

# Virus de la inmunodeficiencia felina (VIF): evaluación de las globulinas en pacientes infectados espontáneamente

GÓMEZ, N<sup>1</sup>; GISBERT, M. A.<sup>1</sup>; RAMAYO, L<sup>2</sup>; BRATANICH, A<sup>3</sup>,  
CASTILLO, V<sup>1</sup>; SURANITI, A<sup>1</sup>

## RESUMEN

Fueron estudiadas las posibles correlaciones de parámetros tales como la Alfa glicoproteína ácida (AGP, proteína de fase aguda), fracciones electroforéticas de las proteínas séricas y títulos de *Toxoplasma gondii* en gatos infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Felina (VIF). Los títulos de *Toxoplasma gondii* obtenidos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) no correlacionaron con los valores de Proteínas Totales ni con los de las globulinas. Sí se halló múltiple correlación entre todas las proteínas estudiadas ( $r: 0,98, p < 0,04$ ). Al evaluar la correlación entre proteínas totales versus globulinas, sus fracciones y la AGP, sólo hubo correlación positiva con las globulinas ( $r: 0,93, p < 0,0001$ ) y negativa con las Alfa Globulinas ( $r: -0,75; p < 0,01$ ). La AGP no correlacionó con las alfa globulinas, y sí lo hizo, en forma negativa con las Gamma Globulinas ( $r: -0,94; p < 0,0001$ ) y las globulinas totales ( $r: -0,67; p < 0,03$ ). En los casos estudiados se apreció un aumento importante de las proteínas totales y de las globulinas. Si bien las Gama-Globulinas están aumentadas no se pudo demostrar correlación estadística con el incremento de los títulos de *Toxoplasma gondii*. Contrariamente a lo esperado no se comprobó correlación entre los niveles de AGP y las Alfa-globulinas.

*Palabras clave:* (VIF), (hiperglobulinemia), (AGP).

<sup>1</sup> Area Clínica Médica de Pequeños Animales.

<sup>2</sup> Area Inmunología

<sup>3</sup> Area Virología

Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA.

Recibido: marzo 2005 - Aceptado: marzo 2006 - Versión on line: marzo 2006

## Feline immunodeficiency virus (FIV): study of globulins in patients with natural infections

### SUMMARY

Statistical correlation between parameters such as globulins, Alpha- Glycoprotein AGP, serum proteins fractions by electrophoresis and *Toxoplasma gondii* titles in cats infected with Feline Immunodeficiency Virus (FIV) were studied. Indirect Immunofluorescence titles to *Toxoplasma gondii* did not showed correlation with Total proteins and globulins. It was observed correlation between all types of proteins studied ( $r: 0,98, p<0,04$ ). Total proteins versus globulins showed positive correlation ( $r: 0,93, p <0,0001$ ). Total protein versus alpha-globulin evidenced negative correlation ( $r:-0,75, p<0,01$ ). AGP and alpha-globulins did not showed correlation and it was detected negative correlation with gamma-globulins ( $r:-0,94, p<0,0001$ ) and with globulins ( $r:-0,67, p<0,03$ ). The patients evaluated showed a high level of Total proteins because of the increase of globulins. Gamma-Globulins were detected increased but there was not correlation with *Toxoplasma gondii* titles. It was not observed correlation between AGP and Alfa-globulins.

**Key words:** (FIV), (Alpha glycoprotein acid) (AGP), (hyperglobulinemia).

### INTRODUCCIÓN

Los mamíferos, en general, responden a la injuria o la infección tisular con una compleja serie de mecanismos que tienen como objeto evitar que se perpetúe una lesión, la destrucción por parte de los Microorganismos y la activación del proceso de reparación. Estos mecanismos integran lo que se conoce como inflamación. Las reacciones más tempranas se conocen como respuesta de fase aguda. Es una secuencia en cascada, iniciada en el sitio de trauma o infección, que conduce a la liberación de mediadores que movilizan la respuesta metabólica de todo el organismo<sup>2, 6, 12</sup>.

