



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**

**DETECCIÓN DEL ADN PROVIRAL DEL VIRUS DE LEUCEMIA VIRAL  
FELINA POR MEDIO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA A PARTIR DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE GATOS  
CON VIREMIA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**FRANCISCO GERARDO LÓPEZ DEL PRADO**

**Asesores:**

**Dra. Laura Cobos Marín**

**MVZ Liliana M. Valdés Vázquez**



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.

## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar este trabajo a Marta Del Prado Sánchez, quien a pesar de todo, siempre se preocupó por brindarme lo necesario para mi desarrollo, por hacer siempre lo imposible para que yo pudiera contar con la educación necesaria, por enseñarme a trabajar a pesar del cansancio y los malos momentos, por todo su cariño, gracias por todo MAMÁ.

A MI HIJA Bianca Fernanda López Navarrete, esa pequeñita que llegó a mi vida a dar luz, sentido y fuerza, lo más valioso, lo más hermoso que tengo TE AMO.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, mi preciosa escuela.

## AGRADECIMIENTOS

A la doctora Laura Cobos Marín por permitirme realizar el trabajo en el laboratorio, por su apoyo y atención, por su valioso tiempo, muchas gracias.

A la doctora Liliana Valdés, por toda su atención y apoyo, por ser siempre muy atenta y amable, gracias.

A la maestra Teresa, por toda la ayuda, por los consejos, por la paciencia y el apoyo, por darme ánimos, infinitamente agradecido contigo amiga, muchas gracias.

A Karina Villa, muchas gracias por todo tu apoyo, por confiar en mí en todo momento, gracias amiga, te quiero mucho.

A Mireya Álvarez, muchas gracias por tu apoyo, gracias por confiar en mí.

Al señor Mario por ser tan atento y amable, por hacer mucho más amena la estancia en el laboratorio.

A Armando y el equipo de laboratoristas por su atención, por hacer que las cosas funcionen bien en el laboratorio.

A mis amig@s por echarme porras, y mostrarme su cariño.

Al Centro de Diagnóstico Veterinario Especializado (CEDIVETE) por la donación de las muestras, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por todo su apoyo.

A Maura Dafne muchas gracias por acompañarme en este proceso, por brindarme tu apoyo incondicional y cariño, gracias.

A los miembros de mi jurado, por tomarse el tiempo para revisar mi trabajo, muchas gracias.

## CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN .....	2
3.	REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	4
3.1	Epizootiología.....	4
3.2	Características del virus.....	4
3.3	Transmisión .....	7
3.4	Patogénesis .....	8
3.5	Etapas de la infección de leucemia viral felina .....	9
3.6	Hallazgos clínicos.....	11
3.7	Prevención.....	12
3.8	Diagnóstico.....	12
4.	HIPÓTESIS.....	14
5.	OBJETIVO GENERAL .....	15
5.1	Objetivos específicos.....	15
6.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
6.1	Extracción de ADN a partir de tejidos .....	15
6.2	Detección de LeVF en tejidos por PCR .....	16
6.3	Extracción de ADN a partir de sangre con EDTA de gatos .....	17
6.4	Detección por PCR del provirus de LeVF en sangre periférica con EDTA de gatos positivos al antígeno p27 en pruebas inmunocromatográficas.....	18
7.	RESULTADOS.....	20
8.	DISCUSIÓN .....	28
9.	CONCLUSIONES .....	30
10.	PERSPECTIVAS .....	30
11.	REFERENCIAS .....	32

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxidoribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
env	Gen codificante para componentes de la envoltura viral
FOCMA	Antígeno de membrana asociado con el oncornavirus felino
gag	Gen viral del antígeno asociado a virus
gp70	Proteína de envoltura viral que define al subgrupo
LeVF	Leucemia viral felina
LTR's	Long terminal repeats
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
p10	Proteína estructural interna de virus
p12	Proteína estructural interna de virus
p15c	Proteína estructural interna de virus
p15e	Proteína transmembrana viral
p27	Proteína estructural interna de virus
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pol	Gen viral específico de la RT
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Enzima transcriptasa reversa
RT-PCR	PCR transcriptasa reversa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

## 1. RESUMEN

**LÓPEZ DEL PRADO FRANCISCO GERARDO. Detección del ADN proviral del virus de leucemia viral felina por medio de reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras sanguíneas de gatos con viremia (bajo la dirección de: Dra. Laura Cobos Marín y MVZ Liliana M. Valdés Vázquez).**

A la infección por el virus de leucemia viral felina, un retrovirus de distribución mundial, se asocian diferentes patologías que van desde tumores (linfoma y leucemia), anormalidades hematológicas (anemia, anormalidades leucocitarias y plaquetarias) e inmunosupresión. Esta última deriva en infecciones secundarias.

El diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo principalmente por ensayos inmunocromatográficos debido a su practicidad y disponibilidad. Estos son eficientes sólo en el estado de viremia activa, debido a que se detecta la proteína p27 del virus, la cual es producida en grandes cantidades en células infectadas durante la replicación viral. Estas pruebas se realizan a partir de muestras de suero o plasma. Otras metodologías para el diagnóstico son la inmunofluorescencia directa en frotis sanguíneos, aislamiento viral, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detecta el ARN en una RT-PCR o el ADN viral (provirus) en la célula infectada.

En el presente estudio se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para detectar el provirus integrado al material genético de las células sanguíneas infectadas en 59 especímenes de sangre con EDTA. Estos fueron obtenidos de animales positivos al ensayo inmunocromatográfico que detecta la proteína p27. Del total de muestras analizadas el 71 % (42 muestras) presentaron un amplificado en la PCR correspondiente a un segmento de U3 LTR del provirus de LeVF, mientras que 29 % (17 muestras) no presentan amplificación alguna. A su vez, de las muestras con amplificación 28 (67%) presentan un tamaño de amplicón de 235 pares de bases mientras que, 14 de ellas (33%) amplificaron un producto mayor a 235 pb (aproximadamente 246 pares de bases) utilizando las mismas condiciones en la programación en el termociclador y los componentes para la reacción así como los primers.

## 2. INTRODUCCIÓN

El virus de la leucemia viral felina (LeVF) pertenece al género gammaretrovirus, el cual presenta su material genético conformado por ARN de cadena simple. Es un virus envuelto causante de una gran variedad de signos clínicos tales como; tumores (como linfoma, leucemia), desórdenes hematológicos (anemia, anormalidades leucocitarias –leucopenia- y plaquetarias –neutropenia-) e inmunosupresión esta última deriva en infecciones secundarias<sup>1, 2</sup>.

El virus tiene una distribución mundial, en México se reporta una prevalencia del 7.5 %<sup>3</sup>, en Norteamérica (lugar de donde se obtiene la mayor información) de 2.3%<sup>4</sup>, en Canadá 3.44%<sup>5</sup>, mientras que en Australia se reporta hasta del 7% de seroprevalencia<sup>6</sup>. Todos estos resultados en pruebas que detectan el antígeno p27 en suero.

El diagnóstico de este agente se realiza principalmente por medio de ensayos inmunocromatográficos los cuales son eficientes sólo en el estado de viremia activa, debido a que se detecta la proteína p27, la cual es producida en grandes cantidades durante el proceso de replicación viral en células infectadas. En estas técnicas resultan útiles muestras biológicas como suero y plasma para realizar la prueba<sup>7, 8</sup>. Otros métodos para el diagnóstico son: ELISA<sup>9</sup>, aislamiento viral e inmunofluorescencia en frotis sanguíneo<sup>10</sup>.

Por otra parte, diversos autores han utilizado técnicas moleculares como la RT-PCR, RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN viral tanto en sangre como en muestras de saliva, además de PCR en tiempo real, PCR y PCR anidada para la detección del ADN proviral. Estas técnicas han sido comparadas con los procedimientos de rutina que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad (ELISA, ensayos inmunocromatográficos e inmunofluorescencia) y han demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad además de tener la capacidad de detectar infecciones latentes. Para ellas se pueden utilizar diferentes especímenes como tejidos (bazo, hígado, glándula salival, linfonodos) así como orina y heces además de poder realizarse en felinos salvajes<sup>11, 12, 13, 14</sup>. Estas técnicas dirigidas al provirus tienen la capacidad de amplificar regiones de algún gen, por ejemplo el gen *pol*, región altamente conservada<sup>13</sup> o pueden estar dirigidas hacia algún fragmento de potenciadores (enhancer) que se encuentran dentro de las LTR's (Long terminal repeats)<sup>15</sup>. Éstas tienen la

capacidad de detectar infecciones en estado de latencia y de no tener reacción ante oncogenes endógenos<sup>10</sup>.

Debido a que los retrovirus se encuentran dentro de los genomas de las células infectadas, además de tener mecanismos de escape a los efectos de fármacos antivirales y a la respuesta inmune del hospedero, es necesario considerar las alteraciones provocadas por la infección de estos agentes y que son necesarias tratar. Dependiendo de esto la terapia puede diversificarse y debe ser enfocada a la presentación de los signos clínicos, es por ello que los costos por el tratamiento de los animales enfermos pueden variar. Además de la terapia antimicrobiana podemos encontrar el uso de los siguientes fármacos: inmunomoduladores como el interferón alfa el cual es de origen humano pero que también es usado en gatos, el interferón omega de origen felino, así como el levamisol (antihelmíntico) el cuál se considera por tener actividad inmunomoduladora<sup>14, 16</sup>.

