



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Uso de la técnica de Inmuno Dot para el diagnóstico
de anticuerpos contra el virus de Leucemia Viral
Felina (FeLV) como prueba tamiz.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

RUTH BERENICE MORENO NAVARRO

ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

COASESOR: DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice.

Resumen	1
1.Introducción	2
1.2 Agente etiológico	2
1.3 Subgrupos	4
1.4 Replicación	5
1.5 Transmisión	5
1.6 Patogenia	6
1.6.1 Viremia inicial o transitoria	6
1.6.2 Infección latente	7
1.6.3 Viremia persistente	7
1.6.4 Presentación oncogénica	7
1.7 Signos clínicos	8
1.7.1 Alteraciones hematológicas	9
1.7.2 Inmunidad	10
1.7.3 Alteraciones inmunomediadas	11
1.7.4 Alteraciones neurológicas	12
1.7.5 Infecciones secundarias	13
1.7.6 Alteraciones reproductivas	14
1.8 Diagnóstico	14
1.8.1 Detección de la respuesta inmune del huésped mediante el estudio de anticuerpos (serología).	15
1.8.2 Detección del agente viral completo o de sus componentes	17
1.8.3 Kits comerciales	18
1.9 Tratamiento	19
1.10 Prevención	20
1.10.1 Vacunación	20
1.11 Control	21
2. Justificación	22

3. Hipótesis	23
4. Objetivo General	24
4.1 Objetivos Particulares	24
5. Materiales y Métodos	25
5.1 Colección de muestras	25
5.2 Antígeno	25
5.2.1 Determinación de proteína por el método de Bradford (Micrométodo)	25
5.3 Estandarización de la técnica Inmuno Dot	26
5.4 Inmuno Dot	27
5.5 Análisis de resultados	28
6. Resultados	28
6.1 Distribución de la población de estudio por edades	29
6.2 Distribución de la población de estudio por sexo	29
6.3 Resultados en las pruebas serológicas de ELISAi, WB e Inmuno Dot utilizadas para la detección de anticuerpos contra el FeLV.	30
6.4 Resultados en la prueba de Inmuno Dot respecto al rango de edades de los gatos en estudio.	30
6.5 Resultados en la prueba de Inmuno Dot respecto al sexo de los gatos de estudio.	33
6.6 Signos clínicos encontrados en gatos con resultado positivo en la prueba de Inmuno Dot.	33
6.7 Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot de gatos esterilizados.	34
6.8 Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot según la procedencia geográfica de los gatos del estudio.	35
7. Resultados de sensibilidad, especificidad y concordancia.	36
7.1 Determinación de la sensibilidad, especificidad y concordancia de la prueba de Inmuno Dot frente a WB.	36
7.2 Determinación de la sensibilidad, especificidad y concordancia de la prueba de Inmuno Dot frente al ELISAi.	37
8. Discusión	39
9. Conclusiones	44

10. Bibliografía	45
11. Apéndice 1	52
12. Apéndice 2	53
13. Apéndice 3	57
14. Apéndice 4	60

Índice de Figuras.

Figura 1. Estructura de FeLV	3
Figura 2. Lectura visual de los resultados obtenidos de algunos sueros evaluados con Inmuno Dot para identificar anticuerpos contra el virus del FeLV.	28
Figura 3. Distribución de los resultados seropositivos obtenidos en la prueba de Inmuno Dot respecto a la edad de los gatos de estudio.	31
Figura 4. Comparación de resultados serológicos en las pruebas de Inmuno Dot y WB para la detección del FeLV.	36
Figura 5. Comparación de resultados serológicos en las pruebas de Inmuno Dot y ELISAi para la detección del FeLV.	38

Índice de Tablas.

Tabla 1. Presentación clínica de linfosarcomas más frecuentemente descritos	8
Tabla 2. Tipos de infecciones oportunistas que se pueden presentar en gatos infectados con el virus de Leucemia Felina.	13
Tabla 3. Características de los Kits comerciales utilizados para el diagnóstico del FeLV.	19
Tabla 4. Antivirales descritos para el tratamiento del FeLV.	19
Tabla 5. Resultados de la concentración de proteínas obtenidas en la muestra vacunal determinado por el método de Bradford.	26
Tabla 6. Estandarización de la técnica de Inmuno Dot.	27
Tabla 7. Población de los gatos de estudio distribuidos por edades.	29
Tabla 8. Distribución por sexo de los gatos utilizados en este estudio.	29
Tabla 9. Resultados obtenidos de la evaluación de 110 sueros de gatos en las	30

pruebas de ELISAI, WB e Inmuno Dot para la detección de anticuerpos contra el FeLV.

Tabla 10. Distribución de los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot respecto a la edad de los gatos del estudio. 32

Tabla 11. Porcentajes de los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot respecto a la edad de los gatos del estudio. 32

Tabla 12. Resultados en la prueba de Inmuno Dot respecto al sexo de los gatos de estudio. 33

Tabla 13. Signos clínicos asociados a la posible infección por el FeLV en gatos con resultado seropositivo en la prueba de Inmuno Dot, WB y ELISAI 34

Tabla 14. Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot de los gatos esterilizados. 35

Tabla 15. Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot según la procedencia geográfica de los gatos del estudio. 35

Tabla 16. Tabla de contingencia donde se comparan los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot frente a WB para la detección de anticuerpos contra el FeLV. 36

Tabla 17. Tabla de contingencia donde se comparan los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot frente a ELISAI para la detección de anticuerpos contra el FeLV. 37

Resumen

Hoy en día el virus de Leucemia Viral Felina (FeLV) es de gran importancia clínica, ya que es causante de una enfermedad fatal en los gatos. Es por ello que el diagnóstico de dicha enfermedad es de gran relevancia. En este estudio se utilizó la técnica de Inmuno Dot como una alternativa diagnóstica para el FeLV. El objetivo de esta técnica fue determinar la presencia de anticuerpos contra la p45, que es una fracción de la gp70 (proteína de envoltura) del FeLV, para ello se utilizaron 110 sueros de gatos, de los cuales 53 fueron de hembras, 42 de machos y 15 no determinados, esta población de gatos de estudio provienen del D.F. n=21, del Edo. De México n=49 y no determinados n=40. Los resultados obtenidos de la población total fueron un 82% de muestras positivas y un 18% de muestras negativas. Mostrando una sensibilidad de 83.9%, una especificidad de 26% y un valor de kappa del 0.105 respecto a ELISAi y una sensibilidad de 87.2%, una especificidad de 37.5% y un valor de kappa de 0.263 respecto a WB. La técnica de Inmuno Dot fue sensible, aunque no específica. No obstante, puede ser una técnica adecuada para monitorear la respuesta de anticuerpos que se generen después de la vacunación. No se encontró diferencia significativa respecto al sexo, edad u origen.

1. Introducción

El virus de leucemia felina (FeLV) es un retrovirus altamente transmisible, que causa una alta morbilidad y mortalidad en todos los felinos del mundo, siendo uno de los patógenos más importantes que infecta a los gatos y se relaciona con una serie de diversos padecimientos. Los gatos infectados sucumben ante enfermedades tales como leucemia, linfomas e infecciones secundarias oportunistas relacionadas con la supresión de la respuesta inmune inducida por el FeLV (*Greence, 2008; Stewart et al., 2011*).

Los estudios realizados con el FeLV han contribuido de forma importante en el avance de la comprensión de los retrovirus en general, la caracterización de este y otros retrovirus que afectan a los animales dieron pie a los conceptos y técnicas que más tarde activaron el descubrimiento y caracterización de retrovirus humanos. El FeLV fue el primer retrovirus en el que se desarrolló una vacuna así como una prueba práctica de diagnóstico, la cual ha contribuido en el desarrollo de programas cuyo objetivo son controlar su propagación (*Greggs et al., 2011*).

1.2 Agente etiológico

El virus de leucemia felina se descubrió en 1964 por William Jarrett y sus colegas al encontrar partículas de virus unidos a la membrana de linfoblastos en un gato con linfoma,

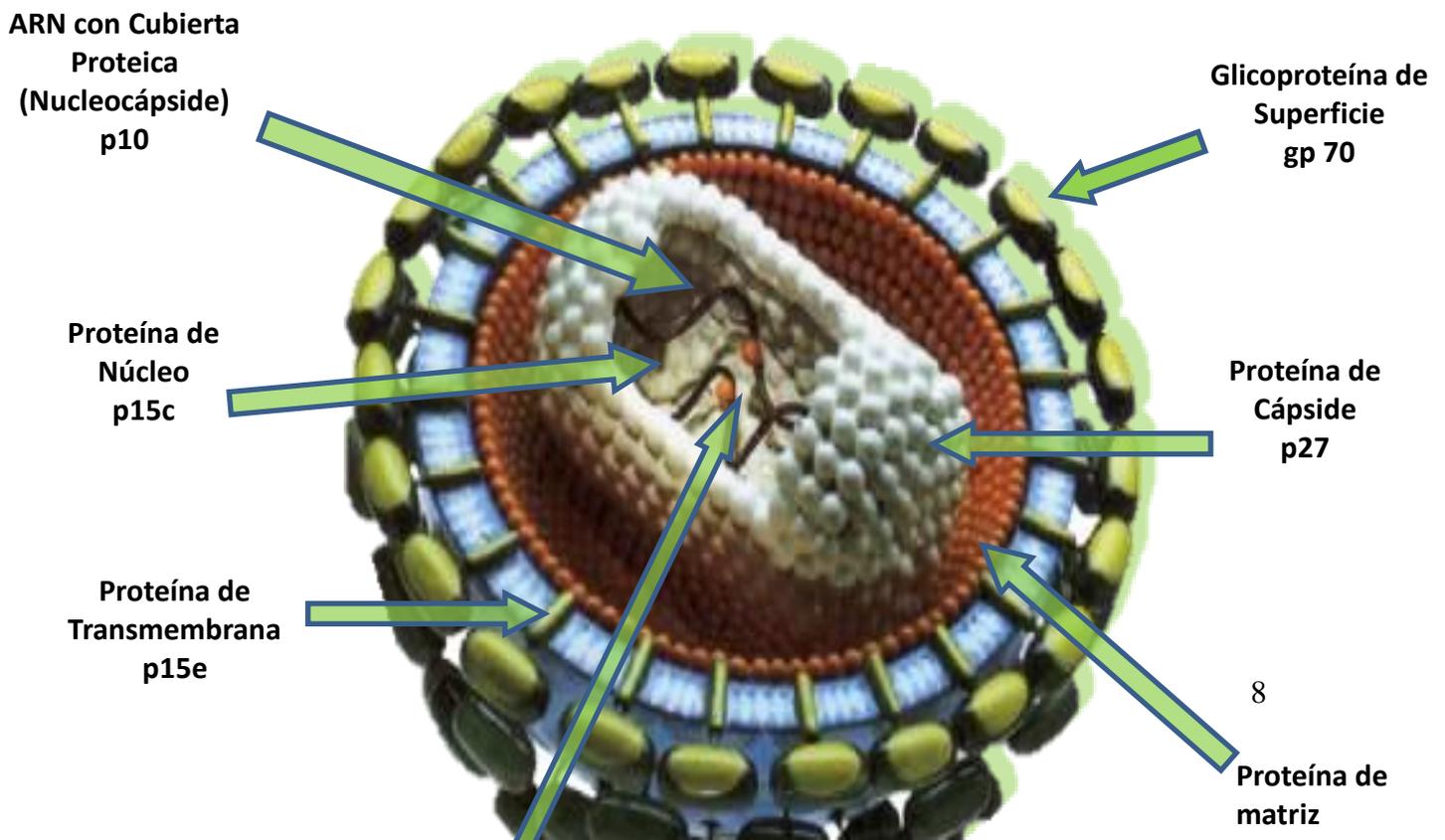
actualmente está clasificado en la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* del género *Gammaretrovirus* (Rojko et al., 1989, Soriano et al., 2011).

La estructura viral es envuelta y posee protuberancias en forma de espigas que emergen de su envoltura, la cual consta de una doble capa de lipoproteínas, así también tiene una nucleocápside situada en el centro de la partícula viral que protege el material genético (ARN). El FeLV al igual que otros retrovirus posee tres genes esenciales, *gag*, *pol* y *env* (Nakata et al., 2003).

La cápside, nucleocápside y proteína del núcleo son tres proteínas estructurales antigénicas p27, p10 y p15c, las cuales son codificadas por el gen *gag*, también contiene la enzima transcriptasa reversa codificada por el gen *pol* y las proteínas de envoltura p15e que está unida a la glicoproteína gp70, las cuales son codificadas por el gen *env* (Figura 1) (Sherding, 1996; Soriano et al., 2011).

La glicoproteína gp70 es responsable de estimular la respuesta inmunológica que proporciona protección contra la infección, por lo cual la gp70 se encuentra presente en algunas de las vacunas contra la leucemia viral felina y algunas otras sólo usan una fracción de está llamada p45. Es importante mencionar que la gp70 se relaciona con los genotipos del virus y determina la patogenicidad (Chandler et al., 2004; Wilson et al., 2012).

Figura 1. Estructura del FeLV.



(Adaptado de Sparkes, 1997).