En el humano y en las distintas especies animales se han identificado las siguientes proteínas de fase aguda: Proteína reactiva C (PRC), haptoglobina, fibrinógeno, amiloide sérico (SAA), ceruloplasmina, alfa-glicoproteína ácida (AGP), alfa macroglobulina,

alfa antripsina, complemento y proteínas de la coagulación. Las más importantes en el hombre son la proteína reactiva C y el amiloide sérico. Se las emplea para distinguir y controlar la evolución de diversos procesos inflamatorios e infecciosos<sup>4, 1,9,11,12</sup>.

En cambio en los animales, si bien se conocen algunas de ellas, han sido menos estudiadas. La haptoglobina parece tener más importancia en los rumiantes en procesos tales como mastitis, abscesos, infecciones agudas del aparato reproductor, etc<sup>11</sup>. Por su parte en el perro, la de mayor importancia parece ser la PRC y en el equino la SAA<sup>11</sup>.

En el gato se han investigado la haptoglobina y la AGP, resultando esta última la más eficiente para el diagnóstico<sup>2,5</sup>. Se trata de una proteína de fase aguda, que está dentro del grupo de las alfa globulinas, cuyo valor en el gato sano ronda los 500 mg/ml. Resulta muy útil para «confirmar» el diagnóstico de

Peritonitis Infecciosa Felina (PIF) en el animal vivo, sobre todo cuando se detectan valores superiores a 1500 mg/ml, pues esto permite tomar una decisión acerca de la instauración de un tratamiento más específico.

La AGP no se altera en las cardiomiopatías ni en las neoplasias, pero sí lo hace en peritonitis o pleuritis bacterianas, de ahí la importancia de la citología para diferenciar estas patologías de una PIF efusiva. La AGP también puede estar aumentada en otras enfermedades virales, bacterianas<sup>3,10</sup> (como colangiohepatitis ascendente o pielonefritis) y trauma reciente, diferenciales importantes en la PIF no efusiva.

En un trabajo reciente<sup>8</sup>, se estudió la variable AGP en 20 gatos infectados por VIF (+). El 80% de los animales presentaron valores de AGP superiores a 1500 µg/ml y el 90% evidenciaron disminución marcada de relación CD4/CD8. En este grupo, 7 gatos fueron tratados con Zidobudina y el seguimiento de los valores de la relación CD4/CD8 y de AGP a lo largo del tratamiento mostró correlación con la mejoría de los pacientes. Esto condujo a la comprobación de que la AGP es un buen indicador de la evolución del tratamiento.

El propósito fundamental del presente trabajo consistió en el estudio de las posibles correlaciones de parámetros tales como AGP, fracciones electroforéticas de las proteínas séricas y títulos de *Toxoplasma gondii* en gatos infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Felina (VIF). En el caso que se detecten las correlaciones mencionadas, quizás podrían encontrarse estimadores fidedignos de aquellos de más difícil ejecución o más costosos. Tal es el caso de la determinación específica de AGP, el cual podría ser estimado por medio del valor de la Alfa-Globulinas determinadas por medio de electroforesis. Además se podría efectuar el seguimiento de la enfermedad o del tratamiento,

de manera más sencilla y al alcance de cualquier clínico.

En síntesis los objetivos del trabajo fueron los siguientes:

- Establecer si hay correlación entre los valores séricos de AGP y el aumento de la fracción alfa de las globulinas, medidas por electroforesis.

- Evaluar si existe correlación entre los niveles de las Gammaglobulinas y el grado de incremento de los títulos de *Toxoplasma gondii* (IFI > 1/256).

