá el costo del diagnóstico de FeLV en México.

No se encontró diferencia de seropositividad entre sueros de machos (86%) y hembras (89%) por lo cual se recomienda realizar la prueba y vacunar a ambos sexos.

El porcentaje de sueros de gatos en edad de 1-3 años (94%) positivos a FeLV fue alto.

En sueros de gatos que se obtuvieron de consultorio (85%) y particulares (94%) fue de los más altos.

9. APÉNDICE

GEL SEPARADOR 12%:

Para 1 gel

1.675 ml. Agua destilada

1.25 ml. Tris base 1.5 M pH 8.8

50 µl SDS stock 10%

2 ml. Acrilamida-Bis (Stock 30%)

25 µl Persulfato de amonio 10% (100mg/ml)

2.5 µl TEMED

GEL CONCENTRADOR 4%:

Para 1 gel

1.5 ml. Agua destilada

0.625 ml. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

25 µl SDS stock 10%

0.325 ml. Acrilamida-Bis (Stock 30%)

12.5 µl Persulfato de amonio 10% (100mg/ml)

2.5 µl TEMED

BUFFER DE LISIS (100µl) (conservar a 4°C):

DMSO 1.25 ml.

PMSF 0.21775

Ácido Deoxycólico (DOC) 0.1 g

RIPA 9.8 ml.

BUFFER DE MUESTRA 2x:

Tris HCl pH 6.8 (0.08 M) 3.5 ml. 0.5 M

SDS (2%) 4.0 ml. 10%

Glycerol (10%) 2.0 ml.

DTT (Dithiothreitol) (0.1 M) 0.308 g

Azul de bromofenol

Llevar a 10 ml. con agua bidestilada.

BUFFER DE CORRIDA 5x pH 8.3 (Usar a 1x):

Tris base 1.5 M p.H 8.8 7.5 g

Glicina 36 g

SDS 2.5 g

Agua bidestilada Aforar a 500 ml.

BUFFER DE TRANSFERENCIA:

Metanol 150 ml.

Electrodo buffer 10x 150 ml.

Agua bidestilada 450 ml.

SDS 0.075 g

PBS 10x pH 7.0:

Solución A

Na₂HPO₄ 7.1 g (0.01M)

NaCl 43.8 g (0.15M)

Aforar con agua destilada a 500 ml.

Solución B

NaH₂PO₄H₂O 6.9 g (0.01M)

NaCl 43.8 g (0.15M)

Aforar con agua destilada a 500 ml.

BUFFER DE BLOQUEO:

PBS 20 ml.

Leche (5%) 1 g

BUFFER DE LAVADO:

PBS 500 ml.

Tween 20 (0.2%) 1 ml.

PBS TWEEN (0.1%):

PBS 500 ml.

Tween 0.5 ml.

BUFFER DE DILUCIÓN:

Buffer de lavado 20 ml.

Leche (5%) 1 g

REVELADOR:

Diaminobencidina (0.05%) 0.010 g

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (0.05%) 10 ml.

PBS 15 ml.

BUFFER DEL ANTÍGENO pH 9.6:

Na₂CO₃ (0.015 M) 1.59 g

NaHCO₃ (0.0033 M) 2.93 g

Aforar con agua bidestilada a 50 ml.

Ajustar pH a 9.6

SUSTRATO:

Solución A 5 ml.

Solución B 5 ml.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 4 µl

OPD 4 mg.

SOLUCIÓN DE PARO:

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 55.17 ml.

Agua destilada 994.83 ml.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Arenas R, Marín J. Criterios en el diagnóstico y prevención de leucemia y SIDA felinos. AMMVEPE 1998; 9(3):119-120.
2. Arjona A, Escolar E, Soto I, Barquero N, Martín D, Gómez-Lucía E. Estudio seroepidemiológico de la leucemia e inmunodeficiencia felinas en Madrid. Med Vet 2000; 17(3):75-83.
3. Beatty JA, Tasker S, Jarrett O, Lam A, Gibson S, Noe-Nordberg A, Phillips A, Fawcett A, Barrs VR. Markers of Feline Leukaemia Virus Infection or Exposure in Cats from a Region of Low Seroprevalence. J Feline Med Surg 2011; 13(12):927-933.
4. Benito R, Gil J. Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” Zaragoza. Imagenmed 2005. <http://ebro.unizar.es/especiales/ie9/if.html>
5. Birchard SJ, Sherding RG. Manual Clínico de Pequeñas Especies. Volumen 1. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996.
6. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976;72: 248-254.
7. Carter GR, Wise DJ, Flores EF. A Concise Review of Veterinary Virology. New York: International Veterinary Information Service, 2005.
8. Coll J. Técnicas de diagnóstico en virología. España: Ediciones Díaz de Santos, S.A., 1993.
9. Collado VM, Gómez-Lucía E, Tejerizo G, Miró G, Escolar E, Martín S, Doménech A. Effect of type I interferons on the expression of feline leukaemia virus. Vet. Microbiol. 2007; 123:180-186.
10. Cultek. Fundamentos y tipos de ELISAs. Protocolos y técnicas. 2006. http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?opc=tecnicas&p=Aplicacion_Elisa
11. Dunham SP, Graham E. Infecciones retrovirales en pequeños animales. Vet Clin Small Anim 2008; 38:879-901.
12. Feldman EC, Nelson RW. Endocrinología y Reproducción canina y felina. 3ª. ed. Argentina: Editorial Inter-médica, 2007.