1.3 Subgrupos

Tomando en cuenta la gp70 se han descrito cuatro subgrupos del virus, designados como A, B, C y recientemente descubierto el T. Estos subgrupos tienen diferencias antigénicas entre sí, como consecuencia de variaciones estructurales de dicha proteína. Cada genotipo puede asociarse a enfermedades diferentes, considerándose el A como el único infeccioso y precursor de los genotipos B, C y T (*Nakata et al., 2003; Cano et al., 2011*).

Los subgrupos se han generado por la recombinación y la variación entre los genes *env* del FeLV-A y de provirus endógenos, estos últimos son los restos de antiguos retrovirus, que se transmiten generalmente entre los gatos para formar recombinantes con FeLV-A (*Bolin et al., 2011; Stewart et al., 2012*).

Los subgrupos tienen receptores comunes y receptores propios, la unión a estos, está determinada por la gp70 (*Stewart et al., 2011; Helfer et al., 2011*).

Aunque el FeLV-B, C y T son plenamente competentes para su replicación *in vitro*, pero la replicación *in vivo* requieren la presencia del subgrupo A, por lo que éste es comúnmente referido como un “ayudante”, ya que se requiere de él para la generación y transmisión de los demás subgrupos (*Sparkes, 1997; Greggs et al., 2011*).

El FeLV-A es erróneamente denominado de baja patogenicidad, debido a que aproximadamente el 60% de los gatos expuestos montan una respuesta inmune competente y logran eliminar la infección después de una viremia transitoria, sin embargo, está bien documentado que los gatos con infección crónica pueden desarrollar una gran variedad de signos clínicos asociados a enfermedades secundarias (*Jarret et al., 1978; Chandhasin et al., 2005*).

En los gatos infectados con el FeLV-B se relaciona con el desarrollo de linfoma y el FeLV-C se encuentra aproximadamente en el 1 a 2% de los gatos infectados de forma crónica y su aparición se asocia con el desarrollo de aplasia de células rojas, esta anemia no regenerativa es mortal después de 2 a 3 meses del curso de la enfermedad en el gato. El subgrupo FeLV-T se distingue por el marcado carácter T-linfotrópico que induce a una inmunosupresión grave (*Stewart et al., 2012; Cano et al., 2011*).

1.4 Replicación

La penetración del FeLV a la célula huésped se da bajo condiciones de pH neutro en la membrana plasmática a través del movimiento lateral del complejo virus-receptor, en donde ocurren reordenamientos estructurales en las proteínas de transmembrana produciendo la fusión de membranas. Posteriormente, la nucleocápside es liberada en el citoplasma y se desplaza entre las fibras del citoesqueleto a los sitios específicos de la replicación (*MacLachlan et al., 2011*).

Después de que el virus penetra la célula, se produce un ADN complementario del genoma de ARN viral gracias a la enzima transcriptasa reversa y este se integra en el ADN cromosómico celular como un provirus. El cual permanece allí durante la vida de la célula y esto es la base de la persistencia de FeLV en gatos. Tras la división celular el provirus se expresa y la progenie viral se libera sin dañar a la célula. Por consiguiente, el virus sólo se produce en aquellos tejidos que contienen células en división constante (*Chandler et al., 2004*).

1.5 Transmisión

El virus de leucemia felina es conocido como el causante de la “enfermedad del gato amigable” ya que el virus se transmite cuando los animales infectados y no infectados están en contacto prolongado, especialmente durante el aseo mutuo, cuando comparten agua, comederos, cama o gatera, por mordeduras, saliva, secreciones nasales, orina, heces, leche y de manera vertical de la madre al feto a través de la placenta. Estas vías de transmisión conducen a una alta prevalencia de infección en los gatos, especialmente en la población de gatos callejeros (*Cattori et al., 2009; Greggs et al., 2012; Tejerizo et al., 2012*).

Basurto en 2005 cita que la transmisión venérea es factible ya que se ha aislado virus y células infectadas en el semen, líquido vaginal y en el epitelio urogenital. La infección congénita es poco frecuente, ya que más de tres cuartas partes de las hembras infectadas tienen problemas reproductivos, infecciones intrauterinas, muerte fetal o neonatal, pero en hembras con infección latente no se produce la transmisión a la cría (*Arjona et al., 2000; Greene, 2008*).

1.6 Patogenia

El periodo de incubación es entre 4 a 6 semanas. Si la transmisión del virus es por vía oronasal, el virus se replica inicialmente en tejido linfoide orofaríngeo. En función de la respuesta inmune en esta fase inicial, se pueden distinguir varias etapas o fases de infección. Ya que en un 60% de los gatos la replicación vírica se controla por una efectiva y duradera respuesta inmune mediada por linfocitos T (LT), estos gatos suelen tener un alto nivel de anticuerpos neutralizantes, a los cuales se les conoce como “gatos resistentes” (*Lutz, 1990; Kahn et al., 2005*).

Existen factores relacionados con el huésped o el virus, que determinarán si un gato expuesto al FeLV se convertirá en viremico o se recuperará. Entre los más importantes que afectan el resultado de la infección se encuentran, la carga viral inicial, la duración y frecuencia de la exposición al virus, el estado inmunológico y la edad del gato expuesto. Ya que los gatitos infectados dentro de los primeros 4 a 5 meses de vida tienen un alto riesgo de convertirse en gatos infectados permanentes (*Tejerizo et al., 2012*).

1.6.1 Viremia inicial o transitoria

Si la infección no se eliminó inmediatamente, el virus infecta linfocitos y monocitos circulantes en aproximadamente 3 a 4 semanas, lo cual puede ir acompañado de malestar, fiebre o linfadenomegalia produciendo una hiperplasia linfoide. Durante esta fase, el virus infecta timo, bazo, glándulas salivales y nódulos linfáticos. Dependiendo de la respuesta inmune que pueda desarrollar el animal es la duración de esta viremia inicial y transitoria, en la mayoría dura menos de dos semanas, tiempo durante el cual el animal excreta virus contagioso. En esta etapa se puede controlar la infección si se desarrolla una respuesta inmunológica eficaz, sin embargo, el provirus no se elimina (*Rojko et al., 1991; Chandler et al., 2004*).

Después de la viremia inicial el virus puede infectar las células madre hematopoyéticas de médula ósea, en ese momento el nivel de viremia es considerado alto, encontrándose hasta un millón de virus por mililitro de saliva. Una vez que las células de médula ósea se infectan, el virus no será eliminado y el provirus queda integrado al ADN de las células. (*Cano et al., 2011*).

1.6.2 Infección latente

En una infección latente la médula ósea está infectada pero no libera células infectadas o antígeno p27 y los gatos permanecen aparentemente sanos. Pero la infección puede reactivarse espontáneamente como respuesta a una inmunosupresión. Debido a esto último los gatos infectados presentan una latencia variable (*Pedersen, 1984; Pacitti, 1989; Cattori et al., 2006*).

1.6.3 Viremia persistente

Si durante la infección de la médula ósea el sistema inmune falla o la respuesta no es lo bastante eficiente, es decir tienen bajos o nulos niveles de anticuerpos neutralizantes y de LT citotóxicos (CD8+), se producirá una infección masiva del virus, permitiendo que este infecte células epiteliales de intestino, vejiga y el desarrollo de una viremia persistente (*Lutz, 1990; Sparkes, 1997; Greene, 2008*).

1.6.4 Presentación oncogénica

En el caso de la oncogénesis inducida por el FeLV el mecanismo no es totalmente conocido, pero se ha relacionado con la inserción y sobre-expresión del genoma vírico en el ADN celular, que se ubica cerca de un oncogén celular (como *myc* y *fit-1*) originando la activación de dicho gen y la proliferación incontrolada de células hijas. Esta acción patógena parece ser que se inhibe en presencia de anticuerpos anti-FOCMA (antígeno de membrana celular asociado al oncovirus felino) (Couto *et al.*, 2005). El FeLV-A puede incorporar el oncogén y dar lugar a virus recombinantes. Como lo demuestra un estudio realizado por Cano *et al.*, 2011, donde encuentra dicho oncogén en un 32% de 119 gatos con linfomas. Los gatos naturalmente infectados tienen un mayor riesgo de desarrollar linfoma. Sin embargo, experimentalmente se pueden inducir los tumores en gatitos (Hartmann, 2011). La mayoría de las neuropatías asociadas al FeLV son causadas por el linfoma e infiltraciones linfocíticas en el cerebro o la médula espinal que conduce a la compresión de la misma (Doménech *et al.*, 2006).

El linfoma es la neoplasia más frecuente asociada a dicha infección y se caracteriza por la presencia de tumores discretos y la infiltración difusa de células tumorales linfoides a los órganos, en la Tabla 1 se encuentran los linfomas más comunes y los signos asociados a cada uno (de Mari *et al.*, 2004; Basurto *et al.*, 2005; Bolin *et al.*, 2011).

Tabla 1. Presentación clínica de linfomas más frecuentemente descritos

Tipo de linfoma	Signos clínicos	Diagnóstico	Tratamiento
Tímico	Disnea, jadeo, tos regurgitación	Microscopía de la efusión pleural y rayos X de tórax	Quimioterapia
Gastro-intestinal	Pérdida de peso (mala absorción), vómito, diarrea, ascitis, melena y signos de obstrucción	Biopsia quirúrgica y rayos X de abdomen	Quimioterapia y quirúrgico

(Basurto *et al.*, 2005)

1.7 Signos clínicos

Los signos clínicos asociados con la infección por el FeLV son variables, clasificándose en tumorales, hematológicos e inmunomediados. Un número aún mayor de las muertes que ocurren se relacionan a anemias secundarias y enfermedades infecciosas causadas por los efectos supresores del virus en la médula ósea y en la falta de respuesta del sistema inmune (Dunham *et al.*, 2008).

Los signos presentes en leucemia linfocítica a menudo se limitan a letargia y anorexia en donde se observa, pérdida de peso, palidez en las membranas mucosas, fiebre que en casos terminales se reflejan en hipotermia. Ocasionalmente puede haber cardiomegalia, esplenomegalia y hepatomegalia (Basurto *et al.*, 2005).

El curso clínico de los gatos infectados también se determina por la combinación de factores del virus y del hospedero. Como se observa en la infección del FeLV-B que se asocia principalmente a la presencia de tumores y el FeLV-C a la presentación de anemia no regenerativa (Hartmann, 2011).

Es probable que el factor más importante del hospedador que determina el resultado clínico de los gatos infectados es la edad del gato en el momento de la infección, así por ejemplo, en neonatos se desarrolla una marcada atrofia del timo después de la infección, conocida como “síndrome del gatito flojo”, dando como resultado una inmunosupresión severa, emaciación y muerte prematura. Ya que conforme los gatos maduran van adquiriendo una resistencia progresiva. Cuando los gatos mayores son infectados los signos son leves y puede existir un periodo más prolongado de aparente buena salud (Birchard *et al.*, 1996; Hartmann, 2006).

1.7.1 Alteraciones hematológicas

El FeLV infecta todas las células hematopoyéticas induciendo a diversas enfermedades linforeticulares, leucemias linfoides, mieloides y anemias. Es común encontrar trastornos hematopoyéticos, en particular citopenias causadas por la supresión de médula ósea; trastornos hematológicos que incluyen anemia (no regenerativa o regenerativa) que es una complicación importante no neoplásica, que se produce en la mayoría de los gatos infectados, se puede observar anemia aplásica (pancitopenia), neutropenia persistente, transitoria o cíclica, anomalías a nivel plaquetario como trombocitopenia resultando en trastornos de sangrado, ya que la vida útil de las plaquetas se acorta y la supresión de la médula ósea provoca una disminución de su producción. Esta supresión de la médula ósea se produce a partir de una replicación viral activa. Por otro lado, la anemia producida en infecciones crónicas es promovida por una alta concentración de citocinas de LT (*Birchard et al., 1996; de Mari et al., 2004; Basurto et al., 2005; Cano et al., 2011; Hartmann, 2012*).

El síndrome mielodisplásico (MDS) caracterizado por las citopenias de sangre periférica y los cambios displásicos en la médula ósea, son una pre etapa de la leucemia mieloide aguda. Se sabe que los cambios de la región terminal larga (LTR) del genoma viral de FeLV, están directamente asociados con la inducción de MDS. Otro síndrome de supresión de la médula es la mielofibrosis, que se caracteriza por la proliferación anormal de fibroblastos resultantes de la estimulación prolongada de la médula ósea (*MacLachlan et al., 2011*).

1.7.2 Inmunidad

La dinámica de la infección viral permite la participación de diversos mecanismos de defensa tanto de inmunidad innata como de inmunidad adaptativa. En lo correspondiente a inmunidad innata participan los siguientes mecanismos: la reacción inflamatoria, la fagocitosis, los interferones tipo I y células asesinas naturales (NK). Por lo que respecta a la inmunidad adaptativa, ambas ramas, humoral y celular hacen aportaciones importantes en la infección viral. La inmunidad humoral es efectiva cuando los virus se encuentran libres en los espacios extracelulares y en ella participan dos tipos de anticuerpos o

inmunoglobulinas como son los anticuerpos secretores IgA que bañan los epitelios de las mucosas y los anticuerpos circulantes de clase IgG o IgM. En estos dos últimos su acción puede ser de tres tipos, anticuerpos neutralizantes, anticuerpos fijadores del complemento y anticuerpos opsonizantes. Los anticuerpos pueden unirse a la superficie del virus e impedir la adsorción o penetración viral a las células blanco. También se puede dar la unión de grandes cantidades de anticuerpos a la superficie del virus iniciando la fijación y acción del complemento (Guyton, 1975, Joklik et al.1983; Gutiérrez, 2010).

