



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE RETROVIRUS FELINOS EN GATOS  
DOMÉSTICOS CON ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS Y SIGNOS  
CLÍNICOS RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN RETROVIRAL”

**T E S I S**  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA:**  
GABRIEL EDUARDO ACEVEDO JIMÉNEZ

**TUTOR PRINCIPAL:**  
DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ (FES-CUAUTITLÁN, UNAM)

**COMITÉ TUTOR:**  
DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA (FMVZ, UNAM)  
DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES (FMVZ, UNAM)

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, MARZO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A mi familia, especialmente a mi madre, por darme todo su apoyo y confianza hasta el día de hoy.

A Lana y Haruki, por desvelarse y acompañarme durante la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES-C, por ser parte de esta etapa tan importante para mí.

A todos los animales cuyas muestras permitieron la realización de este estudio.

## AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado tanto. Es un honor formar parte de ella.

Al Dr. Hugo Ramírez Álvarez por ser mi mentor y brindarme la oportunidad de participar en este proyecto.

A los médicos veterinarios Ana Flores Montes, Jorge Alejandro Baltazar Marcué, Rodolfo Córdova Ponce y Dra. Marcela Autran Martínez por su apoyo en la colección de las muestras.

Al comité tutor: Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales por su valiosa orientación y aportaciones.

Al jurado: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero y Dra. Laura Patricia Romero Romero por su atención y comentarios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante mis estudios de posgrado.

Este estudio fue financiado por los proyectos CI2224 FES-C, UNAM y CONACyT FOP02-2021-04/316257.

## RESUMEN

Los virus de leucemia e inmunodeficiencia felina (FeLV y FIV) son retrovirus de distribución mundial que infectan a diferentes especies de felinos, incluyendo al gato doméstico (*Felis silvestris catus*). Las infecciones causadas por retrovirus felinos pueden causar varios síndromes que pueden conducir a la muerte del hospedador. De acuerdo con la manera en la que se transmite, el FeLV puede clasificarse como endógeno (enFeLV) y exógeno (exFeLV). Las secuencias de enFeLV se encuentran en el genoma de especies del género *Felis* y es heredado de los padres a la descendencia, mientras que el exFeLV se transmite principalmente a través de la exposición oronasal con la saliva y las secreciones nasales de animales infectados y se divide en subgrupos denominados: FeLV-A, B, C, D, E y T; surgiendo algunos de ellos de la recombinación con secuencias de retrovirus endógenos. El virus de inmunodeficiencia felina se transmite principalmente a través de mordeduras y actualmente se clasifica en diferentes subtipos: A - F. La identificación y segregación de los gatos infectados es la medida más importante para el control de las infecciones causadas por retrovirus felinos, siendo la variabilidad genética viral y la fase de la infección puntos clave para el empleo de las diferentes herramientas diagnósticas. El objetivo del presente estudio fue detectar y genotipificar a los retrovirus felinos presentes en gatos domésticos mexicanos infectados naturalmente. La detección de las infecciones retrovirales se realizó con inmunocromatografía de flujo lateral y diferentes ensayos de PCR punto final y en tiempo real, diseñados para la amplificación de las regiones genéticas LTR y/o *gag* en 50 gatos domésticos con diferentes características clínico-hematológicas. Las secuencias de enFeLV se detectaron en todas las muestras de ADN de los gatos incluidos en el estudio, así como la detección de transcritos de enFeLV en 48 de los individuos. El exFeLV se detectó en 17 de los gatos con alguna de las pruebas empleadas. Además, se identificó la presencia de ADN proviral del FIV en 10 individuos. No pareció existir relación entre los niveles de carga proviral y viral de enFeLV y exFeLV. Las secuencias genéticas de enFeLV mostraron ser las más variables en comparación con las secuencias de exFeLV, que fueron más conservadas y relacionadas con secuencias del subgrupo A previamente reportadas en América. El análisis filogenético de las secuencias del gen *gag* del FIV revelaron la presencia del subtipo B en los gatos infectados.

Palabras clave: FeLV; FIV; retrovirus endógenos; genotipificación; LTR; *gag*.