## MATERIALES Y MÉTODO

Se seleccionaron para este estudio 10 gatos con diagnóstico presuntivo de Inmunodeficiencia Felina, atendidos en el Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA. Fueron elegidos al azar. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular y fueron utilizadas para realizar tanto las pruebas confirmatorias de la enfermedad, como para la determinación de los parámetros de laboratorio de rutina. Las mismas consistieron en sangre entera con EDTA (W) y suero. Cabe aclarar, que en primer término se confirmó la enfermedad por medio de la técnica de PCR e inmediatamente de confirmada la misma, se inició el tratamiento de los pacientes con Zidobudina 10mg/ml (suspensión), con una dosis de 5 mg/kg cada 12 horas, en ciclos de un mes de tratamiento y un mes de descanso.

La totalidad de pruebas realizadas fue la siguiente:

### 1-Prueba inmunocromatográfica para VIF Y VILEF

Se empleó Speed DUO FeLV-FIV (Mediatec). Esta es una prueba rápida de un solo paso, basada en la técnica de Inmunocromatografía en sandwich. Emplea

anticuerpos monoclonales y policlonales contra el antígeno capsular p27 de ViLeF y un péptido sintético, que reproduce el receptor gp40 de VIF. El anticuerpo anti-gp40 es más precoz, muy específico y está presente todo el tiempo de la infección.

## **2-Reacción de Polimerasa en Cadena para el Virus de Inmunodeficiencia Felina (nested PCR)**

Se amplificó por PCR una secuencia de 2 o 3 pares de bases (pb) pertenecientes al gen gag de VIF, debido a que éste es el más conservado de la población.

Se empleó esta técnica con el fin de confirmar la enfermedad en los felinos en estudio. Para realizarla se emplearon las muestras con anticoagulante, las cuales fueron centrifugadas con gradiente de concentración con Ficoll-Hypaque y así se obtuvo una capa de células mononucleares. Se extrajo luego el ADN de las mismas con protocolos basados en Proteinasa K. El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro y se utilizaron 400 nanogramos (ng) como muestra o templado junto con 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de buffer PCR, 0,4 mM de dnTP1, 2 U de Taq Polimerasa y 40 pmoles de cada cebador (VIF1 y VIF2) en un volumen final de 50 µl.

La mezcla se colocó en el termociclador con el siguiente ciclo térmico

94°C durante 55 segundos

55°C durante 1 minuto

72 °C durante 1 minuto

Se llevaron a cabo 25 ciclos térmicos. Del producto obtenido se tomaron 5 µl como templado de la segunda PCR (nested) junto con 1,5 mM de Mg Cl 2, 1X de buffer PCR, 0,4 mM de dnTP1, 2 v de Taq Polimerasa y 40 picomoles de cada cebador. Se repitió el mismo ciclo térmico. Se sembraron las muestras en un gel de agarosa al 1,5% teñido con Bromuro de

Etidio y se revelaron los geles en el transiluminador.

Se utilizaron los siguientes cebadores:

5´ATATGACGGTGTCTACTGCTGCTGCTG 3´ (sentido) y 5´CTCTACTGCATCCTAGCTGCTG 3´ (antisentido) en el primer ciclo, y 5´AAGGCAAGAAAGGACTAGGAGG 3´ (sentido) y 5´TAGGGTAATGGTCTGGAGCA 3´(antisentido) en el segundo.

## **3-Determinación de AGP (figura 6)**

Es una prueba de Inmudifusión radial. Como tal, es cuantitativa, y toma como referencia dos valores conocidos de AGP y se mide el halo de precipitación luego de contactar con la muestra (Ecos Institute, Japan). Los resultados se expresan en microgramos por mililitros (µg/ml)<sup>3</sup>.

## **4-Electroforesis de las proteínas séricas (figura 5)**

El fundamento de esta técnica consiste en la separación de las proteínas séricas en diferentes fracciones, en función de su punto isoeléctrico. La proporción (expresada en porcentaje) entre las diferentes fracciones resultantes; albúmina, alfa, beta y gama globulinas, se determina por medición densitométrica luego de su tinción con colorante para proteínas. Relacionando esta proporción con el valor de proteínas totales se obtiene el valor absoluto de cada fracción expresado en g/dl.