La inmunidad celular es probablemente la responsable de la rápida eliminación de las células infectadas con el virus y uno de los primeros mecanismos de defensa como respuesta a la infección viral, los linfocitos T citotóxicos (LT-CD8) aparecen en la sangre de los gatos infectados después de 1 a 2 semanas, la acción de estos linfocitos es reconocer antígenos virales en la membrana de las células infectadas para destruirlas. Esta respuesta, se suma a la acción de las células NK y el interferón (Flynn et al, 2002; Montaraz, 2012). La inmunidad pasiva vía el calostro contiene anticuerpos contra el FeLV, permitiendo proteger a los gatos jóvenes de una infección precoz; aunque esa protección no va más allá de 2 meses (Chandler et al., 2004).

Una vez que el virus desaparece de la sangre, los anticuerpos virus neutralizantes permanecen en el suero, logrando un estado de resistencia de los gatos a la reinfección (Flynn et al, 2002).

El IFN- α es una glicoproteína con efecto antiviral, protege las células circunvecinas de la infección viral y el IFN- γ es un activador de macrófagos e inmunomodulador, aumenta la eficacia de la fagocitosis, así como la capacidad de reconocer y destruir células infectadas. Ambos tienen una acción directa aumentando la respuesta inmune e inhibiendo la replicación viral dentro de las células ya infectadas. El IFN- α también puede tener efectos directos sobre la expresión viral (Linenberger, et al, 1999; Porras et al, 2007; Gutiérrez, 2010).

1.7.3 Alteraciones inmunomediadas

La inmunosupresión inducida por el virus normalmente provoca una disminución general de la respuesta inmunitaria. Este fenómeno se presenta por una destrucción de linfocitos,

así como, la disminución de la primer línea de defensa celular, con bajas concentraciones plasmáticas del complemento (*Kahn et al., 2005; Montaraz, 2012*).

El antígeno denominado FOCMA es un antígeno tumoral específico hallado en la superficie de las células infectadas por el FeLV, sin embargo los gatos infectados pueden producir anticuerpos anti-FOCMA en altos niveles y pueden rechazar los tumores inducidos por el FeLV. Pero no tienen actividad neutralizante (*Basurto et al., 2005; Cano et al., 2011*).

Se han realizado pruebas para evaluar la función inmune de gatos infectados por el FeLV en donde se han determinado anormalidades como la disminución de la respuesta a mitógenos de células LT, la reducción en la producción de inmunoglobulinas, la función de los neutrófilos está deprimida y el complemento se ve disminuido, en algunos gatos también se observó la reducción de IL-2 e IL-4, pero el FeLV no parece suprimir la producción de IL-1 en los macrófagos infectados. Las células T de gatos infectados producen niveles más bajos de los factores estimulantes para los LB (*Hartmann, 2011*).

Las alteraciones inmunomediadas asociadas a la infección por el FeLV tales como: anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), glomerulonefritis, uveítis con deposición de complejos inmunes en el iris y el cuerpo ciliar y poliartritis progresiva crónica, son provocadas por una alta cantidad de antígeno viral en sangre, así como una respuesta inmune hiperactiva o mal regulada, además de aumentos no específicos de IgG o IgM, o la pérdida de células T y la formación de complejo inmunes; todo esto promueve una desregulación del sistema inmune. Por otro lado, la formación de complejos inmunes no solo son formados por partículas virales completas sino también por proteínas virales tales como la gp70, p27 y p15E (*Kahn et al., 2005*).

1.7.4 Alteraciones neurológicas

El FeLV tiene efectos neurotóxicos directos provocados por las glicoproteínas de la envoltura que pueden ser capaces de producir un aumento de calcio libre a intracelular, lo cual conduce a la muerte neuronal (esto también se ha descrito en los seres humanos infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana), donde se encontró que los

polipéptidos de la envoltura del FeLV causan neurotoxicidad. Se ha reportado que el polipéptido de la cepa FeLV-C fue significativamente más neurotóxica que el mismo péptido derivado de una cepa FeLV-A (Hartmann, 2012).

Los signos neurológicos relacionados con el FeLV son: vocalizaciones anormales, hiperestesia y parálisis progresiva total. Algunos otros son, anisocoria, midriasis, ceguera central, o el síndrome de Horner, además de incontinencia urinaria durante el curso de la enfermedad. Los gatos afectados desarrollaron gradualmente disfunción neurológica progresiva. Microscópicamente, se observa degeneración de la materia blanca, dilatación de las vainas de mielina y axones inflamados en la médula espinal y tallo cerebral (Kahn et al., 200; Hartmann, 2011).

1.7.5 Infecciones secundarias

Las infecciones secundarias relacionadas con el FeLV provocan signos clínicos gastrointestinales como diarrea hemorrágica, vómitos, ulceración oral o gingivitis, anorexia y pérdida de peso, donde se involucran agentes de tipo viral, bacteriano y micótico, ver Tabla 2 (Kipar et al., 2000; Kipar et al., 2001; Chandler et al., 2004; Solange et al., 2012).

Tabla 2. Tipos de infecciones oportunistas que se pueden presentar en gatos infectados con el virus de Leucemia Felina

Tipo de infección	Agente oportunista
Viral	PIF (Peritonitis Infecciosa Felina). Herpesvirus Felino tipo 1. Calicivirus Felino. Coronavirus Felino. Parvovirus Felino.
Micótica	<i>Cryptococcus sp</i> <i>Aspergillus sp</i> <i>Candida sp</i>
Por Ricketssias	<i>Hemobartonella sp</i>
Por Protozoarios	Toxoplasma Cryptosporidium

(Adaptado de *Birchard et al., 1996; Solange et al., 2012*).

1.7.6 Alteraciones reproductivas

En hembras infectadas con el FeLV se ha descrito que se presenta un 68 a 73% de infertilidad y un 60% de aborto. La reabsorción fetal, involución placentaria, así como los mortinatos, son resultado de una infección *in útero*. Ocasionalmente las gatas infectadas paren crías débiles (*Birchard et al., 1996; Kahn et al., 2005*).

1.8 Diagnóstico

La virología médica presupone un pensamiento científico integrador donde se vinculen los elementos clínico-epidemiológicos que acompañan a cualquier enfermedad infecciosa con los datos que aporta el laboratorio clínico. Con frecuencia es difícil orientar el diagnóstico, el cual se puede llevar a cabo directamente por identificación del virus o por el reconocimiento de una respuesta específica del hospedero a la infección. Para ello, la recolección de la muestra biológica debe garantizar que está sea representativa del proceso patológico y tomada en el momento adecuado en que pueden estar presentes los elementos que se pretenden buscar.

El objetivo de las técnicas serológicas es detectar la respuesta inmune humoral del hospedero. Su fundamento es la formación de un complejo antígeno - anticuerpo, que puede demostrarse por diversos procedimientos (*MacLachlan et al., 2011*).

Los métodos de diagnóstico viral se basan fundamentalmente en:

- a) Detección de la respuesta inmune del huésped mediante el estudio de anticuerpos (serología).
- b) Detección del agente viral completo o de sus componentes (antígenos virales o ácido nucleico viral)

(Jawetz *et al.*, 1999).

1.8.1 Detección de la respuesta inmune del huésped mediante el estudio de anticuerpos (serología)

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, método indirecto (ELISA_i)

Es capaz de detectar de 0.01 a 0.0005µg/ml de proteína y es utilizado generalmente para poblaciones, por lo que es muy útil en el monitoreo de enfermedades en laboratorios de diagnóstico. Está técnica se basa en el uso de un anticuerpo marcado con una enzima que posteriormente es revelado por un sustrato. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes (Koneman, 1992; Tizard, 2009).

Western Blot (WB)

Es una técnica que permite detectar de 1 a 10µg de anticuerpos, y es considerada también como una prueba de inmunología molecular. En esta técnica el o los antígenos están fijados a una matriz de nitrocelulosa que previamente fueron separados por electroforesis (McIntosh, 1996).

Inmuno Dot

Esta técnica se está retomando en la actualidad debido a la buena accesibilidad que representa, ya que no necesita de equipo o personal especializado y a mostrado buenos resultados. Al ser una prueba indirecta detecta anticuerpos y ocupa un conjugado que reaccionará con un sustrato cromógeno, el cambio de color indica que hubo una reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno se fija a un papel de nitrocelulosa como en la técnica de WB. Esta técnica ha sido utilizada para la detección de diversas enfermedades infecciosas

de origen viral, parasitario o bacteriano (*Montenegro et al.*, 1992; *Waner et al.*, 2003; *Saravanan et al.*, 2006; *Manoharan*, 2010).

Virus neutralización (VN)

Esta técnica puede detectar una concentración de 0.00005µg/ml de proteína. Se basa en que el virus puede ser neutralizado por un anticuerpo y este efecto se puede evidenciar inoculando dicho complejo inmune en un hospedero, cultivo celular o animal de laboratorio en diferentes diluciones (*Atmar et al.*, 1997; *Tizard*, 2009).

Fijación del complemento (FC)

Esta técnica puede utilizarse tanto para la detección de anticuerpo como antígeno en una concentración de 0.1 a 0.05µg/ml de proteína, sin embargo, es más utilizada para la detección de anticuerpos. Tiene la capacidad de detectar anticuerpos en fase aguda y fase convaleciente (*McIntosh*, 1996).

Inhibición de la hemoaglutinación (HI)

Esta prueba tiene la capacidad de detectar una concentración de proteína de 0.01 a 0.005µg/ml y se basa en que el anticuerpo se fija al virus hemoaglutinante por lo que este a su vez no se fija a receptores de la membrana de los eritrocitos y por lo tanto neutraliza su actividad hemoaglutinante. Es una técnica que es utilizada para la cuantificación de anticuerpos (*Ames*, 1990; *Tizard*, 2009).

El diagnóstico del FeLV en ocasiones resulta bastante complejo, por lo que contar con alternativas de detección de anticuerpos y no solo de antígeno deben ser factibles (*Cattori et al.*, 2009; *Moreno et al.*, 2013).

La presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero es útil para el diagnóstico de un gato vacunado, así como infectado (*Gómez*, 2006). Sin embargo en México, no se encuentra disponible el diagnóstico para el FeLV basado en la detección de anticuerpos específicos contra antígenos virales en forma comercial (*Autrán et al.*, 2013).

Zagal, 2011 estandarizó y realizó pruebas de ELISAi y WB para el diagnóstico del FeLV en las que detecto anticuerpos contra la gp70 y p27, antígenos disponibles en algunas vacunas comerciales, con lo que corroboró la frecuencia de producción de anticuerpos contra la gp70, ya que al ser una proteína inmunodominante induce la producción de anticuerpos neutralizantes. La generación de alternativas diagnósticas donde ambas pruebas muestran una alta concordancia y el WB demostró ser altamente específica la cual ha sido descrita como una prueba confirmatoria para otros retrovirus como en el Virus de Inmunodeficiencia Humana.

1.8.2 Detección del agente viral completo o de sus componentes

ELISA

Con la prueba de ELISA directa es posible detectar el antígeno p27, no solo en suero y plasma, sino también en saliva de gatos infectados. Hasta hace algunos años fue considerada la prueba más sensible para el diagnóstico del FeLV (Lutz, 1990), sin embargo no es una prueba de uso comercial.

Inmunofluorescencia directa (IFA)

Es una técnica que no se utiliza rutinariamente para el diagnóstico del FeLV aunque cuenta con un 99% de especificidad. Pero si se utiliza para detectar el virus en leucocitos y plaquetas con ayuda de anticuerpos monoclonales contra p27 y gp70 del FeLV. Es importante mencionar que solo se obtienen resultados positivos cuando el virus ha llegado a médula ósea y libera células infectadas. Por lo que esta prueba es adecuada para poner en evidencia a los gatos virémicos persistentes (Lutz, *et al.*, 1987; Dunham, *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 2011).

Inmunohistoquímica

Experimentalmente con esta técnica se ha podido evidenciar la presencia de antígeno p27 del FeLV en neuronas, células endoteliales y células de la glia (Kahn *et al.*, 2000; Hartmann, 2011).

Aislamiento viral

El cultivo celular para el aislamiento del FeLV no se realiza rutinariamente por que no es fácil la obtención de células infectadas y solo es usado en proyectos de investigación, las células utilizadas generalmente son de riñón de gato. Esta metodología utilizada en investigación permite la obtención de cepas virales que posteriormente son evaluadas por técnicas de biología molecular (Zinsser, 1994).

Hibridación de ácidos nucleicos

Esta técnica está basada en la capacidad de hibridar una sonda marcada con una porción del ácido nucleico viral en la célula infectada y revelada mediante un proceso inmunohistoquímico, siendo utilizada de forma experimental en tumores linfoides de felinos domésticos (Crespo, 2000; Fujino *et al.*, 2003).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica que se emplea cada día más, considerada la prueba de oro para el diagnóstico del FeLV, es capaz de detectar provirus en linfocitos periféricos o a partir de muestras clínicas como células obtenidas de saliva, lagrimas u órganos infectados como hígado, bazo y a partir de muestras conservadas en formol para la extracción de ácido nucleico y su posterior amplificación *in vitro* (Dunham, *et al.*, 2008; Suntz *et al.*, 2010; MacLachlan *et al.*, 2011).