13. Flynn JN, Dunham SP, Watson V, Jarrett O. Longitudinal Analysis of Feline Leukemia Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes: Correlation with Recovery from Infection. *J Virol*. 2002;76(5):2306-2315.
14. Gleich SE, Krieger S, Hartmann K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg* 2009;11(12):985-992.
15. Gomes-Keller MA, Tandon R, Gönczi E, Meli ML, Hofman-Lehman R, Lutz H. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Vet Microbiol* 2006;112:11-21.
16. Gomes-Keller MA, Gönczi E, Tandon R, Riondato F, Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Lutz H. Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Result with Those of Current Diagnostic Methods. *J Clin Microbiol* 2006;44:916-922.
17. Gómez-Lucía E, Collado VM, Miró G, Doménech A. Effect of Type-I Interferon on Retroviruses. *Viruses* 2009;1:545-573.
18. Greene CE. *Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos*. 2ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana, 2000.
19. Hardy WD, Hess PW, MacEwen EG, McClelland AJ, Zuckerman EE, Essex M, Cotter SM, Oswald J. Biology of Feline Leukemia Virus in the Natural Environment. *Cancer Res*. 1976; 36:582-588.
20. Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, Greene CE, Vidyashankar AN, Jarrett O, Egberink HF. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J Feline Med Surg* 2007; 9:439-445.
21. Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Riond B, Pepin AC, Willi B, Ossent P, Lutz H. Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine* 2007;25:5531-5539.
22. Hofmann-Lehmann R, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Willi B, Cattori V, Gomes-Keller MA, Ossent P, Golder MC, Flynn JN, Lutz H. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine* 2006; 24:1087-1094.
23. Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V. 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* 1993; 57:269-276.

24. Jarrett O, Ganiere JP. Comparative studies of the efficacy of a recombinant feline leukaemia virus vaccine. *Vet Rec* 1996; 138:7-11.
25. Jarrett O. Feline Leukaemia Virus. *Encyclopedia of life Sciences*. Nature Publishing Group. Glasgow, UK 2001.
26. Khan KN, Koociba GJ, Wellman MN. Macrophage tropism of Feline leukemia virus (FeLV) of subgroup C and increased production of TNF α by FeLV infected macrophage. *Blood* 1993 ;81:2585-2590.
27. Little S, Sears W, Lachtara J, Bienzle D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. *Can Vet J* 2009; 50(6):644-648.
28. Lutz H, Jarrett O. Detection of Feline Leukemia Virus Infection in Saliva. *J Clin Microbiol* 1987; 25(5):827-831.
29. Martin SW, Bonnett B. Epidemiología Clínica. *Can Vet J* 1987; 28:318-325.
30. Muñoz L. Enfermedades Virales Felinas Parte II. *Revista TecnoVet* 2001;7(2) <http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/5285/5165>
31. Palmero ML. Virus de la Leucemia Felina ¿cómo diagnostico y manejo cada fase? Resúmenes de las 5 jornadas internacionales de la AAMeFe. España 2008.
32. Palmero ML, Carballés V. Enfermedades infecciosas felinas. España: Editorial Servet, 2010.
33. Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaertz A. *Handbook of Vertebrate Immunology*. USA: Academic Press, 1998.
34. Pinches MDG, Helps CR, Gruffydd-Jones TJ, Egan K, Jarrett O, Tasker S. Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Feline Med Surg* 2007;9(1):8-13.
35. Porras R. Papel de las citoquinas en la infección por el Virus de la Leucemia Felina. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2007; 1:1-2.
36. Ramírez H. Evaluación “in vitro” de proteínas antigénicas de un virus de artritis encefalitis caprina (AEC) aislado en México, usando las técnicas de ELISA y Western blot. (Tesis de maestría). UNAM FES-Cuautitlán México 2002.
37. Recio A, Lloret A, Pastor J. Estudio seroepidemiológico de leucemia (FeLV) e inmunodeficiencia felina (FIV) en la región de Murcia. Posters- Infectious Disease. 46 Congreso Nacional AVEPA; 2011 septiembre 29-octubre 2; Barcelona, España. SEVC Southern European Veterinary Conference.

38. Sand C, Englert T, Egberink H, Lutz H, Hartmann K. Evaluation of a new in-clinic test system to detect feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. *Vet Clin Pathol* 2010; 39:210-214.
39. Schaer M. *Medicina clínica del perro y el gato*. 1ª edición. España (Madrid): Masson, S.A., 2006.
40. Stützer B, Simon K, Lutz H, Majzoub M, Hermanns W, Hirschberger J, Sauter-Louis A, Hartmann K. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *J Feline Med Surg* 2011; 13(2):81-87.
41. Ternynck T, Avrameas S. *Técnicas de inmunología. Técnicas inmunoenzimáticas*. México: Grupo Editorial Iberoamérica, 1989.
42. Tilley LP, Smith FWK. *Black Well's La consulta veterinaria en 5 minutos. Canina y Felina*. 4ª. ed. Argentina: Editorial Inter-Médica, 2008.
43. Tizard IR. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8ª edición. España: Elsevier España, 2009.
44. Valenzuela M, Muñoz L. Leucemia Viral Felina Parte I. *Monografías Med. Vet.* 2002; 22 (1-2):22-29.
45. Weijer K, Uytdehaag FGCM, Osterhaus ADME. Control of Feline Leukaemia Virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 21:69-83.
46. Yilmaz H, Ilgaz A, Harbour DA. Prevalence of FIV and FELV Infections in Cats in Istanbul. *J Feline Med Surg* 2000; 2(1):69-70.
47. Zagal NE. Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina. (Estudio preliminar) (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), 2011.