La finalidad del presente estudio fue evaluar mediante una prueba de PCR punto final los resultados positivos obtenidos en pruebas inmunocromatográficas en muestras sanguíneas, para establecer esta metodología como prueba diagnóstica. Lo anterior, debido a que ha demostrado tener mayor confiabilidad en los resultados y a que es capaz de detectar el material genético del agente causal de la leucemia viral felina en cualquier etapa de infección incluyendo los estados de latencia.

Dentro de este contexto el presente trabajo planteó como objetivo amplificar mediante PCR un segmento del ADN proviral del virus de leucemia viral felina contenido en las LTR's a partir de 59 muestras sanguíneas de gatos domésticos, las cuales previamente fueron probadas con un ensayo inmunocromatográfico de la marca Anigen® que detecta el antígeno p27.

### 3. REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### 3.1 Epizootiología

Dentro de los agentes infecciosos más comunes que afectan a los gatos domésticos se encuentran bacterias tales como *Chlamydomphila felis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis* tanto en su forma hemotrópica como la no hemotrópica), *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp* así como los virus causantes de la panleucopenia felina (parvovirus felino), el virus de la peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino), el herpesvirus felino, los retrovirus como el virus foamy felino (género spumavirus), el virus de la inmunodeficiencia felina (género lentivirus) y el virus de la leucemia viral felina (género gammaretrovirus). El virus de la leucemia viral felina tiene una distribución mundial, es causante de enfermedades neoplásicas (linfosarcomas) así como no neoplásicas (desórdenes hematológicos como anemia), e inmunosupresión<sup>10, 17</sup>. Afecta tanto a felinos domésticos como félidos salvajes<sup>10, 13</sup>.

El agente causal de la leucemia viral felina, fue descrito por William Jarrett y colaboradores en el año de 1964 cuando observaron las partículas virales unidas a la membrana de linfoblastos malignos en un gato con linfoma<sup>17</sup>.

Además de ello, este agente es un importante modelo en la investigación de tumores y el SIDA en humanos<sup>18, 19, 20</sup>.

#### 3.2 Características del virus

El virus es un agente exógeno y pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género gammaretrovirus, es un virus ARN de cadena simple, envuelto<sup>10</sup>. Está dividido en subgrupos: LeVF-A, LeVF-B, LeVF-C y LeVF-T, este último tiene gran capacidad citolítica para linfocitos T y causa una inmunosupresión severa<sup>10, 21, 22, 23</sup>, y

actualmente se ha reconocido un retrovirus recombinante denominado subgrupo D<sup>24</sup>. Están clasificados con base en su interferencia y habilidad de replicarse en tejidos no felinos<sup>25</sup> todos ellos relacionados inmunológicamente. Sólo el subgrupo A es infeccioso y transmitido horizontalmente de forma natural, mientras que los demás son desarrollados *in novo* en gatos infectados con el subgrupo A, por mutación o recombinación del mismo con secuencias retrovirales endógenas contenidas normalmente en el ADN felino<sup>10</sup>. Este es el caso del virus del sarcoma felino, el cual también es una recombinación de LeVF-A con proto-oncogenes (genes celulares asociados a tumores) e igualmente es generado *in novo* en gatos infectados con el subgrupo A<sup>25</sup>.

Cuadro 1. Subgrupos de leucemia viral felina.

Subgrupos del virus de leucemia viral felina			
Subgrupo	Frecuencia de aislamientos en gatos positivos a LeVF.	Enfermedades asociadas	Comparación por especies de la replicación <i>in vitro</i>
A	100 % en gatos infectados	Inmunosupresión, replicante y contagioso	Gato, conejo, cerdo, mink y humano
B	Ocorre con el subgrupo A en 50 % o más de los gatos con linfoma.	Neoplasia hematopoyética, no replicante y no contagioso, virulento en combinación con el subgrupo A.	Gato, perro, vaca, hámster, cerdo y humano
C	Raramente aislado, ligeramente en gatos con anemia no regenerativa.	Anemia no regenerativa y mielosis eritémica, no replicante, no contagioso, virulento en combinación con el subgrupo A.	Perro, gato, cuyo y humano.

Tomado de Green, C. *Enfermedades infecciosas del perro y del gato. Tercera edición, 2006*<sup>10</sup>.

Es un virus envuelto liposoluble, susceptible a desinfectantes, al jabón, al calentamiento y a la desecación, se inactiva rápidamente en el ambiente. Tiene un núcleo de ARN de cadena sencilla y utiliza la transcriptasa reversa para producir ADN (provirus) el cual es integrado al genoma de la célula hospedadora por una enzima denominada integrasa (codificada por el virus) (figura 1). Se replica en muchos tejidos incluyendo médula ósea, glándula salival y epitelio respiratorio<sup>10</sup>.

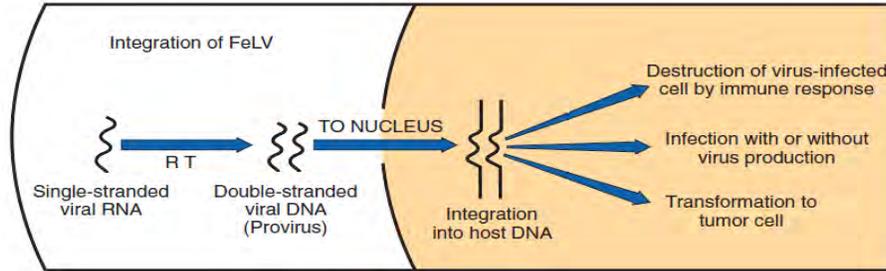


Figura 1. Integración del ARN viral y formación del ADN (provirus) dentro de la célula.

Tomado de Green, C. *Enfermedades infecciosas del perro y del gato. Tercera edición, 2006* <sup>10</sup>.

Es un virus no citopático liberado de las células infectadas por gemación tanto en células malignas (tumoraes) como no malignas (Figura 2). Durante este proceso de liberación, existe la formación de estructuras proteicas en la membrana de la célula infectada, una vez liberado el virus su envoltura acarrea antígenos de histocompatibilidad propios de la célula de origen. También se encuentra en células de tumores inducidos por el virus de leucemia viral felina y el virus del sarcoma felino, la expresión del antígeno de superficie denominado “FOCMA” (feline oncornavirus-associated cell membrane antigen) <sup>10, 26</sup>, morfológicamente es un virus tipo C<sup>25</sup>.

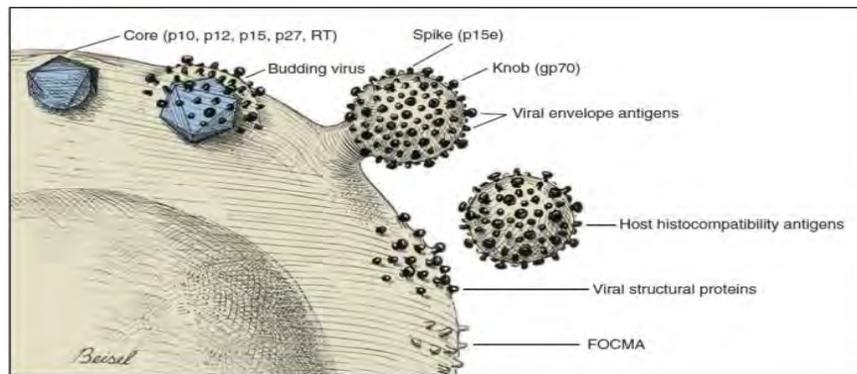


Figura 2. Producción y liberación del virus de LeVF de una célula maligna.

Tomado de Green, C. *Enfermedades infecciosas del perro y del gato. Tercera edición, 2006* <sup>10</sup>.

Los genes del provirus están flanqueados por las LTR (Long Terminal Repeats), las cuales son secuencias repetidas que tienen la función reguladora y de expresión de otros genes virales, no codifican para alguna proteína pero tienen un papel importante en el tropismo hacia los tejidos

y la patogenicidad del virus. Además, dentro de estas secuencias también se encuentran las secuencias intensificadoras, las cuales son frecuentemente encontradas en gatos con leucemias mieloides y son consideradas por jugar un papel importante en la oncogénesis. Una de estas regiones intensificadoras es la denominada U3-LTR, la cual no codifica para una proteína pero hace una transcripción específica de ARN<sup>27, 28</sup>.

Del extremo 5' al 3' el orden de los genes es LTR-gag-pol-env-LTR (Figura 3)<sup>28</sup>.

El gen *gag* (*group-associated antigen*) codifica las proteínas estructurales internas p15c, p12, p10 y p27. Esta última es utilizada rutinariamente para el diagnóstico de la infección por LeVF debido a que es producida en grandes cantidades en células infectadas, pues es necesaria para el ensamblaje de nuevas partículas virales<sup>10</sup>.

El gen *pol* (*polymerase*) específico de la enzima viral RT (transcriptasa reversa) que es la responsable de la síntesis de ADN a partir del template de ARN<sup>10</sup>.