Una variante de la PCR es la RT-PCR que requiere de la enzima transcriptasa reversa para generar un ADN complementario. Otra variante es la PCR cuantitativa (PCRq) que permite detectar y cuantificar ácido nucleico viral (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2006).

1.8.3 Kits comerciales

Los kits comerciales usados para el diagnóstico de FeLV están basados en los principios de las técnicas de ELISA e inmunocromatografía, las cuales son las más comunes en la práctica clínica y en los laboratorios. Teniendo como fundamento la detección de antígeno

p27 que se libera en gran cantidad a partir de células infectadas y que puede detectarse en gatos con viremia, por lo que el diagnóstico del FeLV recae en determinar la presencia de dicho antígeno (Ag) (Lopez et al., 1989; Chandler et al., 2004; Hartmann, 2007; Cattori et al., 2009; Cano et al., 2011). La realización de la prueba permite utilizar muestras de sangre, lágrimas o saliva, no requiere de personal capacitado para la obtención de las muestras (Hawkins et al., 1986; Lewis et al., 1987). Las características generales de los kits de diagnóstico para el FeLV se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los Kits comerciales utilizados para el diagnóstico del FeLV

Test	Witness	Snap Combo Plus	Fastest	Duo Speed	Virachek FeLV	PetChe 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

 Disponibles en México (Adaptado de Hartmann, 2007).

1.9 Tratamiento

El tratamiento es paliativo y sintomático ya que no existe un tratamiento que elimine al FeLV. Los gatos virémicos deben de recibir un tratamiento agresivo y terapia de sostén. En gatos que presentan anemia no regenerativa el uso de transfusiones sanguíneas puede prolongar la vida del mismo, pero el pronóstico sigue siendo malo (Solange et al., 2012). En gatos con la forma no neoplásica se han empleado terapias antivirales o viroestáticos, como los que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Antivirales descritos para el tratamiento del FeLV

Antivirales	Dosis
AZT (3-azido-2'-dideoximidina)	5 mg/kg/c 12h *SC
PMEA (9-2-fosfonilmeto-xientil-adenina)	2.5 mg/kg/c 12h por 3 semanas
Zidovudina	5mg/kg/c 12h
Interferón Omega	106 UI/kg/c 24h

*SC vía subcutánea (Adaptado de *Basurto et al., 2005*).

La quimioterapia en gatos con desarrollo de tumores permite usar fármacos como la ciclofosfamida, vincristina y prednisona combinadas (COP) y se puede adicionar doxorubicina (COPA). Pero en leucemias inducidas por el FeLV los resultados de la quimioterapia son desfavorables (*Greggs et al., 2012, Arjona et al., 2000; Hartman, 2006*).

1.10 Prevención

La castración de los gatos es una sugerencia como método “preventivo”, así los gatos no salen de su casa por lo que existe una menor convivencia con gatos en situación de calle infectados con el FeLV (*Basurto et al., 2005*).

1.10.1 Vacunación

Antes de la aplicación de la vacuna es conveniente valorar su estatus serológico al FeLV por pruebas de laboratorio, ya que esta enfermedad tiene un curso largo y se puede vacunar a un animal infectado, sin embargo, en la clínica privada no se llevan a cabo este tipo de monitoreos (*Autran et al., 2013; Möstl et al., 2013*).

Históricamente las vacunas han tenido diversos grados de eficacia para proteger contra la enfermedad ocasionada por el FeLV (*Sparkes, 1997*). Se cree que la inmunidad al FeLV-A protege a los gatos contra cualquier otro subgrupo, ya que es genética y antigénicamente estable (*Chandler et al., 2004*). El consejo europeo de enfermedades del gato en el 2007 (*European ABCD*) recomienda vacunarlos en edades de entre las 8 a las 12 semanas y

posteriormente solo revacunar a gatos expuestos. Así mismo, recomienda la vacunación contra rinotraqueitis, calicivirus, panleucopenia y rabia, que debe ser periódica y con virus inactivado.

Es importante mencionar que gatos infectados con el FeLV no son capaces de montar una adecuada respuesta inmune a la vacunación contra la rabia (*Hartmann, 2011*).

1.11 Control

Un punto importante para el control de la prevalencia de la enfermedad es el separar los gatos infectados de los no infectados dentro de albergues, así como un área de cuarentena para los de nuevo ingreso y su monitoreo constante con pruebas diagnósticas (*Doménech et al., 2006*).

El FeLV es muy inestable fuera del hospedero y se destruye fácilmente con desinfectantes como: el jabón y alcohol, también por calor y desecación. Por lo tanto la transmisión a través de fómites es poco probable, si el ambiente se mantiene controlado (*Sherding, 1996; MacLachlan, 2011*). *Chandler et al., 2004* menciona que en lugares cerrados con múltiples gatos hay una carga viral alta.

2. Justificación

Evaluar la eficacia del Inmuno Dot para la detección de anticuerpos al FeLV, ya que puede ser utilizada de forma rutinaria con fines de estudios epidemiológicos en la práctica clínica en México. Además, de ser una técnica adecuada para monitorear la respuesta inmune mediada por anticuerpos que se genera después de la vacunación.

3. Hipótesis

Si el diagnóstico del FeLV se realiza rutinariamente utilizando pruebas comerciales que detectan antígeno viral en sangre por inmunocromatografía, entonces, también sería factible detectar anticuerpos a la proteína p45 (fracción de la gp70), con el fin de establecer una prueba cualitativa como lo es Inmuno Dot. La calidad de esta técnica se puede validar con otras pruebas serológicas.

4. Objetivo General

Estandarizar la técnica de Inmuno Dot para el diagnóstico serológico del FeLV.

4.1 Objetivos Particulares

- A. Implementar la prueba de Inmuno Dot a partir del uso de sueros de gatos previamente evaluados por la técnica de ELISA indirecto (ELISAI) y Western blot (WB).
- B. Determinar la sensibilidad, especificidad y concordancia de la técnica de Inmuno Dot con respecto a las técnicas serológicas de ELISAI y WB.

5. Materiales y Métodos

5.1 Colección de muestras

A partir de la colección de muestras de sangre sin anticoagulante de 110 gatos, obtenidas por venopunción de la arteria cefálica. El suero fue separado de la sangre por centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos y fue conservado a -20° C hasta su uso. Las muestras fueron divididas en dos grupos de estudio Grupo1 (n=29) y Grupo 2 (n=81) ver Apéndice 2, 3 y 4. En ambos casos se trato de un grupo heterogéneo de gatos. Es importante mencionar que solo del Grupo 2 se pudieron recopilar datos de los gatos muestreados como fueron, de donde provenían cada gato, los signos que presentaban, cuántos de ellos estaban esterilizados, así como, si provenían del D.F. o del Edo. de México (Apéndice 13); mientras que del Grupo 1 solo se tuvieron datos de la edad y el sexo, ya que fueron muestras obtenidas de un antirrábico. Los sueros se evaluaron inicialmente con dos pruebas serológicas, ELISAI y WB, las cuales se realizaron según lo descrito por *Zagal, 2011* y *Carrión, 2012*. Como sueros control positivo y control negativo se utilizaron los provenientes de animales con y sin signos clínicos sugestivos de la enfermedad, además de confirmarse por PCR.

5.2 Antígeno

Se utilizó una vacuna comercial generada a partir de una fracción de la glicoproteína 70 (gp70) llamada p45, desarrollada por ingeniería genética y utilizada para la inmunización

activa contra la leucemia viral felina, en donde 1ml contiene: 102 µg de p45 y c. b. p. 1ml de excipiente.

5.2.1 Determinación de proteína por el método de Bradford (Micrométodo)

Para confirmar la cantidad de proteína se utilizó el micrométodo de Bradford. Para lo cual se preparó una solución estándar de proteína de 10 mg/ml de gammaglobulina (γGB) y se realizó una dilución de 1:10 30µl/270µl de solución salina fisiológica. En una placa de 96 pozos de fondo plano se depositaron 40 µl de la dilución de la muestra correspondiente y se agregaron 180µl del reactivo de 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 muestra problema + 45 µl de solución salina) y 1:25 (2 µl de proteína problema + 48 µl de solución salina), 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 una 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, ver Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la concentración de proteínas obtenidas en la muestra vacunal determinado 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

Se obtuvo una concentración de proteína de 6.6µg/µl de antígeno vacunal recombinante.

5.3 Estandarización de la técnica de Inmuno Dot

Se estandarizó la técnica de Inmuno Dot para la detección de anticuerpos contra el FeLV utilizando diferentes concentraciones de antígeno, anticuerpo primario y conjugado. Se realizaron y valoraron todas las variantes para determinar las condiciones óptimas para la prueba las cuales se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Estandarización de la técnica de Inmuno Dot

Valores	Ag vacunal μl	Ac primario Dilución	Ac primario μl	Conjugado Dilución	Conjugado μl	Solución de bloqueo	Solución de lavado
Variantes	25	1:100	50	1:1000	30	1%	0.1%
	25	1:100	50	1:1000	50	1%	0.1%
	25	1:500	50	1:1000	50	1%	0.1%
	50	1:50	50	1:500	50	0.2%	0.2%
	50	1:50	50	1:1500	100	0.2%	0.2%

Ag. Antígeno.

Ac. Anticuerpo.

 Valores con los que se estandarizó la técnica.

5.4 Inmuno Dot

La evaluación de los 110 sueros se basó en lo descrito por *Manoharan*, 2004, con algunas modificaciones, las cuales se describen brevemente: se cortaron círculos de nitrocelulosa de un diámetro de 0.7cm (Bio Rad). En ellos se adicionó 50μl (330μg) de la proteína p45 y se incubó a temperatura ambiente por 1 hr. Posteriormente se bloqueó con 50μl de buffer de bloqueo (Apéndice 1, A) e incubo durante 1 hr a 37°C. Luego se realizaron cinco lavados

con una duración de dos minutos cada uno con buffer de lavado (Apéndice 1, B). Enseguida se colocó el suero problema diluido 1:50 (Apéndice 1, C) con buffer de dilución (Apéndice 1, D) y se incubó 1hr a 37°C, al finalizar se realizó el lavado como previamente se ha descrito. Se adicionó a cada pozo 100µl de conjugado (Anti-cat IgG de AbD Serotec) diluido 1:1500 (Apéndice 1, E) y se incubó por 1hr a 37°C, para posteriormente realizar los lavados. Finalmente, se reveló la reacción antígeno-anticuerpo utilizando solución reveladora (Apéndice 1, F) y 0.2% de peróxido de hidrógeno (Apéndice 1, G) agregando 100µl de esta solución a cada muestra e incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con agua corriente para realizar la lectura de forma visual, los sueros positivos se tiñeron de un color marrón indicando la formación del complejo antígeno-anticuerpo en el papel de nitrocelulosa y los negativos no presentaron color, de esta forma se agruparon en sueros positivos y negativos.

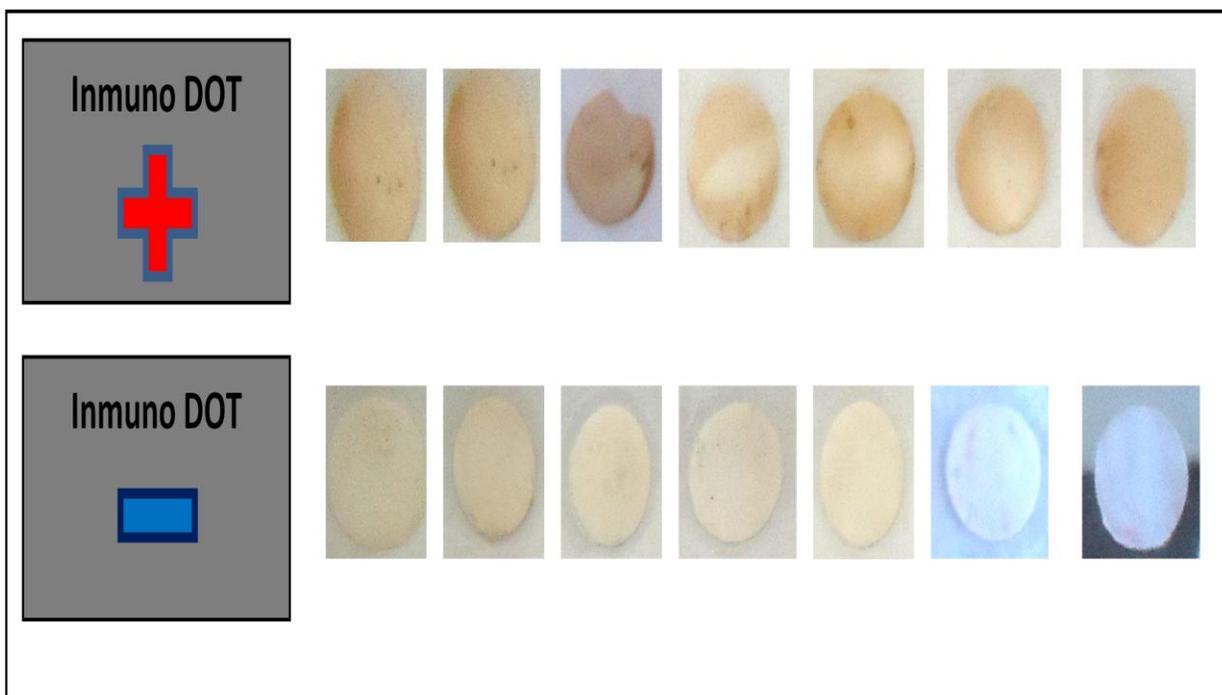
5.5 Análisis de resultados

Para analizar los resultados se realizaron tablas de contingencia de 2x2 considerando las técnicas de ELISAI y WB. Esta última prueba serológica se utilizó como prueba de oro para calcular y determinar la sensibilidad, especificidad y concordancia prueba kappa, con la ayuda del programa Win Episcopy 2.0.