## ABSTRACT

Feline leukemia and immunodeficiency viruses (FeLV and FIV) are retroviruses with worldwide distribution that infect different species of felines, including domestic cats (*Felis silvestris catus*). Infections caused by feline retroviruses can cause various syndromes that can lead to the death of the host. According to the way of transmission, FeLV can be classified as endogenous (enFeLV) and exogenous (exFeLV). The enFeLV sequences are found in the genome of species of the genus *Felis* and are inherited from parents to offspring, while exFeLV is mainly transmitted through oronasal exposure with the saliva and nasal secretions of infected animals and is divided in subgroups assigned as: FeLV-A, B, C, D, E and T; some of them arising from recombination with endogenous retrovirus sequences. Feline immunodeficiency virus is mainly transmitted through bites and is currently classified into different subtypes: A - F. The identification and segregation of infected cats is the most important measure for the control of infections caused by feline retroviruses; viral genetic variability and the phase of infection are key points for the use of different diagnostic tools. The aim of this study was to detect and genotype feline retroviruses present in naturally infected Mexican domestic cats. Detection of retroviral infections was performed by lateral flow immunochromatography and different endpoint and real-time PCR assays, designed for amplification of the LTR and/or *gag* genetic regions in 50 domestic cats with different clinical-haematological characteristics. The enFeLV sequences were detected in all the DNA samples of the cats included in the study, as well as the detection of enFeLV transcripts in 48 of the individuals. Seventeen cats were detected as positive for exFeLV by any of the tests used. In addition, the presence of FIV proviral DNA in 10 individuals was detected. There appeared to be no relationship between proviral and viral loads of enFeLV and exFeLV. The enFeLV genetic sequences were shown to be the most variable compared to exFeLV sequences, which were more conserved and related to subgroup A sequences previously reported in America. Phylogenetic analysis of the sequences of the FIV *gag* gene revealed the presence of subtype B in infected cats.

Keywords: FeLV; FIV; endogenous retroviruses; genotyping; LTR; *gag*.

## CONTENIDO

1. Introducción .....	1
1.1. Propiedades de los retrovirus felinos .....	1
1.2. Ciclo de replicación retroviral.....	4
1.3. Retrovirus endógenos.....	7
1.3.1. Virus de leucemia felina endógeno.....	10
1.4. Virus de leucemia felina exógeno.....	11
1.5. Curso de la infección por el FeLV.....	14
1.5.1. Infección progresiva.....	15
1.5.2. Infección regresiva.....	16
1.5.3. Infección abortiva.....	16
1.5.4. Infección focal (atípica).....	17
1.6. Virus de inmunodeficiencia felina.....	18
1.7. Curso de la infección por el FIV.....	19
1.7.1. Fase aguda.....	19
1.7.2. Fase subclínica.....	20
1.7.3. Fase clínica.....	20
1.8. Subtipos del FIV.....	21
1.9. Diagnóstico de los retrovirus felinos.....	22
1.9.1. Diagnóstico de la infección por el FeLV.....	22
1.9.2. Diagnóstico de la infección por el FIV.....	24
2. Justificación .....	26
3. Hipótesis .....	27
4. Objetivos.....	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos particulares.....	28
5. Materiales y métodos.....	29

5.1.	Animales de estudio y colección de muestras .....	29
5.2.	Detección de antígeno de FeLV y de anticuerpos contra FIV .....	29
5.3.	Detección de enFeLV, exFeLV y FIV por PCR .....	30
5.4.	Detección de enFeLV, exFeLV y FIV por RT-PCR .....	32
5.5.	Electroforesis horizontal en geles de agarosa .....	32
5.6.	Purificación productos de PCR a partir de geles de agarosa .....	32
5.7.	Secuenciación de productos de PCR .....	32
5.8.	Carga proviral y viral de exFeLV .....	34
5.9.	Carga proviral y viral de enFeLV .....	34
5.10.	Secuenciación masiva (NGS) .....	35
5.11.	Análisis de secuencias .....	36
6.	Resultados .....	37
6.1.	Presencia de ADN proviral y ARN viral del enFeLV .....	37
6.2.	Presencia de antígeno, ADN proviral y ARN viral del exFeLV .....	38
6.3.	Presencia de anticuerpos, ADN proviral y ARN viral del FIV .....	40
6.4.	Distancia genética y análisis de recombinación .....	42
6.5.	Análisis filogenético de enFeLV .....	43
6.6.	Análisis filogenético de exFeLV-LTR .....	44
6.7.	Análisis filogenético de exFeLV-gag .....	45
6.8.	Análisis filogenético del FIV .....	46
6.9.	Proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas .....	47
6.10.	Carga proviral y viral de exFeLV .....	47
6.11.	Carga proviral y viral de enFeLV .....	48
7.	Discusión .....	52
8.	Conclusiones .....	61
9.	Referencias .....	62
10.	Apéndices .....	81