El gen *env* (*envelope*) codifica para los componentes de la envoltura gp70 y p15e. La proteína gp70 define el subgrupo del virus (A, B o C) y juega un papel importante en la inducción de la inmunidad. La proteína transmembrana p15e interfiere en la respuesta inmune celular y por lo tanto facilita la persistencia viral<sup>10</sup>.

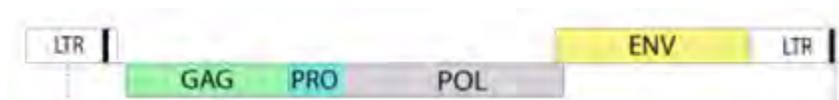


Figura 3. Representación del genoma del provirus de LeVF. Del extremo 5' al 3' se encuentran los genes *gag*, *pol* y *env* flanqueados por las LTR (long terminal repeat).

Tomado de *The viral zone* <https://viralzone.expasy.org/67>.

### 3.3 Transmisión

La transmisión puede ocurrir por dos rutas: a) vertical a través del útero o por la leche, ya que se ha podido aislar el virus en leche de gatas virémicas, o b) por contacto estrecho principalmente por saliva<sup>10, 17, 29</sup> ya que existe una mayor concentración viral que en plasma. Los gatos virémicos eliminan millones de partículas virales a través de la saliva y esta eliminación suele ser constante<sup>11, 30</sup>. En cuanto a la transmisión vertical de madre a cachorro

ocurre de manera común en gatas virémicas, los cachorros pueden ser infectados transplacentariamente o bien cuando la madre los lame para asearlos o mientras los cuida. Si la infección se da a través del útero se produce una falla reproductiva con reabsorción fetal, aborto o muerte neonatal aunque un porcentaje de estos gatos puede sobrevivir este periodo y convertirse en gatos adultos con infección persistente con producción activa de virus y excreción de partículas virales o presentar una infección latente<sup>31</sup>.

Existen factores de riesgo debido a comportamientos sociales como son: el compartir los platos de alimento o bebederos, el aseo mutuo entre individuos así como peleas y mordeduras por congéneres lo que permite la inoculación de partículas virales<sup>32</sup>, es menos probable la propagación por orina<sup>13, 17</sup>. Además, se ha demostrado la presencia del ARN viral, ADN proviral y el aislamiento del microorganismo en heces de gatos con viremia persistente. Estos hallazgos correlacionan con la presencia de AND proviral y la detección del antígeno p27 en sangre no así en gatos con infección latente. Lo anterior demuestra el papel de la carga viral eliminada en heces y la susceptibilidad por parte de algunos individuos y su posible seroconversión aún sin tener contacto directo con los gatos antigénicos con viremia activa, además de permanecer negativos al antígeno de LeVF y al provirus en sangre<sup>33</sup>. Las pulgas han sido consideradas una fuente potencial de infección ya que se ha encontrado el ARN de LeVF en ellas y en sus heces, aunque no se considera que tenga un papel importante en la transmisión natural<sup>34, 35</sup>. A su vez, la transmisión iatrogénica puede ocurrir a través de fómites, agujas o instrumental contaminado y transfusiones sanguíneas<sup>36</sup>.

Debido a las características que hacen al virus lábil en el medio ambiente no se considera un peligro la transmisión al estar en contacto con jaulas o transportadoras en hospitales veterinarios, así mismo una buena desinfección evita de gran forma la presencia del antígeno y su potencial riesgo<sup>10</sup>.

### **3.4 Patogénesis**

El resultado de la infección por el virus de LeVF es diferente en cada gato y depende de muchos factores, entre ellos el estado inmune del animal, la edad, la patogenicidad del virus, su concentración, así como algunas mutaciones en el mismo<sup>31</sup>.

Tras la exposición oral o nasal al virus hay una replicación viral en tejido linfoide orofaríngeo, si existe una adecuada respuesta inmune en animales inmunocompetentes el virus es eliminado efectivamente del organismo convirtiéndose en un gato “regresor”. Esta etapa también es conocida como abortiva y en ella los resultados en pruebas de rutina que detectan antígeno son negativos<sup>10</sup>.

Si la respuesta inmune es inefectiva, existe una propagación sistémica del virus, replicación en médula ósea y células linfoideas, presentando una linfadenopatía e hiperplasia linfocítica. En esta infección puede haber una eliminación del virus del organismo con resultados negativos en pruebas de rutina, pero al estar integrado el ADN (provirus) en células de la médula ósea se habla de una infección latente sin viremia ni síntesis activa de partículas virales, que puede ser reactivada en procesos de estrés. Por otro lado si la viremia continúa se vuelve persistente con síntesis activa de partículas virales la cual puede convertirse en una viremia transitoria y presentar resultados negativos en pruebas de rutina. Sin embargo, en una viremia persistente el gato puede ser un portador sano (sin presentar algún signo de enfermedad) con pruebas de rutina positivas o presentar algún tipo de enfermedad asociada como: malignidad (leucemia, linfoma o mielodisplasia), mielosupresión (anemia, trombocitopenia o granulocitopenia), inmunosupresión (linfopenia o una función linfocítica anormal) o algunos otros desórdenes (glomerulonefritis, desórdenes reproductivos u osteocondromas) todos ellos acompañados de resultados positivos en pruebas de rutina<sup>10</sup>.

### **3.5 Etapas de la infección de leucemia viral felina**

Existe controversia acerca de la clasificación de las etapas de la infección por LeVF, sin embargo con la llegada de nuevas herramientas diagnósticas como es el caso de métodos con gran sensibilidad como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han provisto de nuevos datos que cuestionan lo que se conocía acerca de la patogénesis de la infección que se clasificaba en viremia indetectable, transitoria y persistente. Con el uso de la PCR-tiempo real, se redefinió el espectro de las categorías de respuesta del huésped para la infección por LeVF según la carga del ADN proviral y el ARN viral. Fue así como gatos que se creía eran inmunes a la infección presentaban resultados positivos a pruebas de detección del provirus. El provirus

fue encontrado persistentemente por años y en algunos gatos se observó la recurrencia de la viremia y desarrollo de enfermedades. Así gatos con resultados negativos a pruebas de detección al antígeno y positivos en pruebas de detección al provirus son considerados portadores, los cuales después de la reactivación viral pueden ser una fuente de infección. La presencia del ADN viral integrado al genoma de las células del huésped puede también ser esencial para una protección y un mantenimiento de larga duración con una respuesta inmune protectora<sup>37</sup>. Por lo tanto, la clasificación de las etapas de la infección por LeVF han sido reclasificadas y se han descrito como: a) infección abortiva (comparable con la forma de “gato regresor”), b) infección regresiva (comparable con la forma de “viremia transitoria seguida por la infección “latente”), c) infección progresiva (comparable con la forma de “viremia persistente”) y d) infección atípica o focal<sup>37, 38, 39</sup>.

Tanto la infección progresiva como la regresiva pueden ser distinguidas por pruebas repetidas para detectar el antígeno viral en sangre periférica<sup>39</sup>. Muchos gatos presentan resultados positivos al antígeno dentro de 2-3 semanas posteriores a la exposición con el virus, y en el caso de los gatos con infección regresiva presentan resultados negativos a pruebas de antígeno viral de 2 a 8 semanas e incluso después de meses. Ambos tipos de infección son casi siempre acompañadas por ADN proviral persistente en sangre<sup>10</sup>.

Cuadro 2. Etapas de la infección por LeVF y hallazgos en diferentes pruebas.

Características de las etapas de la infección por LeVF							
Resultado de la infección por LeVF	Antígeno P 27 en sangre	Cultivo de virus en sangre	ARN viral en sangre	ADN viral en sangre	Cultivo de virus en tejido	Diseminación de virus	Enfermedad asociada a LeVF
<b>Progresiva</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Probable
<b>Regresiva</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Improbable
<b>Abortiva</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Improbable
<b>Focal</b>	Negativo	Negativo	No muestreado	No muestreado	Positivo	Variable	Improbable

*Tomado de Green, C. Enfermedades infecciosas del perro y del gato. Tercera edición, 2006*<sup>10</sup>.