6. Resultados

Las lecturas de los resultados se realizaron visualmente de forma cualitativa como se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Lectura visual de los resultados obtenidos de algunos sueros evaluados con Inmuno Dot para identificar anticuerpos contra el virus del FeLV.



6.1 Distribución de la población de estudio por edades

La distribución de las muestras obtenidas de los gatos por edades en ambos grupos se observa en la Tabla 7, en donde con excepción del número de gatos con edades no determinadas (ND) podemos observar que en el intervalo de 0-12 meses la edad más frecuente de los 110 gatos del estudio.

Tabla 7. Población de los gatos de estudio distribuidos por edades

Edad en Meses	0-12	13-24	25-36	37-48	+48	ND	Total
No. de Gatos	35	16	5	2	10	42	110
% de gatos	32	14	5	2	9	38	100

ND: no determinado

6.2 Distribución de la población de estudio por sexo

En la Tabla 8 se observa la distribución de las muestras de ambos grupos de gatos, respecto al sexo, haciendo evidente la mayor cantidad de muestras provenientes de hembras con un 48% sobre un 38% de los machos.

Tabla 8. Distribución por sexo de los gatos utilizados en el estudio

Sexo	No. De Gatos	%
Hembra	53	48
Macho	42	38
ND	15	14
Total	110	100

ND: no determinado

6.3 Resultados en las pruebas serológicas de ELISAI, WB e Inmuno Dot utilizadas para la detección de anticuerpos contra el FeLV

Los resultados obtenidos en las tres pruebas serológicas realizadas ELISAI, WB e Inmuno Dot se muestran en la Tabla 9; en donde se muestran los porcentajes de las mismas encontrando que con la técnica de Inmuno Dot se detectó una mayor cantidad de muestras seropositivas con un 82% (n=110) y en contraparte, un menor número de muestras negativas con un 18%. El Apéndice 2, A y B contiene los resultados pormenorizados de cada uno de los gatos evaluados a las tres pruebas.

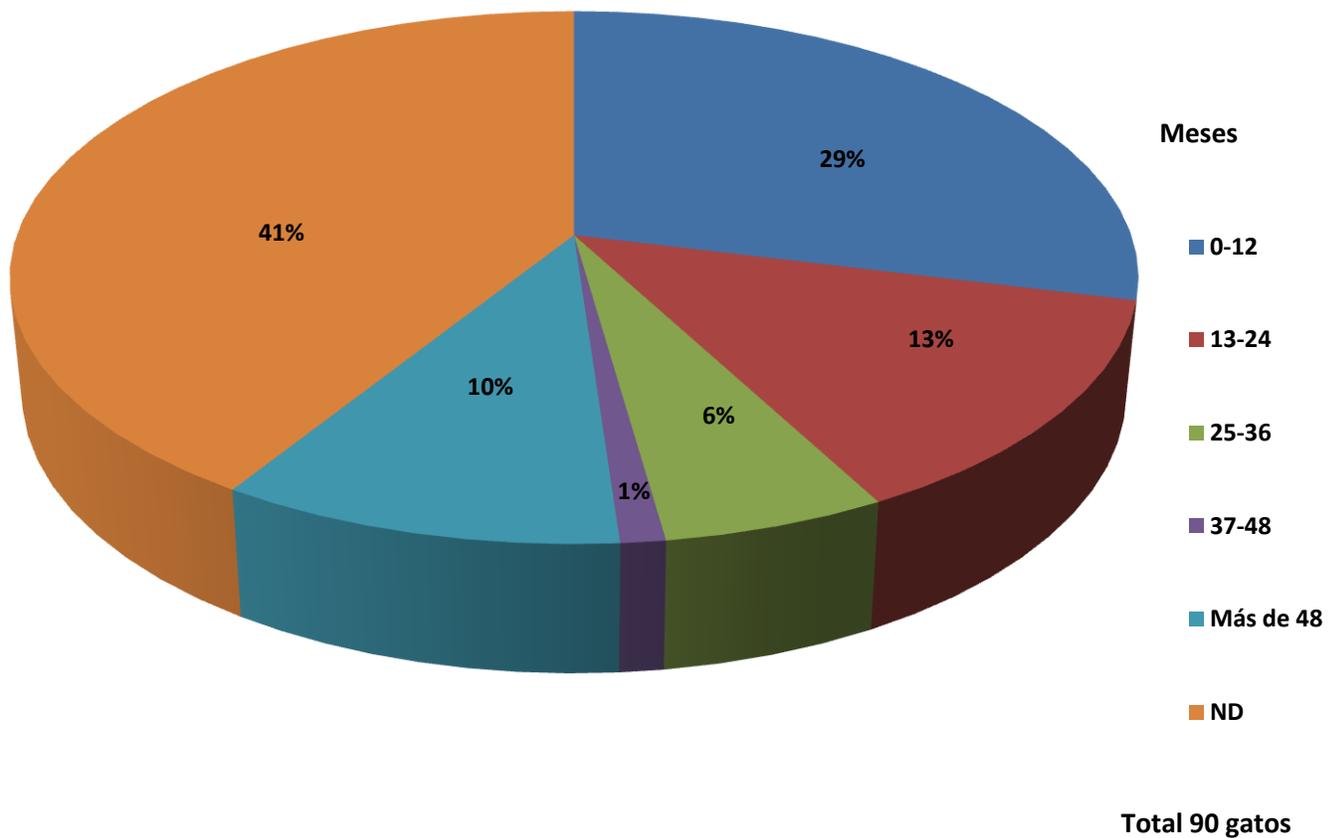
Tabla 9. Resultados obtenidos de la evaluación de 110 sueros de gatos en las pruebas de ELISAI, WB e Inmuno Dot para la detección de anticuerpos contra el FeLV

	ELISAI	%	WB	%	Inmuno Dot	%
Positivos	87	79	86	78	90	82
Negativos	23	21	24	22	20	18
Total	110	100	110	100	110	100

6.4 Resultados en la prueba de Inmuno Dot respecto al rango de edades de los gatos en estudio

Los resultados obtenidos en la evaluación de 110 sueros felinos en la prueba de Inmuno Dot se distribuyeron en 82% de gatos seropositivos (n=90) y 18% de seronegativos (n=20). Los gatos con resultado seropositivos se muestran en la Figura 3, según los rangos de edades del grupo de estudio.

Figura 3. Distribución de los resultados seropositivos obtenidos en la prueba de Inmuno Dot respecto a la edad de los gatos de estudio



El mayor número de gatos seropositivos al FeLV obtenido en la prueba de Inmuno Dot fue en el rango de edad de 0 a 12 meses (26/35) como se observa en la Tabla 10. Sin embargo, si se analizan los resultados considerando el mayor porcentaje de animales seropositivos en cada rango de edad, para el caso de los gatos con una edad comprendida de entre 25 a 36 meses resultaron con el 100% (5/5) de seropositividad Tabla 11. Otro grupo con una alta seropositividad fue el que incluyo gatos donde no fue posible determinar la edad.

Tabla 10. Distribución de los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot respecto a la edad de los gatos del estudio

Edad de los gatos en meses	Positivos	Negativos	Total
0-12	26	9	35
13-24	12	4	16
25-36	5	0	5
37-48	1	1	2
Más de 48	9	1	10
ND	37	5	42
Total	90	20	110

ND: no determinado

Tabla 11. Porcentajes de los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot respecto a la edad de los gatos del estudio.

Edad de los gatos en meses	Gatos	%Positivos	%Negativos
0-12	35	74.3	25.7
13-24	16	75.0	25.0
25-36	5	100.0	0.0
37-48	2	50.0	50.0
Más de 48	10	90.0	10.0
ND	42	88.1	11.9

ND: no determinado.

6.5 Resultados en la prueba de Inmuno Dot respecto al sexo de los gatos de estudio

Los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot utilizada para identificar anticuerpos contra el FeLV, según el sexo de los gatos se observan en la Tabla 12. Encontrando un mayor número de hembras seropositivas.

Tabla 12. Resultados en la prueba de Inmuno Dot respecto al sexo de los gatos de estudio

	Muestras	Positivos	Negativos	% Positivos	% Negativos
Hembras	53	46	7	86.8	13.2
Machos	42	32	10	76.2	23.8
ND	15	12	3	80	20

ND: no determinado

6.6 Signos clínicos encontrados en gatos con resultado positivo en la prueba de Inmuno Dot

Los gatos que presentaron signos clínicos sugestivos a la infección por el FeLV fueron 43 (n=81), ver Tabla 13. Es importante mencionar que de los animales del grupo 1 provenientes del antirrábico no fue posible recabar información sobre los antecedentes clínicos.

Tabla 13. Signos clínicos asociados a la posible infección por el FeLV en gatos con resultado seropositivo en la prueba de Inmuno Dot, WB y ELISAi

Signos clínicos	Inmuno Dot		WB		ELISAi	
	No. de animales	%	No. de animales	%	No. de animales	%
Anorexia	6	14	3	9	3	9
Lesiones cutáneas	4	9	1	3	3	9
Problemas oculares, cavidad bucal, cavidad nasal	26	60	24	70	22	64
Parálisis	2	5	2	6	2	6
Problemas urinarios	1	2	0	0	0	0
Peritonitis Infecciosa Felina (PIF)	2	5	2	6	2	6
Palidez de mucosas	2	5	2	6	2	6
TOTAL	43	100	34	100	34	100

6.7 Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot de gatos esterilizados

Con la finalidad de analizar si existe una posible correlación entre la seropositividad de los gatos y el hecho de que estén o no esterilizados, se analizaron los gatos del grupo 2, en el cual se contó con la información respecto al sexo de 70 gatos que conformaron dicho grupo. Catorce gatos estaban esterilizados y de ellos 11 son hembras y 3 machos, y solo una hembra resulto seronegativa Tabla 14 (Apéndice 4).

	Esterilizados	Positivos	Negativos	% Positivos	% Negativos
Hembras (n=38)	11	10	1	91	9
Machos (n=32)	3	3	0	100	0

Tabla 14. Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot de los gatos esterilizados

6.8 Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot según la procedencia geográfica de los gatos del estudio

Con respecto al lugar de procedencia de los gatos muestreados del grupo 2, así como sus respectivos resultados en la prueba de Inmuno Dot se muestran en la Tabla 15. Se puede observar que la mayor afluencia de muestras felinas provenían del Estado de México con 49 gatos de los cuales 43 resultaron positivos al ser evaluados.

Tabla 15. Resultados serológicos en la prueba de Inmuno Dot según la procedencia geográfica de los gatos del estudio

	Positivos	% de Positivos	Negativos	% de Negativos
D.F.	18	85.7	3	14.3
Edo. de México	43	87.8	6	12.2
ND	8	72.7	3	27.3

ND: no determinado.

7. Resultados de sensibilidad, especificidad y concordancia

7.1 Determinación de la sensibilidad, especificidad y concordancia de la prueba de Inmuno Dot frente a WB

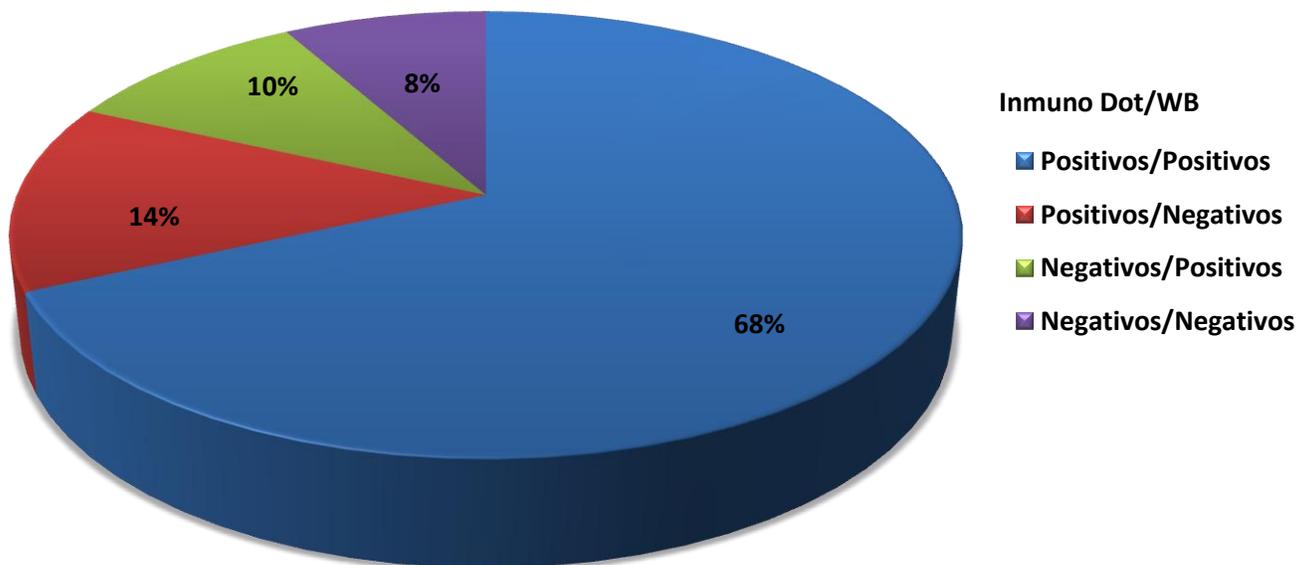
En la Tabla 16 se muestra el cuadro 2x2 analizados en el programa Win Episcope 2.0, en donde 75 de las 110 muestras evaluadas resultaron positivas a las pruebas de Inmuno Dot y WB, así como 9 negativas a ambas pruebas, lo que nos deja un total de 26 muestras discordantes, lo que representa un 24% del total que se observa en la Figura 4.