## **5-Determinación de Proteínas Totales y Albúmina**

Las proteínas séricas totales séricas fueron determinadas por medio de refractometría, y se expresan en gramos por decilitros (g/dl).

La Albúmina fue evaluada por espectrofotometría, expresándose en g/dl.

## 6- Inmunofluorescencia Indirecta para la evaluación del título de Anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*

Técnica llevada a cabo por el Instituto Pasteur de Buenos Aires. Se consideró reactivo el título mayor a 1/256.

## 7-Estudio estadístico

Los resultados se expresan en mediana y rango. Las variables se evaluaron por medio del test de Spearman y de regresión múltiple, considerándose que hay correlación entre dos o más variables cuando  $r \geq 0,65$  y  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En la tabla 1, se muestran los valores evaluados en los pacientes del grupo en estudio y en la tabla 2, las correspondientes medianas y rangos obtenidos.

Los títulos de *Toxoplasma gondii* obtenidos por IFI, no correlacionaron con los valores de Proteínas Totales, globulinas y las fracciones de globulinas, ni con los de la AGP. Entre todas las proteínas estudiadas sí se halló múltiple correlación ( $r: 0,98$ ,  $p < 0,04$ ). Al evaluar la correlación entre proteínas totales versus globulinas, sus fracciones y la AGP, sólo hubo correlación positiva (figura 1) con las globulinas ( $r: 0,93$ ,  $p < 0,0001$ ) y negativa con las Alfa Globulinas ( $r: -0,75$ ;  $p < 0,01$ ) (figura 2). La AGP no correlacionó con las alfa globulinas, pero si lo hizo, en forma negativa con las gamma Globulinas ( $r: -0,84$ ;  $p < 0,002$ ) (figura 4) y las globulinas totales ( $r: -0,67$ ;  $p < 0,03$ ) (Figura 3).

Tabla 1. Valores de Proteínas Totales, globulinas y fracciones, AGP y Título de Toxoplasmosis por IFI obtenidos de gatos con VIF

1-Prot. Tot. g/dl	2-Rel. A/G	3-Glob. g/dl	4-Alfa-glob. g/dl	5-Gamma-glob. g/dl	6-AGP ug/ml	7-Títulos Toxop.
8,2	0.46	5.6	1,55	3,025	1500	256
7	0.32	5.3	1,14	2,65	700	128
9,1	0.19	7.6	1,26	4,39	400	64
8,2	0.22	6,7	1,23	3,39	400	4096
7	0.42	4.9	1,4	1,77	4500	1024
9,8	0.30	7.5	1,71	4,02	600	2048
7,5	0.34	5.6	1,14	2,54	2000	512
7,9	0.29	6.1	1,29	3,06	2500	4096
6,8	0.36	5.0	1,26	1,42	4900	1024
7,8	0.37	5.7	1,58	1,8	4200	2048

Referencias: 1:Proteínas totales 2-Relación Albúmina/globulinas 3-Alfaglobulinas 4-Gammaglobulinas, 6-Alfaglicoproteína ácida AGP. 7-Títulos de *Toxoplasma gondii*