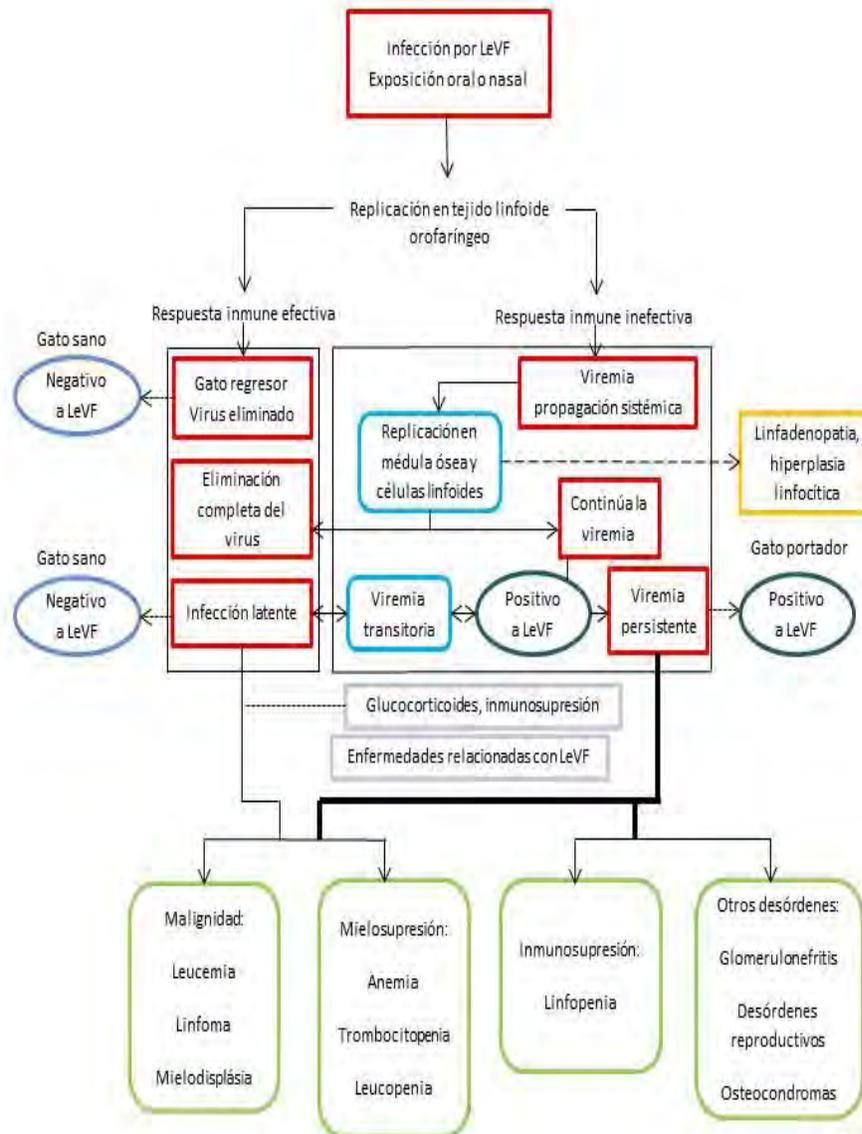


Figura 4. Interacción de leucemia viral felina con células del huésped y el sistema inmune que conduce a varios problemas clínicos en gatos con respuesta inmune inefectiva.

Tomado de Green, C. *Enfermedades infecciosas del perro y del gato*. Tercera edición, 2006<sup>10</sup>.

### 3.6 Hallazgos clínicos

Dentro de los hallazgos clínicos se pueden encontrar desórdenes proliferativos y no proliferativos<sup>10</sup>. Los principales desórdenes de tipo proliferativo hematopoyético son linfoma

y leucemia, mientras que los de origen no hematopoyético son fibrosarcoma, osteocondromas o neuroblastoma olfatorio<sup>10</sup>.

Los desórdenes hematológicos no proliferativos que han sido descritos en asociación con LeVF son: anemia (no regenerativa o regenerativa); neutropenia persistente, transitoria o cíclica, panleucopenia, anormalidades plaquetarias (trombocitopenia o función anormal de plaquetas), anemia aplásica o pancitopenia<sup>10</sup>.

Además de estos padecimientos se puede encontrar otros tales como: enfermedades inmunomediadas, desórdenes reproductivos como reabsorción fetal, abortos que pueden estar acompañados por endometritis bacteriana (particularmente en gatos con neutropenia y, muerte neonatal), neuropatía causada por linfoma o infiltración linfocítica en cerebro o medula espinal, anisocoria, ceguera, midriasis y síndrome de Horner<sup>10</sup>.

### **3.7 Prevención**

Entre los métodos para prevenir la enfermedad se incluyen precauciones generales, pruebas de rutina, el retiro de animales enfermos y la vacunación. Por las características propias del virus y su labilidad en el ambiente es necesario un contacto estrecho entre animales susceptibles y aquellos con infección progresiva (que pueden excretar alta carga de partículas virales). Por tal motivo, es necesario mantener a estos animales alejados de otros para evitar el contagio de la enfermedad<sup>10</sup>.

La vacunación es otro método efectivo para la disminución en la prevalencia de la enfermedad, en el mercado existen diferentes tipos de vacunas, inactivadas así como las vacunas recombinates<sup>10, 16</sup>.

### **3.8 Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad puede realizarse por medio de pruebas que detectan el antígeno, pruebas que detectan el ácido nucleico del virus o bien por aislamiento viral<sup>10</sup>.

Dentro de las pruebas que detectan el antígeno podemos encontrar aquellas que lo hacen en forma libre como las ELISA<sup>9,10</sup>, los ensayos inmunocromatográficos y la inmunofluorescencia, la cual detecta el antígeno dentro del citoplasma de células infectadas<sup>10</sup>.

El diagnóstico por rutina se realiza con pruebas que detectan el antígeno libre p27 en sangre el cual es producido abundantemente en células infectadas por LeVF<sup>7, 8, 10</sup>.

Dentro de las pruebas que detectan el material genético del virus, encontramos a la reacción en cadena de la polimerasa, que permite detectar el ARN utilizando la RT-PCR. De igual manera se puede cuantificar la carga viral utilizando PCR en tiempo real o punto final con el fin de determinar el provirus integrado en el material genético de células infectadas por el virus. Esta prueba puede ser realizada a partir de productos biológicos como tejidos, orina, heces, médula ósea y tiene la capacidad de determinar estados de latencia a diferencia de las pruebas que detectan antígeno<sup>10, 11, 12, 13, 14, 15</sup>.

Debido a que los ensayos inmunocromatográficos presentan falsos positivos además de no tener la capacidad para detectar al provirus en infecciones en estado de latencia<sup>8</sup>, es necesario contar con pruebas con mayor especificidad y sensibilidad, como son las técnicas moleculares que puedan ser utilizarlas como pruebas confirmatorias para los ensayos inmunocromatográficos.

Por otra parte, en México no se realizan en forma rutinaria este tipo de técnicas de biología molecular para el diagnóstico de esta enfermedad, lo que nos obliga a mantener la dependencia de laboratorios transnacionales inhibiendo así el desarrollo de esta área. Lo anterior conlleva al incremento de los costos y al posible subdiagnóstico de la enfermedad. Por ello resulta indispensable contar con este tipo de técnicas diagnósticas, que sean confiables y con altos porcentajes de especificidad y sensibilidad, y que a su vez abran el campo de investigación para obtener una vanguardia médica a nivel nacional.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si el provirus de LeVF se encuentra en tejidos de gatos infectados, éste podrá ser detectado por medio de PCR en muestras sanguíneas.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Detectar por medio de PCR el material genético (provirus) del virus de leucemia viral felina en muestras de gatos positivos a la prueba rápida inmunocromatográfica de la marca Anigen®.

### 5.1 Objetivos específicos

- A. Realizar la extracción del ADN viral a partir de tejidos obtenidos de un gato positivo al antígeno p27 por medio de una prueba inmunocromatográfica.
- B. Utilizar los primers previamente descritos y establecer las condiciones adecuadas para amplificar el segmento de U3 de LTR correspondiente al provirus de LeVF a partir del ADN obtenido de los tejidos del gato positivo.
- C. Amplificar mediante PCR el segmento de U3 LTR del provirus de LeVF en muestras sanguíneas de gatos positivos al antígeno p27 por la prueba inmunocromatográfica de la marca Anigen®.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal y analítico<sup>40</sup>, en el que se incluyeron los sujetos de prueba que resultaron ser positivos a la prueba rápida diagnóstica inmunocromatográfica de la marca Anigen®.

Para la realización del presente estudio todas las muestras sanguíneas y demás especímenes empleados fueron donados a la UNAM por un laboratorio privado que recibe muestras de diversas clínicas para el diagnóstico de LeVF.

### 6.1 Extracción de ADN a partir de tejidos

Para la obtención del control positivo que se utilizó en la PCR, se procedió a realizar la extracción del material genético (ADN) con un kit comercial (DNeasy blood & tissue kit

QIAGEN®) a partir de tejidos tales como linfonodos, glándulas salivales y médula ósea de un gato positivo a LeVF, del cual fueron obtenidos los órganos una vez que el animal falleció.

La extracción se hizo siguiendo el protocolo de acuerdo al proveedor, para la purificación de ADN a partir de tejidos animales como sigue.

1. Colocar 25 mg de tejido en un mortero estéril.
2. Adicionar 180 µl de buffer ATL y macerarlo perfectamente hasta obtener una suspensión.
3. Colocar la suspensión en un tubo para microcentrifuga de 2 ml.
4. Adicionar 20 µl de proteinasa K y mezclar por vórtex 10 segundos.
5. Incubar en termobloc a 56 °C 15 minutos.
6. Mezclar por vórtex 15 segundos y adicionar 200 µl de buffer AL y mezclar por vórtex 15 segundos.
7. Adicionar 200 µl de etanol (96-100 %) y mezclar por vortex 15 segundos.
8. Pipetear la mezcla obtenida y colocarla en la columna del kit DNeasy mini spin, centrifugar a 8,000 rpm 1 minuto.
9. Colocar la columna en un tubo colector y adicionar 500 µl de buffer AW1 y centrifugar a 8,000 rpm 1 minuto.
10. Colocar la columna en otro tubo colector y adicionar 500 µl de buffer AW2 y centrifugar a 14,000 rpm 3 minutos para secar la membrana.
11. Colocar la columna en un tubo para microcentrifuga nuevo de 1.5 ó 2 ml y agregar 200 µl de buffer AE dejar incubar a temperatura ambiente 1 minuto.
12. Centrifugar a 8,000 rpm 1 minuto para eluir.