Una vez analizados los datos los resultados fueron los siguientes; una sensibilidad de 87.2%, una especificidad de 37.5%, una confianza del 95% y un valor kappa de 0.263.

Tabla 16. Tabla de contingencia donde se comparan los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot frente a WB para la detección de anticuerpos contra el FeLV.

		WB		
		Positivos	Negativos	Total
Inmuno Dot	Positivos	75	15	90
	Negativos	11	9	20
Total		86	24	110

Figura 4. Comparación de resultados serológicos en las pruebas de Inmuno Dot y WB para la detección del FeLV.



7.2 Determinación de la sensibilidad, especificidad y concordancia de la prueba de de Inmuno Dot frente al ELISAi

Los datos evaluados en el programa Win Episcopo 2.0 para el análisis del Inmuno Dot frente al ELISAi se muestra en la Tabla 17, donde 79 de las 110 muestras evaluadas a ambas pruebas fueron concordantes y 31 discordantes, lo que representa un 28% de discordancia entre las pruebas, ver Figura 5.

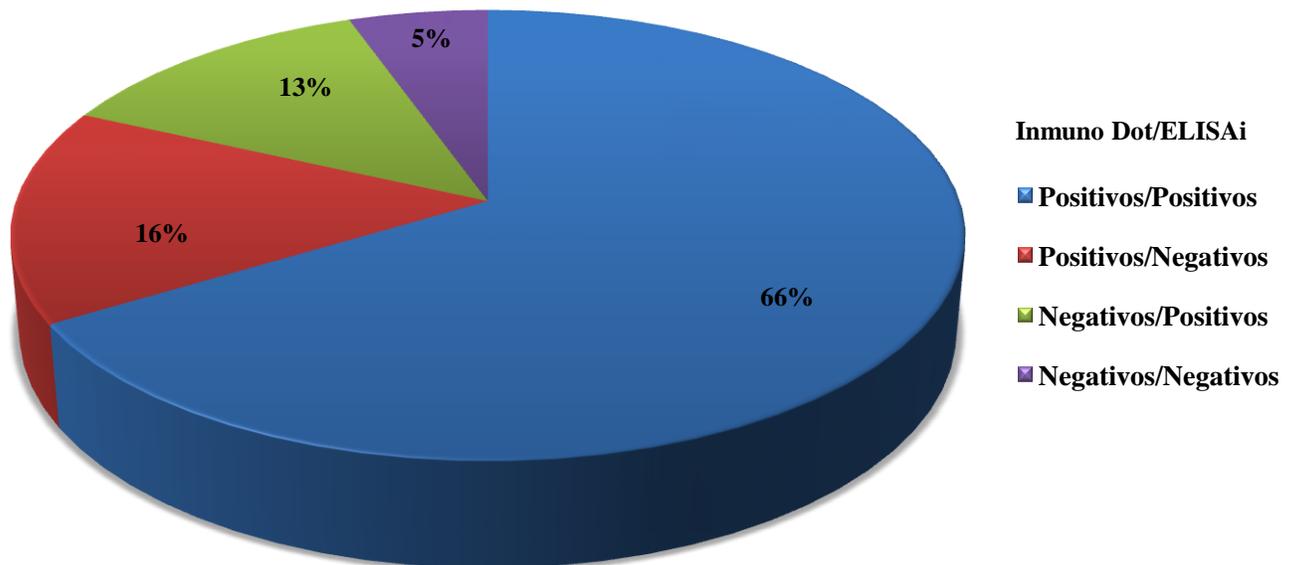
Los resultados obtenidos fueron sensibilidad 83.9%, especificidad de 26%, confianza del 95% y un valor kappa del 0.105 de la evaluación del Inmuno Dot frente al ELISAi.

Tabla 17. Tabla de contingencia donde se comparan los resultados obtenidos en la prueba de Inmuno Dot frente a ELISAi para la detección de anticuerpos contra el FeLV.

		ELISAi		
		Positivos	Negativos	Total
Inmuno Dot	Positivos	73	17	90
	Negativos	14	6	20

Total	87	23	110
--------------	----	----	-----

Figura 5. Comparación de resultados serológicos en las pruebas de Inmuno Dot y ELISAI para la detección del FeLV.



8. Discusión

El diagnóstico del FeLV es complejo debido a la patogenia y el comportamiento del virus dentro del hospedero. A pesar de contar con kits comerciales disponibles en el mercado a nivel internacional y nacional, estos solo detectan antígenos. Sin embargo, en México no se ha establecido cual es la sensibilidad y especificidad de dichos kits. Aspectos relevantes que permiten identificar la calidad de las pruebas de diagnóstico y lo cual si fue determinado para la prueba de Inmuno Dot en el presente estudio. Es importante mencionar que las pruebas de diagnóstico comerciales son adecuadas cuando el animal está en fase de viremia (*Cano et al., 2011*) y en el presente estudio solo algunos animales presentaron signos clínicos relacionados con el FeLV.

El objetivo de la estandarización y evaluación de la técnica de Inmuno Dot en el presente estudio fue para identificar anticuerpos del tipo IgG contra el FeLV. Algunas ventajas de esta alternativa diagnóstica, además de detectar anticuerpos, es que es de fácil realización, la lectura de los resultados es visual, por lo que no es necesario equipo especializado, lo que conlleva a disminuir costos si se compara con otras técnicas diagnósticas como WB, ELISAi y PCR. Estas últimas técnicas no se utilizan de forma rutinaria para el diagnóstico del FeLV y los estuches de diagnóstico utilizados en México solo detectan antígeno (*Hartmann et al., 2007*). La prueba de Inmuno Dot es ampliamente usada para valorar la respuesta humoral en enfermedades infecciosas, mostrando buenos resultados (*Montenegro et al, 1992., Saravanan et al, 2006., Manohara et al, 2010*), como lo conseguido en el presente estudio. Sin embargo, en este estudio solo se utilizó una fracción de la proteína p45 del virus de Leucemia Felina gp70, lo que pudo ser una causa que disminuyó la sensibilidad.

Zhenchao, (2012) menciona que la técnica de Inmuno Dot es sensible y confiable, tal y como es cualquier prueba de diagnóstico rutinaria realizada en el laboratorio. En el presente estudio, el Inmuno Dot estandarizado para identificar anticuerpos contra el FeLV presentó una buena sensibilidad y especificidad, coincidiendo con lo descrito por *Zhenchao, (2012)*. El Inmuno Dot estandarizado mostró un 87.2% de sensibilidad con respecto a WB y un

83.9% con respecto a ELISAI, la especificidad fue de 37.5% con respecto al WB y 26% con respecto a ELISAI. Los resultados obtenidos muestran que la sensibilidad fue buena, similar a la obtenida en otros trabajos que han utilizado la técnica para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis y babesiosis bovina, donde se registraron valores de 93% de sensibilidad y 96% de especificidad (*Montenegro, 1992*). Así mismo, *Linares* en 2010 reporto una especificidad de 95.5% y una sensibilidad de 93.1% utilizando el Inmuno Dot para detectar anticuerpos contra distemper, también *Sultana* en 1999 utilizando la técnica de Inmuno Dot, determino una sensibilidad de 100% y una especificidad de 82%, esta determinación se realizó comparándola con la técnica de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG) y buscando anticuerpos contra gumboro; la prueba de IDAG es una prueba específica pero poco sensible. También *Waner, (2003)* comparó la técnica de Inmuno Dot con la prueba de Inmunofluorescencia obteniendo buena sensibilidad y especificidad en ambas técnicas, para la detección de la infección de parvovirus y distemper canino, sin embargo, en el presente estudio, los resultados de especificidad fueron bajos y las pruebas de referencias fueron dos pruebas que se reconocen que tienen muy buena sensibilidad y especificidad, ELISAI y WB y no solo esto, el antígeno utilizado en las tres pruebas serológicas fue el mismo obtenido de una vacuna. Una posible explicación de la baja especificidad es que posiblemente se acumularon restos de la vacuna y de cada uno de los elementos que intervienen en el desarrollo de la técnica de Inmuno Dot, y que los lavados no fueron suficientes para eliminarlos, generando precipitados de color marrón que se reconocieron como positivos. También es posible mejorar la especificidad si se utilizaran otros péptidos antigénicos o el virus completo ó específico de la región geográfica de prevalencia del FeLV y de la población de gatos a evaluar.

Es importante también tener en cuenta que el antígeno utilizado en este estudio fue solo una proteína fracción p45 derivada de la gp70, mientras que en otros estudios utilizan el antígeno viral completo (*Waner et al., 2003; Zhenchao et al., 2012*) lo que pudo ser un factor que estuviera relacionado con una baja sensibilidad, que las reportadas en otros trabajos. La técnica de Inmuno Dot puede tener la ventaja de detectar anticuerpos antes y después de la vacunación, así como de utilizarla para monitorear títulos de anticuerpos en un animal, lo cual no fue evaluado en el presente estudio. Por otro lado, en el presente estudio se determinó el valor de la prueba kappa, la cual permite establecer la concordancia

entre una prueba de diagnóstico con otra, aspecto que no ha sido documentado en otros estudios como en el caso de la técnica de IDAG utilizada por *Waner* en 2003 para el diagnóstico de parvovirus y distemper canino y en el caso de la técnica de inmunofluorescencia establecida para el diagnóstico de la enfermedad infecciosa de la bursa, por *Sultana* en 1999.

Se considera que la obtención de un antígeno viral completo del FeLV, así como sus posibles variantes, podría mejorar la detección de animales infectados por serología.

Los kits comerciales utilizados para el diagnóstico del FeLV detectan antígeno y/o proteínas virales en la sangre del animal, sin embargo, no existe un kit comercial que se base en la detección de anticuerpos, tal como el que se propone en el presente estudio con el uso de la técnica de Inmuno Dot. Otro aspecto importante a resaltar es que dichos kits comerciales detectan el antígeno p27, no obstante, en el presente estudio el objetivo fue detectar anticuerpos que reconozcan una fracción de la gp70 (p45) del FeLV, la cual es considerada un antígeno involucrado en la generación de anticuerpos neutralizantes contra el virus (*Langhammer et al., 2011*).

Una ventaja con la que cuentan los kits comerciales es la detección de la proteína viral p27 que está presente en la fase de viremia, No obstante, la proteína 45 de la gp70 utilizada en este estudio por Inmuno Dot, fue capaz de detectar animales aparentemente sanos, a través de detectar anticuerpos, además también se ha descrito que la glicoproteína de la envoltura viral permanece más tiempo en animales infectados lo que hace factible la detección de anticuerpos utilizando técnicas serológicas (*Zagal, 2011; Carrión, 2013, Autran, 2013*).

Se ha descrito que pueden existir hasta un 30% de resultados falsos negativos con el uso de kits comerciales, debido a que estos no son adecuados para detectar la p27 en fluidos como saliva y lagrime, debido a la baja concentración de esta proteína en estos fluidos y si a esto se le suma la eliminación intermitente de virus, es posible que algunas veces no sea factible la detección de la infección en los gatos (*Cano et al., 2011*). Una de las ventajas del Inmuno Dot es que tiene un rango más amplio de tiempo para la detección de anticuerpos en el animal infectado. Aunque hay que considerar que esta prueba no diferencia los anticuerpos

generados por enfermedad de los generados por vacunación, pero puede servir para monitorear los anticuerpos como respuesta a la vacunación.

Basurto en 2005 menciona que después de una exposición continua al FeLV, no se puede detectar el virus antes de las cuatro semanas. Mientras que *Guyton* en 1975 señala que después de un primer contacto con un antígeno los anticuerpos aparecen entre los 7 a 10 días posteriores y seguirán produciéndose hasta 4 a 6 meses después, por lo que una prueba diagnóstica basada en la detección de anticuerpo es una buena opción y aun en el periodo de latencia, los anticuerpos pueden ser detectados y demostrar la respuesta al antígeno viral.

La discordancia obtenida en las pruebas serológicas comparados con el Inmuno Dot pueden ser debidas a la forma de presentar la proteína (p27, p45, gp70 y/o virus completo) en la prueba (fijado en la placa o en una membrana de nitrocelulosa), sin embargo, todas tienen un fin práctico para la detección de la enfermedad.

Un método sugerido para prevenir la enfermedad del FeLV es la castración, ya que esto permite un control sobre los animales, por lo que evita menos contacto con los posibles animales infectados. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no mostraron una diferencia entre animales esterilizados y no esterilizados. Además, la cultura de la esterilización en gatos no es común en México. Hay estudios que indican que un animal puede salir negativo a los kits diagnósticos e identificar la presencia de anticuerpos en un estudio serológico, algo muy parecido a lo encontrado en un animal en este estudio, lo que refuerza la idea de generar pruebas diagnósticas para detectar y/o monitorear anticuerpos en felinos domésticos (*Basurto et al., 2005*).