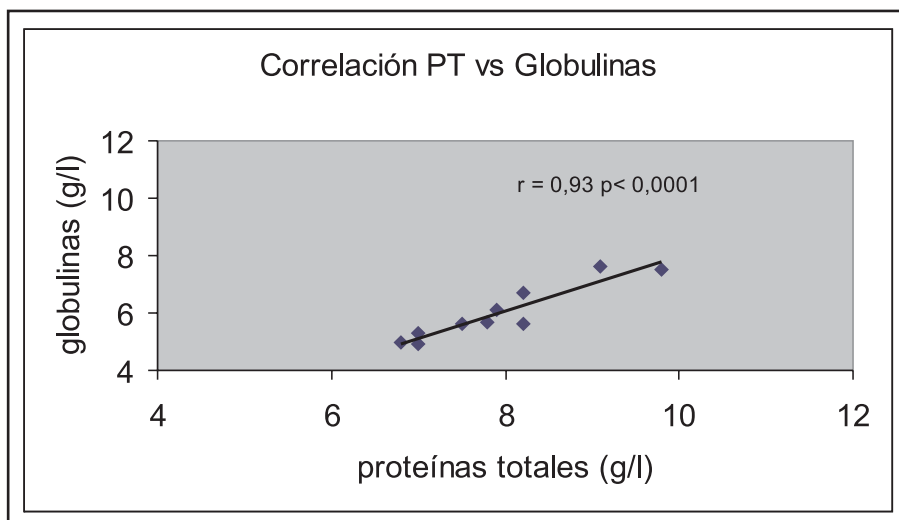


Figura 1

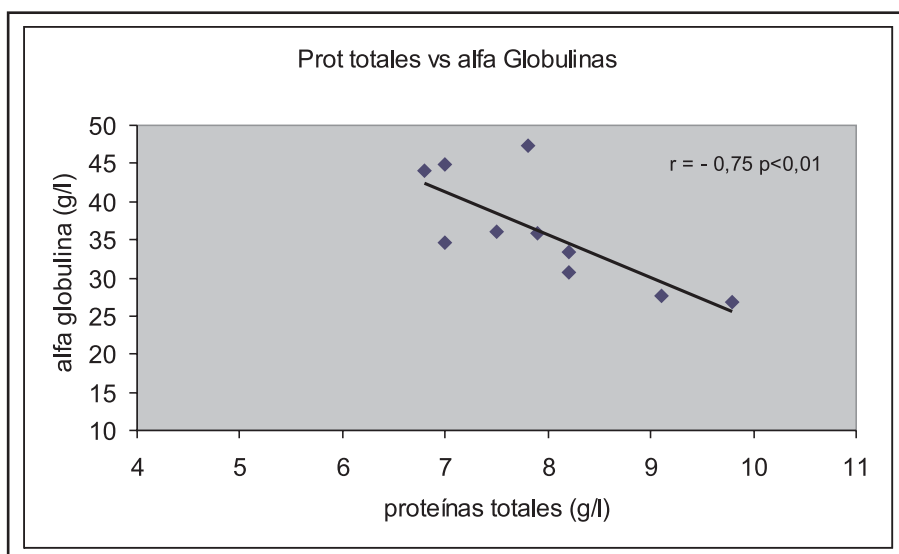


Figura 2

Tabla 2. Medianas y rangos

	Prot.Totales g/dl	Globulinas g/dl	Relación A/G	Alfa-glob g/dl	Gamma- glob. g/dl	AGP ug/ml	IFI T.gondii
MEDIANAS	7.85	5,6	0,33	1	2,73	1570	1/1024
RANGOS	6,8-9.8	4,9-7,6	0,19-0,46	0,85-1,31	1,72-4,43	400-5200	1/64- 1/4096