## 6.2 Detección de LeVF en tejidos por PCR

Se utilizaron un par de iniciadores previamente descritos<sup>15</sup> para amplificar un segmento de 235 pb de la región U3 LTR (long terminal repeat). Estos son: Forward 5'-AAA ATT TAG CCA GCT ACT GCA G-3' y Reverse 5'-GAA GGT CGA ACT CTG GTC AAC T-3'. Se

utilizó un kit de PCR comercial: Top Taq Master Mix Kit (QIAGEN) y los componentes de la reacción se muestran en el cuadro 3.

La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el cuadro 4. Para la estandarización de la PCR se llevó a cabo un ensayo en gradiente, utilizando las temperaturas de alineación 49, 50, 51, 52 y 53 °C. Se encontró que la temperatura de alineación óptima correspondió a 51°C. La concentración del MgCl<sub>2</sub> debió ser ajustada a 2.5 mM debido a que el buffer del Master Mix sólo contenía 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

### **6.3 Extracción de ADN a partir de sangre con EDTA de gatos**

Se utilizaron muestras de sangre completa con anticoagulante (EDTA) de 59 gatos positivos al antígeno p27 por el método de ensayo inmunocromatográfico de la marca Anigen. Para llevar a cabo la extracción de ADN a partir de la sangre se utilizó un kit comercial (DNeasy blood & tissue QIAGEN), siguiendo el protocolo de acuerdo al proveedor para la purificación de ADN a partir de sangre con EDTA.

1. Agregar 100 µl de sangre completa con EDTA en un tubo para microcentrifuga y añadir 20 µl de proteinasa K.
2. Añadir 200 µl de buffer AL, mezclar por vórtex 15 segundos e incubar a 56°C por 10 minutos.
3. Añadir 200 µl de etanol (96-100-%) y mezclar por vórtex 15 segundos.
4. Pipetear la mezcla obtenida a una columna del kit DNeasy mini spin, centrifugar a 8,000 rpm 1 minuto.
5. Colocar la columna en un tubo colector y añadir 500 µl de buffer AW1, centrifugar a 8,000 rpm 1 minuto.
6. Colocar la membrana en otro tubo colector y añadir 500 µl de buffer AW2, centrifugar a 14,000 rpm 3 minutos para secar la membrana.

7. Colocar la columna en un tubo para microcentrifuga nuevo de 1.5 ó 2 ml y agregar 200  $\mu$ l de buffer AE dejar incubar a temperatura ambiente 1 minuto.
8. Centrifugar a 8,000 rpm 1 minuto para eluir.

#### **6.4 Detección por PCR del provirus de LeVF en sangre periférica con EDTA de gatos positivos al antígeno p27 en pruebas inmunocromatográficas**

Se utilizaron un par de iniciadores previamente descritos<sup>15</sup> para amplificar un segmento de 235 pb de la región U3 LTR (long terminal repeat). Estos son: Forward 5'-AAA ATT TAG CCA GCT ACT GCA G-3' y Reverse 5'-GAA GGT CGA ACT CTG GTC AAC T-3'. Se utilizó un kit de PCR comercial: Top Taq Master Mix Kit (QIAGEN) y los componentes de la reacción se muestran en el cuadro 3.

La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el cuadro 4. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Cuadro 3. Componentes para la reacción de PCR

<b>Componentes para la reacción de PCR</b>		
<b>Componente y su concentración</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Master Mix, 2x*</b>	12.5 $\mu$ l	1X
<b>MgCl<sub>2</sub> (1 mM)</b>	0.5 $\mu$ l	2mM
<b>Primer forward (20 <math>\mu</math>M)</b>	0.5 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
<b>Primer reverse (20 <math>\mu</math>M)</b>	0.5 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
<b>Coral load</b>	2.5 $\mu$ l	-
<b>Agua</b>	3.5 $\mu$ l	-
<b>ADN templete</b>	5 $\mu$ l	-
<b>Total</b>	25 $\mu$ l	-

\*1.25 unidades de TopTaq DNA polimerasa, 1x PCR buffer (contiene 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 200  $\mu$ M de cada dNTP)

Cuadro 4. Condiciones de la programación del termociclador utilizada para la reacción de PCR.

<b>Condiciones de la programación del termociclador</b>		
<b>Desnaturalización inicial</b>	94 ° C	4 minutos
<b>Desnaturalización</b>	94 ° C	1 minuto
<b>Alineación</b>	51 ° C	1 minuto
<b>Extensión</b>	72 ° C	2 minutos
<b>Extensión final</b>	72 ° C	15 minutos

## 7. RESULTADOS

Una vez realizada la extracción del material genético por los medios antes descritos se procedió a realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para determinar la presencia del material genético con el cual se trabajaría y apreciar así su integridad (figura 5).

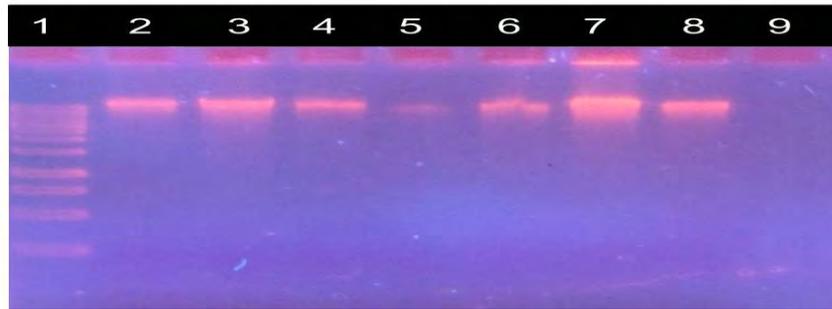


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, carril 1 marcador de peso molecular 100 pares de bases, carriles 2 al 8 ADN obtenido de diferentes tejidos. Carril 9 control negativo. Los carriles 2 al 5 corresponden a la extracción de ADN a partir de muestras de sangre, mientras el carril 6 corresponde a ADN extraído de linfonodo, carril 7 ADN a partir de médula ósea y carril 8 de glándula salival. En la imagen se puede observar la integridad del material genético el cual no presenta ningún tipo de barrido a lo largo del gel, además de presentar una buena definición de la banda.

Al determinar que el material genético procedente de las muestras de tejidos del gato infectado por LeVF eran las adecuadas para realizar la reacción de PCR, se hizo la misma utilizando el material en pool (linfonodo, médula ósea y glándula salival juntos). A partir de esta muestra se obtuvo un amplicón, observándose una banda en el gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Sin embargo, la banda observada fue muy discreta en el gel (figura 6).

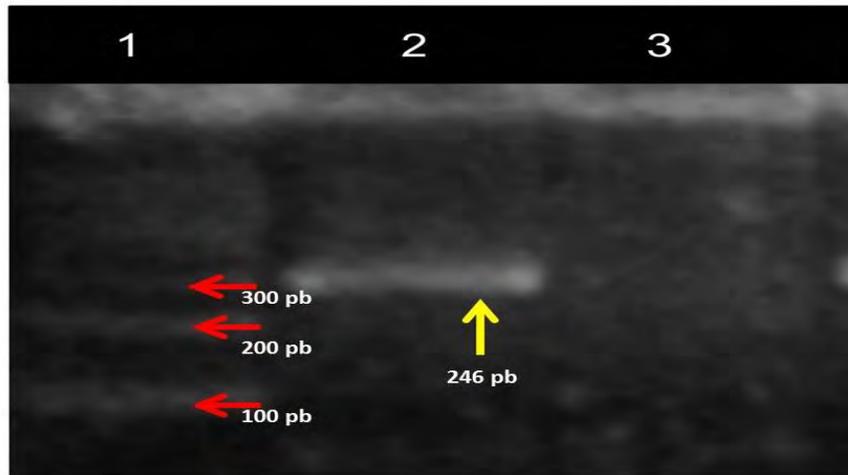
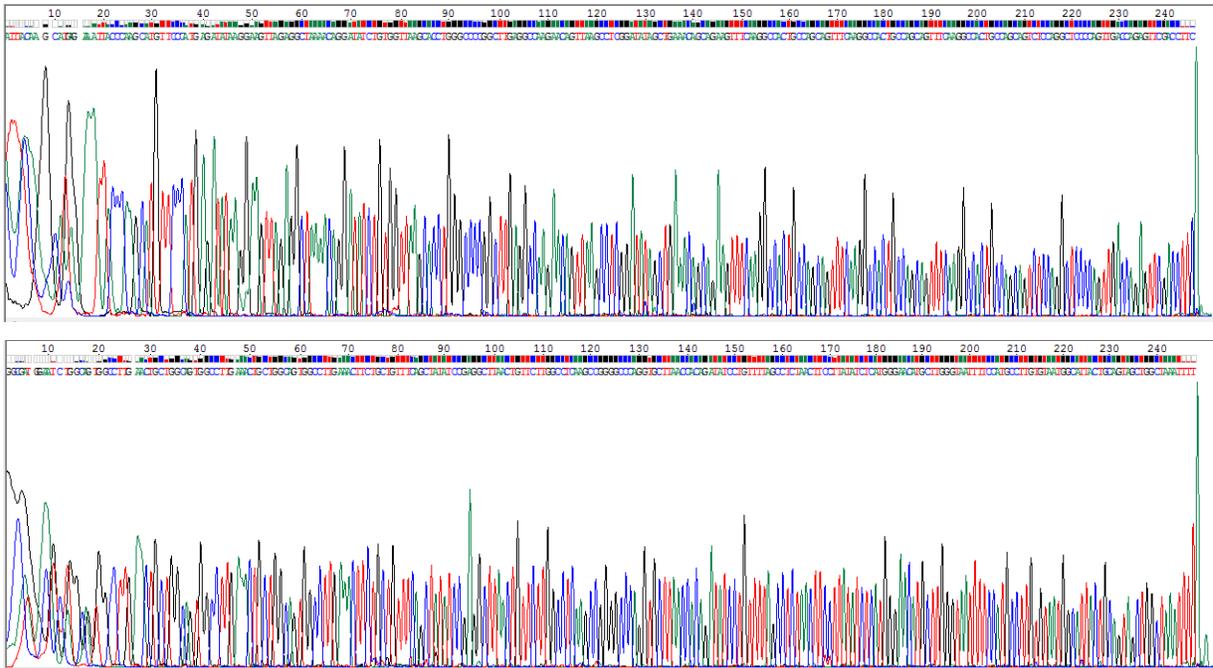