En poblaciones densas de felinos, la infección del FeLV puede permanecer y difundirse intermitentemente y las proteínas virales pueden detectarse en solo ciertos periodos de la infección donde no exista latencia, sin embargo, la detección de anticuerpos es factible (*Chandler et al., 2004, European ABCD, 2007*).

Los resultados encontrados en la población de estudio del D.F. y el Edo. de México concuerdan con los trabajos previamente reportados que demuestran la existencia de la

enfermedad (46% de gatos seropositivos), en el presente estudio se encontró en promedio un 86.75% de gatos seropositivos, lo que parece indicar un incremento de seropositividad en el centro del país, que puede deberse a infecciones recientes y la posible vacunación. Así mismo el presente estudio permite aportar información sobre el estado de la enfermedad en el país, además de continuar con la línea de investigación en retrovirus felinos que no existe en el país (*Zagal, 2011*).

Por otro lado, *Arjona* en 2000 realizó un estudio con gatos de ambos sexos en el que encontró una mayor seropositividad al FeLV en machos que en hembras, por lo que concluyó que los machos son una fuente de infección importante. Sin embargo, lo encontrado en el presente estudio fue que de las muestras de ambos grupos, se demostró un mayor porcentaje de seropositividad en hembras (86.8%) con respecto a machos (76.2%). Por lo que es factible pensar que ambos sexos son importantes en la diseminación de la enfermedad.

La *European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD)* en 2007 menciona que los gatos jóvenes muestran una mayor predisposición para contraer el FeLV, sin embargo, *Suntz* en 2010, señala que los gatos mayores de un año son más susceptibles. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo descrito por *Suntz*, encontrando más animales mayores de un año seropositivos y posiblemente infectados (2.1-3 años el 100%, 1.1-2 años el 75%). No obstante, también en el grupo de gatos menores de un año se detectó un porcentaje de seropositividad alto del 74.3% (*European ABCD, 2007*).

Por otro lado la infección del FeLV se ha reportado asociada con otros agentes etiológicos (calicivirus felino) (*Solange et al., 2012*). Debido a la supresión inmunológica que provoca el virus, facilita la presentación de signos clínicos como problemas oculares, lesiones en cavidad bucal y cavidad nasal, estos signos clínicos también se observaron en el presente estudio en un 60% de la población analizada (n=81).

9. Conclusiones

La técnica de Inmuno Dot es una metodología práctica y los resultados que se obtienen son cualitativos ya que la lectura se realiza visualmente y no es necesaria la utilización de equipos especiales.

Es factible utilizar la prueba de Inmuno Dot para la detección de anticuerpos contra el FeLV.

La técnica de inmuno Dot puede ser una herramienta para valorar la prevalencia en una población determinada al FeLV y es posible utilizarla con el fin de monitorear anticuerpos en felinos después de la vacunación.

Este estudio permitió ampliar la seroteca del laboratorio con sueros categorizados como seropositivos y seronegativos al FeLV.

Se demostró que la seroprevalencia de FeLV en D.F. y Edo. de México va en aumento. Que hembras y machos son importantes en la diseminación de la infección ya que no se mostraron diferencias significativas por el sexo de los gatos.

Se obtuvieron un 82% de muestras positivas y un 18% de muestras negativas.

Mostro una sensibilidad de 83.9%, especificidad de 26% y un valor kappa de 0.105 respecto a ELISAI.

Evaluada frente a WB se obtuvo una sensibilidad de 87.2%, una especificidad de 37.5% y un valor kappa de 0.263.

10. Bibliografía.

- Ames K. Inmuno serology of infectious diseases, *Clin Microbiol Rev*, 1990;3:132-152.
- Arjona A, Escolar E, Soto I, Barquero N, Martin D, Gómez-Lucía E. Seroepidemiological Survey of Infection by Feline Leukemia Virus and Immunodeficiency Virus in Madrid and Correlation with Some Clinical Aspects. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(9): 3448–3449.
- Atmar R., Englund J. Laboratory methods for the diagnosis of viral diseases, *Viral infections of humans*, 4a edition, Plenum Publishing Co., 1997:229-251.
- Autran MM, Arcila LTG, Montes OA, García FMM, Moreno NRB, Sánchez Gasca JH, Martínez RHA. Evaluación y estandarización de dos técnicas serológicas para, el diagnóstico de Leucemia Viral Felina (FeLV). Asociación Mexicana de Médicos veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies, AMMVEPE, XXXI Congreso Nacional Dra. Irene Joyce Blank, Qro. 2013.
- Basurto AFJ, Marín HJ. Enfermedades Infecciosas, Diplomado a Distancia en Medicina, Cirugía y Zootecnia en Perros y Gatos, Editorial UNAM, Sexta Edición Enfermedades virales de los gatos Leucemia Viral Felina, 2005:14-31.
- Birchard JS, Sherding GR. Manual Clínico de Pequeñas Especies, Editorial McGRAW-HILL, Vol. 1, Primera Edición, Enfermedades infecciosas, virus de la leucemia felina, 1996: 94-104.
- Bolin LL, Levy SL. Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort, *Viruses*, 2011;3:1681-1698.
- Cano H, Gallelli M, Gómez N. Virus de la Leucemia Felina (ViLeF): Actualización, *Revista Veterinaria Argentina*, 2011:280:1-14.
- Carrión VEL. Evaluación de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina utilizando la proteína gp70 (epítotope p45), (Tesis de Licenciatura) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), 2012.
- Cattori V, Tandon R, Pepin A, Lutz H, Hofmann R. Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA, *Mol Cell Probes*, 2006;20:172–181.

- Cattori V, Tandon R, Riond B. The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome, *Vet Microbiol*, 2009;133:292-296.
- Chandhasin C, Coan PN, Levy LS: Subtle mutational changes in the SU protein of a natural feline leukemia virus subgroup A isolate alter disease spectrum. *J Virol* 2005;79:1351–1360.
- Chandler EA, Gaskell CJ, Gaskell RM. *Feline Medicine and Therapeutics*, British Small Animal Veterinary Association, Third Edition, 2004:23:597.
- Couto CG, Nelson RW. *Medicina interna de animales pequeños*, Tercera edición, Inter-médica editorial, 2005:2:1191-1201.
- Crespo MP. El diagnóstico viral por el laboratorio, *Colombia Médica*, 2000:31:3.
- De Mari K, Maynard L, Sanquer A, Lebreux B. Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon- ν on Feline Leukemia Virus (FeLV)-Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Coinfected Symptomatic Cats, *J Vet Intern Med* 2004;18:477-482.
- Doménech GA, Collado AVM, Martín NS, Gómez LDE. Patogenia de la leucemia y la inmunodeficiencia felinas. *Canis et felis*, 2006;82:36-54.
- Dunham SP, Graham E. Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinics. Small Animal Practice. Vet Clin Small Anim*, 2008;38:879–901
- European ABCD guidelines on Feline Leukemia Virus. by the European Advisory Board on Cat Diseases, October 2007.
http://www.abcdvets.org/press_releases/Espa%C3%B1ol/071210_abcd_FeLV_pro_es.pdf
- Flynn NJ, Dunham SP, Watson V, Jarrett O. Longitudinal Analysis of Feline Leukemia Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes: Correlation with Recovery from Infection, *Retrovirus Research Laboratory, Department of Veterinary Pathology, University of Glasgow*, 2002;76:2306-2315.
- Fujino Y, Satoh H, Hisasue M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Detection of the integrated Feline Leukemia Viruses in a cat lymphoid tumor cell line by fluorescence in situ hybridization, *J Hered*, 2003;94:3:251–255.

- Gómez-Lucía DE, Arjona SA, Doménech GA, Barneto CA. Diagnóstico de la leucemia y de la inmunodeficiencia felinas. Canis et felis, 2006:82:55-77.
- Greene CE., Enfermedades infecciosas del perro y el gato, McGraw Hill Interamericana, tercera edición, 2008.
- Greggs M, Clouser L, Patterson E, Mansky M. Broadening the use of antiretroviral therapy: the case for feline leukemia virus, Ther Clin Risk Manag, 2011:7:115-122.
- Greggs M, Clouser L, Patterson E, Mansky M. Discovery of drugs that possess activity against feline leukemia virus, J Gen Virol 2012:93:900-905.
- Gutiérrez PJA. Inmunología Veterinaria, Respuesta inmune contra virus, Manual Moderno, Primera edición, 2010:129.
- Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica, Cuarta Edición, Interamericana, Inmunidad y alergia, 1975:128-133.
- Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, Craig E, 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.
- Hartmann K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection, Vet Immunol Immunopathol, 2011:143:190– 201.
- Hartmann K. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review, Viruses, 2012:4:2684-2710.
- Hartmann K. Feline leukaemia virus infection. IN: Infectious Diseases of the dog and cat, 3ª edición, Saunders Elsevier, St. Louis (Mo), 2006.
- Hawkins EC, Johnson L, Pedersen NC, Winston S. Use of tears for diagnosis of feline leukemia virus infection, J Am Vet Med Assoc., 1986:188:1031.
- Helfer HKA, Cattori V, Bachler B, Hartnack S, Riond B, Ossent P, Lutz H, Hofmann R. Quantification and molecular characterization of the feline leukemia virus A receptor, Infect Genet Evol, 2011:11:1940-1950.
- 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. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. Vaccine, 2006:24:1087–1094.

- Jarrett O, Russell PH: Differential growth and transmission in cats of feline leukaemia viruses of subgroups A and B. *Int J Cancer* 1978;21:466–472.
- Jawetz E, Melnick J, Aldelberg E. *Principles of the Diagnostic Medical Microbiology*, 21ra edition, Appleton and Lange, 1999.
- Joklik KW, Willett HP, Amos DB. *Zinsser Microbiología*, 17^a Edición, Editorial Médica Panamericana, Respuestas inmunológicas a la enfermedad infecciosa, 1983.
- Kahn MC, editor, Merck y CO., Inc. *Manual Merck De Veterinaria*, Sexta Edición, Oceano/Centrum., Vol 1, Trastornos Generalizados, Virus de la Leucemia Felina y Enfermedades relacionadas, 2005.
- Kipar A, Kremendahl J, Grant KC, Bothmer VI, Reinacher M. Expression of viral proteins in Feline Leukemia Virus-associated Enteritis, *Vet. Pathology*, 2000;37:129-136.
- Kipar A, Kremendahl J, Jackson L, Reinacher M. Comparative examination of cats with Feline Leukemia Virus-associated Enteritis and other relevant forms of feline enteritis, *Vet Pathology*, 2001;38:359-371.
- Koneman EW., (editores). *Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott, 1992.
- Langhammer S, Fiebig U, Kurth R, Denner J. Increased Neutralizing Antibody Response after Simultaneous Immunization with Leucogen and the Feline Leukemia Virus Transmembrane Protein, *Intervirology*, 2011;54:78–86.
- Lewis MG, Wright KA, Lafrado LJ. Saliva as a source of FeLV antigen for diagnosis of disease, *J Clin Microbiol*, 1987;25:1320.
- Linares VSE, Correa SAM, Velásquez GLH. Diagnóstico de moquillo canino con la prueba Dot-ELISA. *Vet Zootec*, 2010;4(2): 77-84.
- Linenberger ML, Deng T. The effects of feline retroviruses on cytokine expression. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999;72: 343-368.
- Lopez NA, Jacobson RN, Scarlett JM. Sensitivity and specificity of blood test kits for feline leukemia virus antigen. *J Am Vet Med Assoc*, 1989;195:747.
- Lutz H, Jarrett O. Detection of Feline Leukemia Virus Infection in Saliva. *J Clin Microbiol*, 1987;25(5): 827-831.
- Lutz H. Feline retroviruses: a brief review. *Vet Microbiol* 1990;23:131-146.

- MacLachlan NJ, Dubovi JE. Fenner's Veterinary Virology, Elsevier, Fourth Edition, 2011:2:33.
- Manoharan S. Development of Dot - Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Infectious Bursal Disease, Hydropericardium Syndrome and Chicken Anemia Viruses. EJBS, 2010:4:1:8-18
- McIntosh K., (editores). Diagnostic Virology, Fields Virology, 3rd edition, Lippincott Raven, 1996.
- Montaraz CJA. Introducción a la inmunología, Segunda Edición, Universidad Nacional Autónoma de México, Un ejercicio integrador: Inmunidad contra agentes infecciosos, Inmunidad contra virus, 2012:97-98.
- Montenegro JS, Guillen T, Toro M. Dot-ELISA para el diagnóstico serológico de la Anaplasmosis y Babesiosis Bovina, Revista Científica, FCU de LUZ, 1992:11:2.
- Moreno NRB, Martínez RHA, Ramírez AH, Montes OCAN, Arcila LTG, García MM, Autran MM. Uso de la técnica de Inmuno Dot como prueba tamiz para el diagnóstico de anticuerpos contra el virus de Leucemia Viral Felina (FeLV). Asociación Mexicana de Médicos veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies, AMMVEPE, XXXI Congreso Nacional Dra. Irene Joyce Blank, Qro. 2013.
- Möstl K, Egberink H, Addie D, Frymus T, Boucraut BC, Truyen U, Hartmann K, Lutz H, Gruffydd JT, Radford DA, Lloret A, Pennisi GA, Hosie JM, Marsilio F, Thiry E, Belák S, Horzinek. Prevention of infectious diseases in cat shelters, J Feline Med Surg, 2013:15:546-554.
- Nakata R, Miyazawa T, Shin Y-S, Watanabe R, Mikami T, Matsuura Y. Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. Microbes Infect, 2003:25:947-950.
- Pacitti AM. The risk of transmission of FeLV from latently infected cats. En Kirk RW. Current Veterinary Therapy, WB Saunders, 1989:525.
- Pedersen NC. The clinical significance of latent feline leukemia virus infection in cats. Feline Pract, 1984:14:32.
- Porras MR, Doménech GA, Gómez-Lucía MR. Papel de las citoquinas en la infección por el virus de la leucemia felina. RCCV, 2007:1(2):584 – 596.