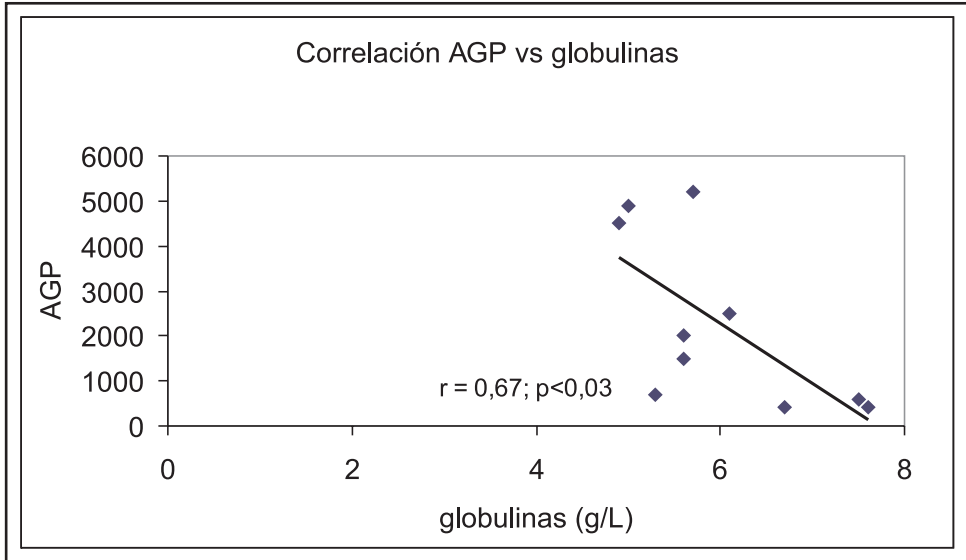


Figura 3

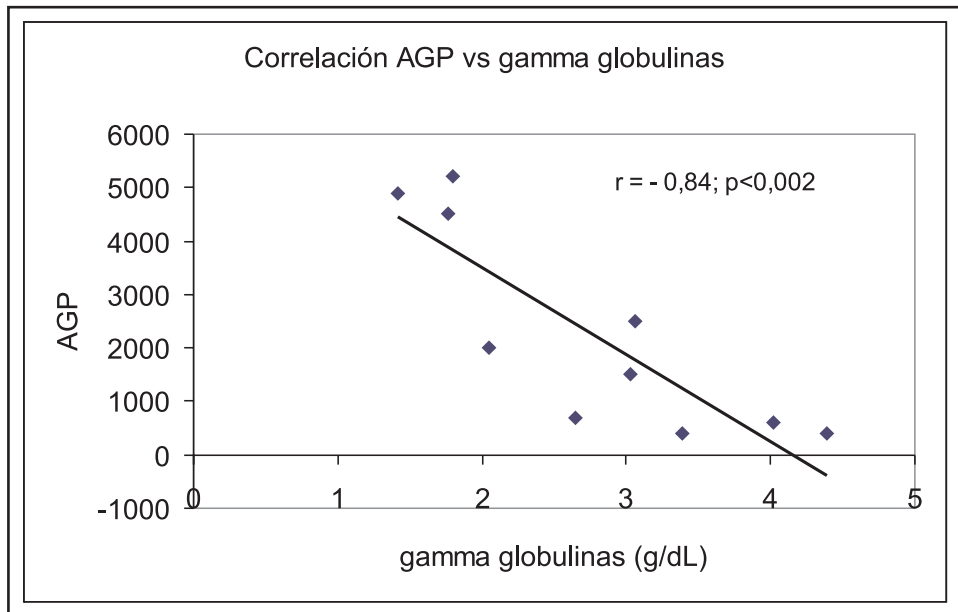


Figura 4

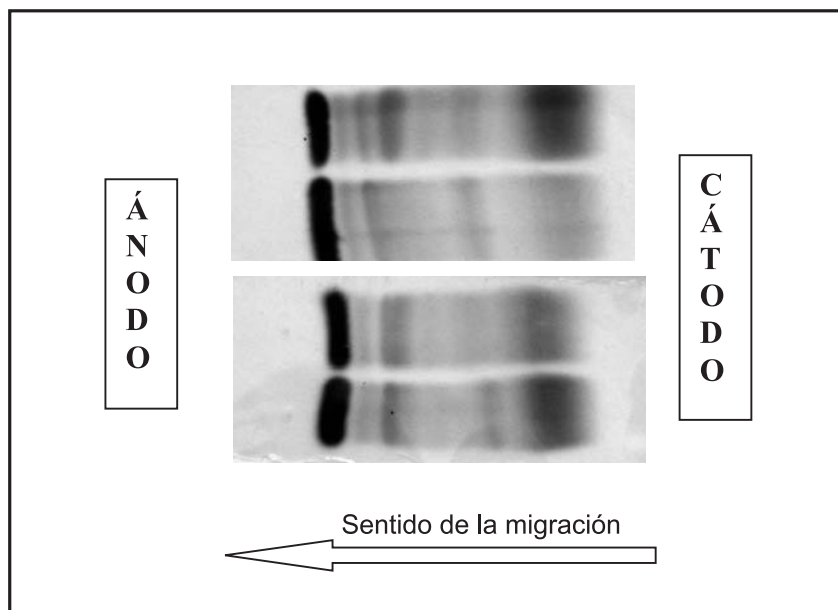


Figura 5. Proteinogramas de pacientes con VIF. Se observan las diferentes fracciones Proteicas séricas, de ánodo a cátodo: albúminas, Alfa, Beta y Gammaglobulinas

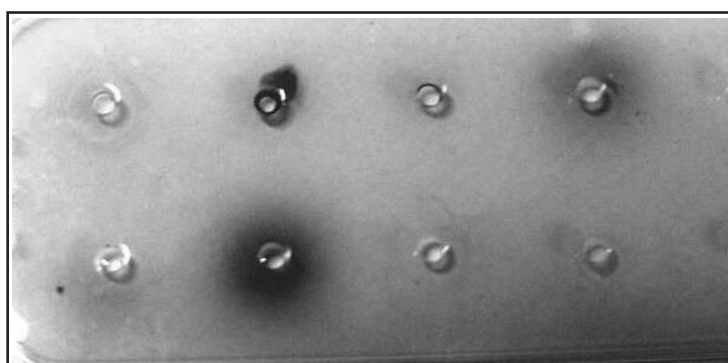


Figura 6. Inmunodifusión radial para AGP. se aprecian los halos de precipitación que corresponden a diversos grados de concentración de AGP, en las muestras de sangre de los enfermos con FIV.

### DISCUSIÓN

El primer resultado que llama la atención en la tabla 1 es la relación Albúmina/Globulina (A/G) de estos pacientes. Dicha relación, es prácticamente en todos los casos, menor a 0,4. Esto es algo que se detecta con suma

frecuencia en los gatos infectados por VIF y que debe tenerse en cuenta, ya que en las referencias bibliográficas, se considera a este como un dato clínico concluyente de Peritonitis Infecciosa Felina (PIF)<sup>3</sup>. Hay cuadros de PIF no-efusiva, que pueden resultar indistinguibles clínicamente de VIF y es



precisamente en esos casos, en los que no hay que confiar en la relación A/G para aproximarse al diagnóstico. Resulta entonces imprescindible efectuar el diagnóstico VIF y ViLeF, para descartar estas enfermedades y recién orientarse hacia el de PIF.