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 reacción positiva utilizando el pool de ADN y carril 3, control negativo. En la imagen se puede observar indicadas con flechas rojas las bandas del marcador de peso molecular de 100 pares de bases cada una mientras la flecha amarilla indica el amplicón que se obtuvo al utilizar el ADN en pool extraído a partir de los órganos del gato positivo que, al ser secuenciado, muestra un tamaño de 246 pb.

El producto obtenido se envió a secuenciar al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Figuras 7 y 8. Estos son electroferogramas correspondientes a la secuenciación del material genético amplificado, reacción 5'y 3' respectivamente analizado mediante el programa Chromas (versión gratuita), en las imágenes se observan en la parte superior las bases nitrogenadas presentes en la reacción de secuenciación, estas bases pertenecen al segmento U3 LTR del provirus de LeVF.

Al analizar este resultado se observa que el número de bases es de aproximadamente 246, mientras que el reportado era de 235 pb (figuras 7 y 8).

La secuencia reportada tras la secuenciación fue analizada en la página del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y su herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), la cual encuentra regiones de similitud focal entre secuencias, compara secuencias de nucleótidos o secuencias de proteínas de una base de datos y calcula la significancia estadística entre coincidencias. Esta herramienta se puede utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes. El resultado del análisis arrojó desde un 98% al 93% de homología con la secuencia del LTR y la región U3 del LTR del virus de Leucemia Viral Felina descritas en el cuadro 5.



acceso del NCBI AY374189.1, cuya longitud es de 248 pb. La diferencia con respecto al producto amplificado (de 246 pb) se debe a la presencia de 2 gaps (marcados con el fondo de color amarillo) además existe la sustitución de 3 nucleótidos (marcados con el fondo de color gris). Estas son las causas que justifican el porcentaje de identidad del 98%.

Al confirmar que el amplicón obtenido correspondía a LeVF, se procedió a usar esta muestra como control positivo de la PCR en las siguientes reacciones a partir de las muestras sanguíneas.

Al realizar las reacciones de PCR con las 59 muestras de sangre se observan amplificadas en 42 de ellas (71%), mientras 17 no muestran amplificación (29%) (Gráfica 1)

De las 42 muestras amplificadas, 28 de ellas (67%) presentan el tamaño del amplicón reportado para los primers utilizados el cual corresponde a 235 pb, mientras que las 14 (33%) restantes presentan un tamaño mayor, de aproximadamente 246 pb, al igual que el pool amplificado y secuenciado previamente.

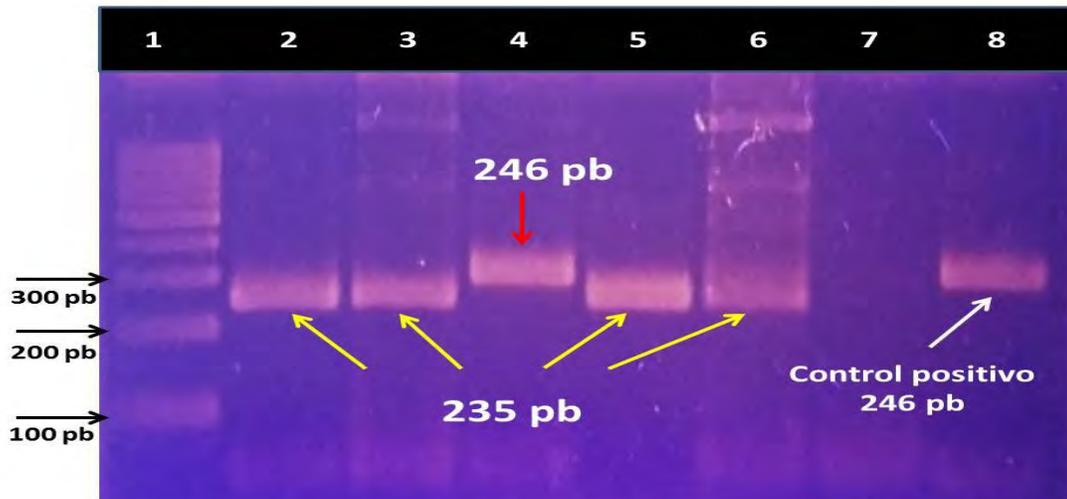
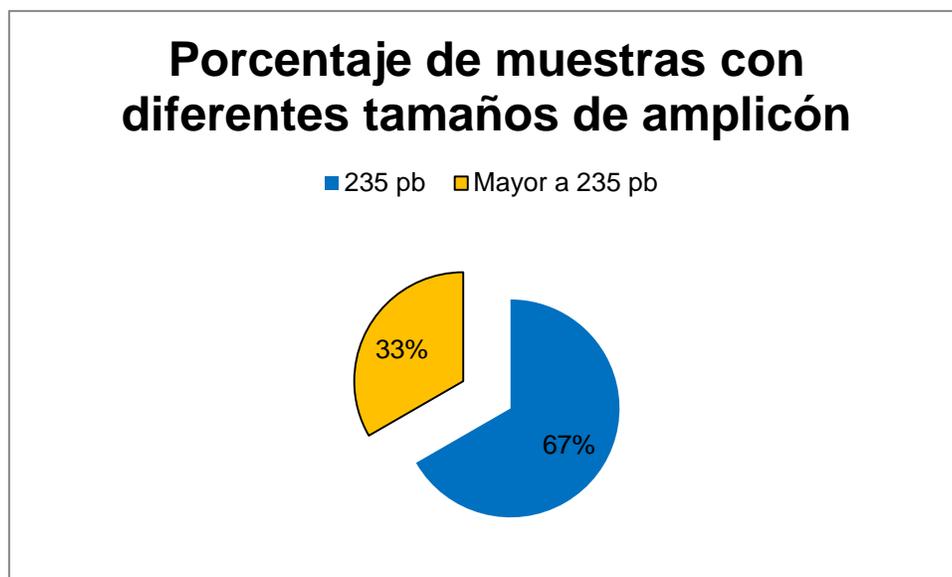


Figura 9. Imagen de gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en la cual se pueden observar los productos de PCR y los dos tamaños de los amplicones obtenidos en las reacciones, carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 al 6 amplicones de las reacciones a partir de muestras sanguíneas, carril 7 control negativo, carril 8 control positivo, la flechas amarillas indican el tamaño de los amplicones de 235 pb, mientras que el carril número 4 presenta el mismo tamaño que el del control positivo.



Gráfica 1. Resultados de la reacción de PCR en las 59 muestras de sangre con EDTA, en la gráfica se observa el porcentaje de las muestras que presentaron amplificación al realizar las reacciones de PCR.



Gráfica 2. Porcentaje de muestras con los tamaños de amplicón obtenidos.

Al analizar los resultados obtenidos de las reacciones de PCR se procedió a recabar información de las muestras clínicas utilizadas para el estudio. Desafortunadamente no todos cuentan con estudios previos, reseñas y/o anamnesis. En los cuadros 6 y 7 se puede observar que los animales presentaban alteraciones hematológicas como anemia y citopenias.

Cuadro 6. Historias clínicas y hallazgos de algunos de los gatos de los cuales se corrieron las reacciones de PCR, con un tamaño de amplicón de 246 pb.