- Rojko JL, Hardy WD., Feline Leukemia virus and other retroviruses, Diseases and clinical management, Churchill Livingstone, 1989:229.
- Rojko JL, Kociba GJ. Pathogenesis of infection by the feline leukaemia virus. J Am Vet Med Assoc, 1991;199:1305-1310.
- Saravanan P, Balamurugan V, Sen A, Sahay B. and Singh, R.K. Development of dot-ELISA for diagnosis of Peste des petits ruminants (PPR) in small ruminants. J Apl Anim Res, 2006;30:121-124.
- Sherding RG. Enfermedades virales diversas, Manual Clínico de Pequeñas Especies, Primera edición, McGraw Hill Interamericana, 1996.
- Solange G, Leal RO, Duarte A, McGahie D, Sepúlveda N, Siborro I, Cravo J, Cartaxeiro C, Tavares LM. Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter, Res Vet Sci, 2013;94:753-763.
- Soriano A, Pessoa J. Vírus da leucemia felina: análise da classificação da infecção, das técnicas de diagnóstico e da eficácia da vacinação com o emprego de técnicas sensíveis de detecção viral, Ciência Rural, Santa Maria, 2011;41:11:1952-1959.
- Sparkes AH. Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination, J Small Anim Pract 1997;38: 187-194.
- Stewart H, Adema K, McMonagle L, Hosie J, Willett J. Identification of novel subgroup A variants with enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus, Retrovirology, 2012;9:1-48.
- Stewart H, Jarrett O, Hosie M, Willett B. Are endogenous feline leukemia viruses really endogenous?, Vet Immunol Immunopathol, 2011;143:325-331.
- Sultana J, Hussain M, Malik SA, Naeem K. Use of Dot-ELISA for the diagnosis of Infectious Bursal Disease in chickens. Pakistan Vet J, 1999(3):19.
- Suntz M., et al., High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. Vet Immunol Immunopathol, 2010;10:1016.

- Tejerizo G, Doménech A, Illera J, Silván G, Gómez L. Altered plasma concentrations of sex hormones in cats infected by feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus, *Domest Anim Endocrinol*, 2012;42:113-120.
- Tizard IR. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8ª edición. ELSEVIER Print. España. 2009.
- Waner T, Mazar S, Nachmias E, Keren-Kornblatt E, Harrus S. Evaluation of a dot ELISA kit for measuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus, *Vet Rec* 2003;152: 588-591.
- Wilson S, Greenslade J, Sauders G, Holcroft C, Bruce L, Scobey A, Childers T, Sture G, Thompson J. Difficulties in demonstrating long term immunity in FeLV vaccinated cats due to increasing age related resistance to infection, *BMC Vet Res*, 2012;8:125.
- Zagal LNE, *Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina*, (Tesis Licenciatura) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, 2011.
- Zhenchao W, Dandan Y, Xiangyang L, Mengjiao Z, Zhuo C, Liang B, Jiaju L, Linhong J, Deyu H, Song Y, Baoan S. The Development and Application of a Dot-ELISA Assay for Diagnosis of Southern Rice Black-Streaked Dwarf Disease in the Field, *Viruses*, 2012;4:167-183.
- Zinsser, (editores). *Diagnóstico Viral Rápido*, Microbiología, 20 edición, Médica Panamericana, 1994.

11. Apéndice 1.

A. Solución de Bloqueo.

PBS 0.2% Tween + Leche Descremada 5%

20ml PBS + 2ml Tween 20

1g. de Leche Descremada

B. Solución de Lavado.

PBS 0.2% Tween + Leche Descremada 3%

100ml de PBS + 2ml Tween 20 3g de Leche Descremada

C. Dilución de Suero Problema (1/50).

1µl _____ Suero
49µl _____ S. Dilución. } 50µl

D. Solución de Dilución.

100ml de PBS + 2ml Tween 20 1.5g de Leche Descremada

E. Dilución del Conjugado.

0.9µl _____ Conjugado
1.41ml _____ S. Dilución } 1.5ml

F. Solución Reveladora.

5ml de Solución TrisHCl (0.1M)

0.002g de Diaminobencidina 10µl de Peróxido de Hidrógeno.

G. Solución de Peróxido de Hidrógeno 3%.

60ml de PBS + Tween 0.2%

5ml de Peróxido de Hidrógeno

12. Apéndice 2.

A. Resultados serológicos en las pruebas de ELISAi, WB e Inmuno Dot del grupo 1 de los gatos de estudio.

No. De Muestra	Edad	Sexo	WB	ELISAi	Inmuno Dot
3	ND	M	+	+	+
4	ND	M	+	+	+
6	ND	H	+	+	-
7	ND	H	+	+	+
8	2 años	M	+	+	+
9	2 años	H	+	+	+
10	2 años	H	-	-	-
11	ND	H	+	+	+
12	ND	M	+	+	+
16	ND	ND	-	-	+
17	ND	H	-	-	+
18	ND	H	+	+	+
19	ND	M	+	+	+
20	ND	ND	+	+	+
21	ND	H	+	+	+
22	ND	ND	+	+	-
23	ND	H	+	+	+
27	ND	M	+	+	+
28	ND	M	+	+	+
37	1 mes	M	-	-	+
39	2 años	H	+	+	+
42	6 meses	H	+	+	+
43	3 meses	H	+	+	+
44	3 meses	H	-	-	+
45	6 meses	M	-	-	-
46	2 años	H	-	+	-
47	ND	ND	+	+	-
48	8 meses	H	-	+	-
49	2 meses	M	-	+	-

ND: no determinado; H: hembra; M: macho; +: positivo; -: negativo

B. Resultados serológicos en las pruebas de ELISAi, WB e Inmuno Dot del grupo 2 de los gatos de estudio.

No. de Muestra	WB	ELISAi	Inmuno Dot
1	-	+	+
2	+	+	+
4	+	+	+
6	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	-
10	-	+	-
11	-	-	-
12	+	+	+
13	+	-	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	+	-
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	+
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	+	+
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	+	-
28	+	+	+
30	+	+	+
31	+	+	+
32	+	+	-
33	+	+	+
34	+	+	+
37	+	+	+
38	+	+	+
39	+	+	+
42	+	+	+

No. de Muestra	WB	ELISAi	Inmuno Dot
43	+	+	+
45	+	+	+
46	+	+	+
47	+	+	+
49	+	+	+
50	+	-	+
52	+	+	+
54	+	+	+
55	+	+	+
56	+	+	+
57	+	-	+
58	+	+	+
59	+	+	+
60	+	+	+
61	+	+	+
62	+	+	-
63	+	+	+
64	+	+	+
65	+	+	+
66	+	+	+
67	+	+	+
68	+	+	+
69	+	+	+
70	+	+	+
71	+	+	+
72	+	+	-
73	+	+	+
74	+	+	-
75	+	-	-
76	+	+	+
77	-	-	-
78	-	-	+
79	+	+	+
80	+	+	+
81	+	+	+
82	+	+	+
83	-	-	+

No. de Muestra	WB	ELISAi	Inmuno Dot
84	+	+	+
85	-	-	+
86	-	-	+
87	-	-	+
88	-	-	+
89	-	-	+
90	-	-	-
91	-	-	+
92	-	-	+
93	-	-	+

13. Apéndice 3. Sueros de felinos según su procedencia geográfica.

No. de Muestra	Procedencia
1	Edo. Méx.
2	D.F.
4	D.F.
6	D.F.
8	Edo. Méx.
9	D.F.
10	ND
11	D.F.
12	Edo. Méx.
13	ND
14	ND
15	Edo. Méx.
16	ND
17	Edo. Méx.
18	Edo. Méx.
19	D.F.
20	D.F.
21	Edo. Méx.
22	Edo. Méx.
23	D.F.
24	D.F.
25	D.F.
26	D.F.
27	D.F.
28	D.F.
30	ND
31	D.F.
32	Edo. Méx.
33	D.F.
34	D.F.
37	D.F.
38	Edo. Méx.
39	D.F.
42	D.F.
43	Edo. Méx.
45	Edo. Méx.

No. de Muestra	Procedencia
46	Edo. Méx.
47	Edo. Méx.
49	Edo. Méx.
50	Edo. Méx.
52	Edo. Méx.
54	Edo. Méx.
55	Edo. Méx.
56	Edo. Méx.
57	Edo. Méx.
58	Edo. Méx.
59	Edo. Méx.
60	Edo. Méx.
61	Edo. Méx.
62	Edo. Méx.
63	Edo. Méx.
64	Edo. Méx.
65	Edo. Méx.
66	Edo. Méx.
67	Edo. Méx.
68	Edo. Méx.
69	Edo. Méx.
70	Edo. Méx.
71	Edo. Méx.
72	Edo. Méx.
73	ND
74	ND
75	ND
76	Edo. Méx.
77	Edo. Méx.
78	ND
79	D.F.
80	Edo. Méx.
81	Edo. Méx.
82	Edo. Méx.
83	Edo. Méx.
84	Edo. Méx.
85	Edo. Méx.
86	ND

No. de Muestra	Procedencia
87	D.F.
88	ND
89	Edo. Méx.
90	Edo. Méx.
91	Edo. Méx.
92	Edo. Méx.
93	Edo. Méx.

14. Muestras del Grupo 2 y los datos relevantes.

No. de Muestra	Edad	Sexo	Alojamiento	Signos y Datos relevantes
1	9 meses	M	Casa	Lesiones cutáneas
2	2 años	M	Casa/Calle	Lesiones cutáneas
4	8 años	M	Casa	Lesiones cutáneas
6	2 años	H	ND	
8	2 años	H	Casa	
9	2 años	H	Casa	
10	1.5 años	H	Casa	
11	11 años	M	Casa	
12	8 meses	H	Casa	
13	6 meses	H	Casa	
14	7 meses	M	Casa/Jardín Convive con más gatos	Anorexia Negativo kit diagnóstico a SIDA y FeLV
15	6 meses	H	Casa	PIF, Parálisis posterior
16	10 años	H	ND	Anorexia
17	4 meses	M	Casa	
18	11 años	H	Casa	
19	10 meses	H	ND Convive con una hembra	
20	8 meses	H	ND Convive con una hembra	
21	12 meses	M	ND Convive con una hembra	
22	10 años	H	ND Convive con un macho	
23	1 año	M	ND	Vacunado con Leucogen
24	10 meses	H	ND	
25	13 años	H	Casa	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
26	3 años	M	Casa	
27	6 meses	M	ND Convive con una hembra	
28	1.5 años	H	ND	

Convive con un macho				
30	2.8 años	M	Casa/Calle	
31	1.5 años	H	Casa	
32	4 años	H	ND	
33	ND	M	ND Convive con 2 hembras	Positivo a leucemia por un laboratorio
34	6 meses	H	Casa	
37	13 años	H	Casa/Sale Convive con 5 gatos	Anorexia
38	6 meses	M	Casa Convive con 2gatos	
39	5 meses	H	ND	
42	5 meses	H	ND	
43	1 año	H	Casa Convive con 5gatos	
45	1.5 años	H	Casa Convive con otra hembra	Lesiones cutáneas
46	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
47	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
49	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
50	ND	M	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
52	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
54	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
55	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
56	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
57	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
58	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal

59	ND	M	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
60	ND	M	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
61	ND	M	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
62	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
63	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
64	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
65	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
66	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
67	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
68	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
69	ND	H	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
70	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
71	ND	ND	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
72	ND	M	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
73	3 años	M	Casa Alta densidad de gatos	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
74	5 meses	M	Casa	Lesiones cutáneas
75	5 meses	M	Casa	Lesiones cutáneas
76	3 años	M	Casa	Palidez de mucosas
77	4 meses	M	ND	Vacunado contra leucemia
78	2 meses	H	ND	
79	3 años	H	Casa	
80	4 años	H	Casa	PIF
81	3 meses	M	Casa	Parálisis del tren posterior

82	7 años	H	Casa/Calle Convive con 5 gatos	Palidez de mucosas
83	5 meses	M	Casa	
84	2 años	M	Casa	
85	9 meses	H	Casa Convive con 2 gatos	
86	2 años	M	Casa	
87	1.3 años	M	Casa	
88	5 meses	H	Casa/Calle Convive con 2 gatos	
89	7 años	H	Casa Convive con otro gato	
90	8 meses	M	Casa Convive con otro gato	Problemas oculares, cavidad bucal y cavidad nasal
91	8 meses	M	Casa	
92	12 años	M	Casa	Problemas urinarios
93	5 meses	M	Casa	