El incremento de Alfa-Globulinas, que se observa en estos pacientes, no muestra correlación con la AGP, lo que pone de manifiesto que no es buen estimador de este parámetro. Es decir, que la proteína de fase aguda AGP no puede ser estimada por este medio y debe ser determinada específicamente.

La correlación inversa que muestran las Alfa y las Gamma globulinas podría indicar un proceso agudo o una reagudización, aun cuando las Gama- globulinas están elevadas.

No se encontró correlación entre las Gama globulinas y los niveles de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*. El aumento de las Gama globulinas podría deberse a una activación policlonal del sistema inmune. Debe recordarse que los animales infectados con VIF pueden, en determinada etapa de la enfermedad incrementar la producción de anticuerpos contra antígenos con los que el individuo ha contactado previamente y es incapaz de producirlos en respuesta a la entrada de antígenos nuevos<sup>7</sup>. De modo que es característico de estos pacientes el hallazgo de una marcada y sostenida hiperglobulinemia. Esta observación es quizás más evidente en los animales en la última etapa de la enfermedad. En nuestros pacientes del grupo en estudio la hiperglobulinemia no es tan acentuada debido a que están en tratamiento con antiretrovirales (Zidobudina). Del mismo modo y comparado con grupos de gatos infectados no tratados<sup>9</sup> los títulos de *Toxoplasma gondii* no son tan elevados.