<b>Identificación</b>	<b>Peso 246 pb</b>
PC14-2500 Sam	Anemia severa (0.15 L/L) no regenerativa, trombocitopenia, hiperproteïnemia y monocitosis por inflamación crónica, leucopenia por neutropenia por inflamación no controlada.
PC15-1463 Tico	Macho, Siamés 7 años, depresión, anorexia, diarrea y heces sanguinolentas
PC15-3547 Boreal	Macho, europeo doméstico 5 años, Anemia muy severa (0.04 L/L) no regenerativa, trombocitopenia y leucopenia por neutropenia y linfopenia.
PC15-5878 Manchas	Macho, europeo doméstico 6 años, depresión, hiporexia, deshidratación del 6%. Anemia severa (0.11 L/L) no regenerativa, trombocitopenia, neutropenia y linfopenia..
PC14-2219 Pintito	Macho Castrado, europeo doméstico, un año y medio, pérdida de peso, halitosis y úlceras orales, vive en una colonia con congéneres positivos a LeVF. Anemia ligera no regenerativa (0.20 L/L), linfopenia por proceso viral activo
PC15-4257	2 años Anemia severa (0.14 L/L) no regenerativa, trombocitopenia, leucopenia por neutropenia por inflamación no controlada.
PC16-3144 Square	Mach, 3 años, europeo doméstico, secreción oral mucopurulenta, anorexia, adipsia, membranas mucosas pálidas. Anemia severa no regenerativa (0.11 L/L), leucocitosis por neutrofilia con desviación a la izquierda y monocitosis por inflamación crónica, linfocitosis por síndrome paraneoplásico, positivo a LeVF y a virus de inmunodeficiencia felina

Cuadro 7. Historias clínicas de algunos de los gatos de los cuales se corrieron las reacciones de PCR con un tamaño de amplicón de 235 pb.

<b>Identificación</b>	<b>Peso de 235 pb</b>
PC15-1744	Macho, europeo doméstico, 5 años.
PC15-3271	Macho, europeo doméstico, 4 años, hace 15 empezó a bajar de peso, hiporexia, Hematocrito en límite inferior (0.27 L/L), leucopenia por neutropenia y monocitosis por inflamación crónica.
PC15-2593 Patito	Macho, europeo doméstico, 4 años, encontrado en la calle.
PCE14-2109 Coco	Hembra, 3 años, Anemia ligera no regenerativa, trombocitopenia y linfopenia

PC15-566	Hembra, un año y medio, europeo doméstico. Anemia muy severa (0.09 L/L) no regenerativa, leucopenia por neutropenia y linfopenia.
PC15-7586 Negro	Macho, europeo doméstico, 8 años, depresión, anorexia e hipotermia.
PC16-1234 Shawn	Macho, europeo doméstico, 2 años, baja de peso, mucosas pálidas y fiebre. Anemia severa (0.11 L/L) no regenerativa, linfopenia.
PC15-402 Tinto	Macho, 2 años, Siamés, depresión, anorexia y pérdida de peso, leucopenia marcada por neutropenia y linfopenia.
PCE14-2249 Luky	Hembra, europeo doméstico, 5 meses, depresión, linfadenomegalia e hiporexia. Hiperproteinemia, leucocitosis por neutrofilia y monocitosis por inflamación crónica.
PC16-2595 Wilo	Macho, europeo doméstico, 12 años aprox., deshidratación del 7%, depresión, anorexia. Anemia ligera (0.24 L/L) no regenerativa, trombocitopenia. Hiperproteinemia, leucocitosis marcada ( $61.2 \times 10^9/L$ ) por neutrofilia y monocitosis por inflamación crónica, linfopenia total posiblemente por proceso viral.
PC16-816 Princesa	Hembra, europeo doméstico, 7 años, rescatada de la calle, condición corporal 1/5, secreción nasal mucopurulenta, gingivitis severa, deshidratación del 8%.
PCE16-560	Hembra, 4 años, europeo doméstico, linfonodos submandibulares y poplíteos aumentados de tamaño.
PC16-2690 Mishi	Hembra, 4 años, europeo doméstico, vómito esporádico, anorexia, pérdida de peso. Anemia severa no regenerativa (0.16 L/L), trombocitopenia, leucopenia por neutropenia y linfopenia.
PCE16-294 Wilson	Macho, 3 años, europeo doméstico, baja de peso, problemas respiratorios, gingivitis y parasitosis.
Minino	
PCE16-673 Junior	Macho, un año y medio, mexicano doméstico, pérdida de peso progresiva y deshidratación.

## 8. DISCUSIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada en el presente trabajo, fue capaz de amplificar un producto correspondiente a un segmento de la región U3 LTR (long terminal repeats) utilizando los primer previamente descritos (Ronh, J. L et al., 1995, Jackson M. L, et al. 1993) en el que se reporta un producto de amplificación de 235 pb.

Si bien el tamaño del amplicón obtenido en 14 muestras clínicas fue mayor al reportado (246 pb), se infiere que todas las muestras amplificadas son positivas; pues la secuenciación del control mostró corresponder a LeVF. No obstante, sería importante realizar la secuenciación de un mayor número de muestras: tanto las de 246 pb, como las de 235. Lo anterior permitiría determinar las posiciones en las que se encuentren cambios de nucleótidos, realizar los alineamientos con secuencias reportadas y así obtener mayor información sobre las cepas circulantes en México, ya que el 33% de las muestras amplificadas presentaron un tamaño mayor al reportado.

Los resultados de las PCR positivas muestran correlación con los resultados de las pruebas inmunocromatográficas y de la misma manera se puede apreciar con las historias de los gatos que cuentan con estudios hematológicos previos, en los que se observan anemias desde muy severas hasta ligeras, las mismas que son de tipo no regenerativas basadas en las cuentas de reticulocitos. Algunos de los gatos presentan a su vez leucopenias marcadas, leucopenia por neutropenia y/o linfopenia, mientras que otros presentan trombocitopenia y pancitopenias, confirmando así la presencia de una viremia activa y una infección a nivel de médula ósea. Este diagnóstico molecular es una herramienta para la confirmación del diagnóstico de la enfermedad además de tener la capacidad de detectar tanto la infección progresiva como una infección regresiva, así como el estado de latencia debido a la detección de ADN integrado al material genético de las células.

En el caso de los gatos con pruebas inmunocromatográficas positivas pero resultados negativos en la PCR, sería importante determinar la cantidad y calidad del material genético obtenido a partir de la extracción, debido a que algunos de los especímenes fueron congelados desde el año 2013 a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ , pudiendo ser un factor importante para la degradación o fragmentación del ADN. Algunas de las muestras tenían un volumen menor a  $200\ \mu\text{l}$ , si además de esto los animales presentaban citopenias, podría inferirse que la

concentración de material genético obtenido a partir de las células nucleadas disponible para su extracción se encontraba en menor cantidad. Desafortunadamente en este estudio no se determinó la cantidad ni la integridad del ADN utilizado en cada una de las muestras, sólo pudo determinarse en 5 de ellas y en los tejidos utilizados en pool para obtener el control positivo a través de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para estandarizar las condiciones de la PCR.

En estudios posteriores se podría hacer un conteo de glóbulos blancos para determinar el volumen sanguíneo o la cantidad de células mínima necesaria para obtener el suficiente material genético para llevar a cabo la reacción de PCR y con ello determinar la sensibilidad de la prueba. También podría incluirse un control interno de la reacción, para que se tenga la certeza de que aquellas que arrojen un resultado negativo, realmente sean por la ausencia del DNA viral y no por una falla en su extracción. Finalmente, también se debe considerar el tipo de conservación, el tiempo de toma de muestra y la correcta separación de eritrocitos para evitar la inhibición de la reacción por presencia de hemoglobina que podría generar falsos negativos en la prueba.

También sería importante comparar estos resultados con la utilización de otros primers dirigidos a zonas de mayor conservación, o utilizar reacciones anidadas o semianidadas con el fin de incrementar la especificidad de la prueba.

Por otra parte, un mal procedimiento en la realización de la prueba inmunocromatográfica o una mala lectura de la misma podría generar falsos positivos. Las pruebas inmunocromatográficas de la marca Anigen que fueron utilizadas como base para la realización del presente estudio fueron reportadas por Levy J. K. y colaboradores con una sensibilidad del 91.8% y una especificidad del 95.5%<sup>41</sup>, por lo que es posible que los animales que resultaron negativos a la PCR, realmente lo fueran.

En este trabajo se logró estandarizar una PCR para amplificar un segmento correspondiente a la región U3 LTR del provirus de LeVF, lo que abre las puertas para continuar con la validación del método a partir de un mayor número de muestras obtenidas de gatos sospechosos a la enfermedad, que sean recientes y conservadas bajo condiciones óptimas. Si además de estas variables, se determina la sensibilidad del método y se utilizan los controles internos mencionados se podría considerar a la PCR como prueba de oro (dado que el cultivo

viral es muy complicado) y evaluar si los kits de diagnóstico rápido que detectan el antígeno p27 están dando un alto número de resultados falsos positivos.

Además, la PCR podría ser utilizada para detectar el provirus en médula ósea y determinar estados de latencia de la infección por LeVF en los casos de no obtener resultados positivos en pruebas inmunocromatográficas.