## CONCLUSIONES

En los casos estudiados se aprecia un aumento importante de las proteínas totales y de las globulinas como es característico en esta enfermedad infecciosa. Si bien las Gama-Globulinas están aumentadas no se pudo demostrar correlación estadística con el incremento de los títulos de *Toxoplasma gondii*.

No se halló correlación entre los niveles de AGP y las Alfa-globulinas, a pesar de que AGP es una alfa globulina, lo cual impide tomar a las alfa-globulinas como un estimador fiel del incremento de las Proteínas de fase aguda.

Sería interesante seguir investigando en que fracción de las Alfa-Globulinas se ve reflejada esta Proteína de Fase Aguda (AGP) con el objeto de simplificar su estimación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ANDERSON, N.; POLLACCHI, A.; HAYES, P.; THERAPONDOS, G.; NEWSOME, P.; BOYTER, A.; SMITH, K. (2000). A preliminary evaluation of the differences in the glycosylation of alpha -1 - acid glycoprotein between individual liver diseases. *Biomed. Chromatogr.* 16, (6) 365-372.
2. BAUMANN H.; GAULDIE, J.(1994) The acute phase response. *Immunology Today.* 15, (2) 74-80.
3. DUTHIE, S.; ECKERSALL, P. D.; ADDIE, D. D.; LAWRENCE, C. E.; JARRET, O.(1997) Value of a1 -acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Veterinary Record.* 141, 299-303.
4. ECKERSALL, P. D.; SAINI, P. K.; MCCOMB, C. (1996) The acute phase response of acid soluble glycoprotein, a1- acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C -reactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 51, 377-385.

5. ENGLISH, R. Feline Immunodeficiency Virus.(1993) VETERINARY TECHNICIAN 14(4):213-221.
6. FOURNIER, T.; MEDJOUBI, N. N.; PORQUET, D. (2000). Alpha –1 –acid glycoprotein. *Circulation*. 102, 1420.
7. GÓMEZ, N. Avances en el diagnostico y tratamiento de las retrovirosis felinas. (2000). Revista Veterinaria Argentina. Vol..XVII, No 166.
8. GÓMEZ, NÉLIDA VIRGINIA; DI TOLLO, BEATRIZ; FEIJOO, SILVIA; DUCHENE, ADRIANA; MIRA, GRACIELA, WOLBERG, ANDREA; CASTILLO, VÍCTOR: Evaluación de la alfa glicoproteína ácida (agp) y de la relación CD4/CD8 en pacientes felinos infectados por el virus de la inmunodeficiencia felina (vif) y por el virus de la peritonitis infecciosa felina (pif).Revista Rassegna di Medicina Felina. Anno 9, nro 2 2005:7-12.
9. GÒMEZ,N: Toxoplasmosis felina: aspectos clínicos y serológicos. Abstract Congreso Latinoamericano de Zoonosis. Organizado por la Sociedad Argentina de Zoonosis. 14 al 17 de agosto de 1995.
10. KENT, J. (1992) Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. *Br. Vet. J.* 148, 279-282.
11. MOORE, D. F.; ROSENFELD, M. R., GRIBBON, P. M.; WINLOVE, C. P.; TSAI, C. M. (1997) Alpha –1 –acid (AGP, orosomuroid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolisaccharide and protection from sepsis. *Inflammation*. 21, (1) 69-82.
12. PALTRINIERI, S.; PARODI, M. C.; CAMMARATA, G: (1999) In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology, and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 358-361.