La PCR podría también ser utilizada con otros especímenes como saliva, cuando la venopunción no es posible sin una restricción física hábil o sedación con fines diagnósticos.

## **9. CONCLUSIONES**

Se logró la estandarización de la PCR para amplificar un segmento del provirus de Leucemia viral felina a partir de muestras de sangre con EDTA.

Del total de muestras analizadas el 33% dio un amplificado de mayor tamaño al reportado, lo cual podría sugerir la presencia de una variante a nivel nacional.

La PCR utilizada en el presente estudio resultó ser una herramienta apropiada para el diagnóstico de LeVF en gatos con viremia activa o con enfermedad latente.

Es necesario afinar la prueba para aumentar la certeza de los resultados negativos y ofrecer así un diagnóstico más confiable. Esto permitiría usarla para confirmar el diagnóstico, una vez realizada la prueba inmunocromatográfica como prueba tamiz.

Se provee a los clínicos de una herramienta adecuada para el diagnóstico de la enfermedad.

Se logra iniciar la investigación de este tipo de retrovirus a nivel institucional con fines de diagnóstico.

## **10. PERSPECTIVAS**

Incrementar la población de estudio, a partir de animales cuya historia clínica sugiera la enfermedad. Obtener muestras adecuadas y suficientes para realizar la PCR y pruebas complementarias como hemogramas (con el fin de conocer el conteo total de leucocitos). Utilizar pruebas inmunocromatográficas de otras marcas, para correlacionar toda esta información y con ello obtener mayores herramientas para el diagnóstico, determinar los

valores de especificidad y sensibilidad de la prueba y de ser necesario, diseñar nuevos primers hacia otras zonas del genoma, o utilizar pruebas anidadas o semianidadas que permitan incrementar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

Sería importante determinar la capacidad de la prueba de detectar el provirus a partir de especímenes como sangre, saliva, orina, heces y material obtenido de tejidos como linfonodos o tejido tumoral (con diagnóstico de linfosarcoma).

Secuenciar los productos obtenidos, con el fin de determinar las variantes virales a nivel de nucleótidos y determinar su relación con la presentación de los diferentes cuadros clínicos.

Desarrollar y ampliar el diagnóstico molecular de enfermedades felinas en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, y mantener actualizada esta herramienta con fines de investigación y diagnóstico.

## 11. REFERENCIAS

1. Jarrett, W. F. H., Crawford, E. M., Martin, W. B., and Davie, F. A Virus-like particle associated with leukemia (Lymphosarcoma). *Nature*. 1964; 202: 567-569.
2. Jarret, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology*. 1999; 69: 99-107.
3. Ortega, A. Aguilar, A. Colin, R. Acosta, K. Guzman, E. Jimenez, M. Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. *Journal of feline medicine and surgery*. 2014; 16 (6): 460-464.
4. Levy, J. Scott, H. Lachtara, J. Crawford, P. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc*. 2006; 1:228 (3): 371-376.
5. Little, S. Sears, W. Lachtara, J. Bienzle, D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. *Can Vet J*. 2009; 50: 644-648.
6. Westman, M. Paul, A. Malik, R. McDonagh, P. Ward, M. Hall, E. Norris, J. Seroprevalence of immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011-2013). *Journal of feline medicine and surgery, open reports*. 2016; 1-11.
7. Eto, N. Yazaki-Takayama, N. Takayama, Y. Yoshino-Nakamura, T. Kobayashi, Y. Immuno-chromatographic assay for diagnosis of feline leukemia virus. *Cytotechnology*. 2003; 43: 65-72.
8. Westman, M. Malik, R. Hall, E. Sheey, P. Norris, J. Comparison of three feline leukemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2017; 50:88-96.
9. Lutz, H. Pedersen, N. Durbin, R. Theilen, G. Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay of p27. *Journal of immunological methods*. 1983; 56: 209-220.

10. Hartmann, K. Feline leukemia virus infection. En: Green, C, editor. Infectious diseases of the dog and the cat. 2006; cuarta edición: 108-136.
11. Gomes, M. Gönczi, E. Tandom, R. Riondato, F. Hofman, R. Meli, M. Lutz, H. Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *Journal of clinical microbiology*. 2006; 44 (3): 916-922.
12. Torres, A. O'Holloran, K. Larson, L. Schultz, R. Hoover, E. Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2008; 123: 81-89.
13. Luaces, I. Doménech, A. García, M. Collado, V. Sánchez, C. Tejerizo, J. Galka, M. Fernández, P. Gómez, E. Detection of feline leukemia virus in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J Vet Diagn Invest*. 2008; 20: 381-385.
14. Arjona, A. Barquero, N. Doménech, A. Tejerizo, G. Collado, V. Toural, C. Martín, D. Gómez, E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of feline medicine and surgery*. 2007; 9: 14-22.
15. Rohn, J. Overbaugh, J. In vivo selection of long terminal repeats alterations in feline leukemia virus-induced thymic lymphomas. *Virology*. 1995; 206: 661-665.
16. Castro, I. Enfermedades de los gatos y su manejo. Segunda edición. 2011.
17. Jarret, W. Crawford, E. Martin, W. Davie, F. Virus-like particles associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature*. 1964; 202: 567-569.
18. Miyazawa, T. Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Front. Biosci*. 2002; 7: 504-518.
19. Onions, D. Animal models: lessons from feline and bovine leukemia virus infections. *Leuk. Res*. 1985; 9:709-711.
20. Hardy, W. D. Feline lymphosarcoma: a model of viral carcinogenesis and significance related to human neoplasia. *Animal models. Biomed Res*. 1971; 4: 11-26.
21. Barnett AL, Wensel DL, Li W, et al. Structure and mechanism of a coreceptor for infection by a pathogenic feline retrovirus. *J Virol*. 2003; 77:2717-2729.

22. Lauring AS, Anderson MM, Overbaugh J. 2001. Specificity in receptor usage by T-cell-tropic feline leukemia viruses: implications for the in vivo tropism of immunodeficiency-inducing variants. *J Virol.* 2001; 75: 8888-8898.
23. Lauring AS, Cheng HH, Eiden MV, et al. 2002. Genetic and biochemical analyses of receptor and cofactor determinants for T-cell-tropic feline leukemia virus infection. *J Virol.* 2002; 76: 8069-8078.
24. Anai, Y. Ochi, H. Watanabe, S. Nakagawa, S. Kawamura, M. Gojobori, T. Nishigaki, K. Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *Journal of virology.* 2012; 86 (16): 8634-8644.
25. Jarret O., Helen M. Determinants of the host range of feline leukemia viruses. *J. gen. Virol.* 1973; 20: 169-175.
26. Stephenson, J. R. Essex, M. Hino, S. Hardy, W. D. Aaronson, A. Feline oncornavirus-associated cell-membrane Antigen (FOCMA): distinction between FOCMA and the major major virion glycoprotein. *Proc. Natl. Acad.* 1977; 74: 3, 1219-1223.
27. Matsumoto Y, Momoi Y, Watari T, et al. 1992. Detection of enhancer repeats in the long terminal repeats of feline leukemia viruses from cats with spontaneous neoplastic and nonneoplastic diseases. *Virology.* 1992; 189:745-749.
28. Nishigaki K, Okuda M, Endo Y, et al. Structure and function of the long terminal repeats of feline leukemia viruses derived from naturally occurring acute myeloid leukemias in cats. *J Virol.* 1997; 71:9823-9827.
29. Fenner, F. J. Retroviridae. In: Fenner's veterinary virology. Fourth edition. ELSEVIER. 2011; 237-274.
30. Gomes-Keller MA, Tandon R, Gönczi E, et al. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Vet Microbiol.* 2006; 112:11-21.
31. Levy JK. FeLV and nonneoplastic FeLV related disease. En: Ettinger SJ, Feldman EC (eds): Textbook of veterinary internal medicine. WB Saunders, Philadelphia. 2000. 424-432
32. Goldkamp CE, Levy JK, Edinboro CH, et al. Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats with abscesses or bite wounds and rate of veterinarian compliance with current guidelines for retrovirus testing. *J Am Vet Med Assoc.* 2008; 232:1152.

33. Gomes-Keller MA, Gönczi E, Tandon R, Hofman-Lehman R, Lutz H. Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acids: A transmission potential. *Veterinary Microbiology*. 2009; 134: 208-217.
34. Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, et al. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitol Res*. 2003; 91:467-470.
35. Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, et al. The feline leukemia virus (FeLV) and the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitol Res*. 2003; 90:132-134.
36. Lutz H, Addie D, Belák S, et al. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2009; 11:565-574.
37. Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, et al. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008; 123:119.
38. Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, et al. Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and longterm followup. *Vaccine*. 2007; 25:5531-2539.
39. Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA. Reexamination of feline leukemia virus: host relationships using realtime PCR. *Virology*. 2005; 332:272-283.
40. Manterola C., Otzen T. Estudios observacionales, los diseños utilizados con más frecuencia en investigación clínica. *Int. T. J Morphol*. 2014; 32 (2): 634-645.
41. Levy, JK, Cynda Crawford P, Tucker SJ. Performance of 4 point-of-care screening tests for Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2017; 31: 521-526.