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores diseñados para la detección de retrovirus felinos por PCR. .....	33
Cuadro 2. Características clínico - hematológicas y resultado de las pruebas diagnósticas de los gatos domésticos incluidos en este estudio.....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virión y mapa genético del virus de leucemia felina.. .....	2
Figura 2. Estructura del virión y mapa genético del virus de inmunodeficiencia felina.. .....	3
Figura 3. Ciclo de replicación de los retrovirus.. .....	6
Figura 4. Condiciones de amplificación de enFeLV por qPCR.....	35
Figura 5. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos amplificados de la región LTR de enFeLV por PCR (205 pb) .....	37
Figura 6. Signos clínicos y alteraciones hematológicas encontradas en los gatos domésticos positivos únicamente a enFeLV (n=24).....	38
Figura 7. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos amplificados de la región LTR de exFeLV por PCR (215 pb).....	39
Figura 8. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos amplificados de la región gag de FeLV por PCR anidada (562 pb).....	39
Figura 9. Signos clínicos y alteraciones hematológicas encontradas en los gatos domésticos positivos a exFeLV. ....	40

Figura 10. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos amplificados del gen <i>gag</i> del FIV por PCR anidada (458 pb).....	41
Figura 11. Signos clínicos y alteraciones hematológicas encontradas en los gatos domésticos positivos al FIV. ....	41
Figura 12. Árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas de la región LTR de enFeLV con el método de Neighbor-joining en el programa Geneious 11.1.4.....	43
Figura 13. Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de la región LTR de exFeLV con el método de Neighbor-joining en el programa Geneious 11.1.4.....	44
Figura 14. Árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas del gen <i>gag</i> del FeLV con el método de Neighbor-joining en el programa Geneious 11.1.4.....	45
Figura 15. Árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas del gen <i>gag</i> del FIV con el método de Neighbor-joining en Geneious 11.1.4. ....	46
Figura 16. Carga proviral y viral expresada en número de copias por muestra de ocho gatos positivos a exFeLV por qPCR.....	48
Figura 17. A) Curvas obtenidas de la amplificación de las diluciones seriadas (base 10) del control positivo (concentración inicial: 1 ng/ $\mu$ L). B) Curva estándar con valores de E, R <sup>2</sup> , Slope e intersección. ....	49
Figura 18. Niveles de carga proviral de enFeLV expresado en número de copias/ $\mu$ L en las muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica. ....	50
Figura 19. Niveles de carga viral de enFeLV expresado en número de copias/ $\mu$ L en las muestras de ADNc obtenido a partir del ARN de plasma sanguíneo. ....	50
Figura 20. Gráfica que muestra la ausencia de correlación entre las cargas provirales y virales del enFeLV en los gatos domésticos del estudio (n= 50). ....	51

# 1. INTRODUCCIÓN

Los retrovirus (familia *Retroviridae*) son virus que se caracterizan por integrar su información genética de manera permanente en el genoma de las células que infectan, como parte esencial de su ciclo de replicación. Las enzimas transcriptasa inversa e integrasa permiten la conversión de ARN viral monocatenario en ADN bicatenario, seguido de la integración del ADN viral en el genoma nuclear de la célula infectada para formar el material genético denominado provirus. Como inserción cromosómica, el provirus se encuentra integrado en la célula infectada y perdura mientras lo haga dicha célula o su progenie. Cuando se produce la integración en una célula germinal, el provirus resultante se puede heredar a la progenie como un alelo del hospedador. Este provirus se conoce entonces como retrovirus endógeno (ERV) (Gifford *et al.*, 2018). Atendiendo al mecanismo de transmisión, los retrovirus pueden categorizarse como exógenos y endógenos. Los retrovirus exógenos se transmiten horizontalmente, como sucede con muchos agentes infecciosos; mientras que los retrovirus endógenos son elementos virales integrados en el genoma del hospedador que se heredan a la descendencia, comprenden de 5-10 % del genoma de los mamíferos y parecen tener un papel importante en la regulación de la expresión génica (Coffin, 2004).

## 1.1. *Propiedades de los retrovirus felinos*

Los viriones tienen un diámetro de alrededor de 100 nm (Ryu, 2017). El genoma viral está conformado por dos copias de ARN monocatenario positivo y tiene una longitud de 8 - 10 Kb (Rabson & Graves, 1997). Contiene tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* o de antígeno asociado al grupo, codifica las principales poliproteínas estructurales: las proteínas de matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). El gen *pol* codifica una proteasa (PR) responsable de facilitar la maduración de la proteína viral, la transcriptasa inversa (RT) y la enzima

integrasa (IN). El gen *env* codifica las glicoproteínas de superficie (SU) y de transmembrana (TM) (Chiu *et al.*, 2018).

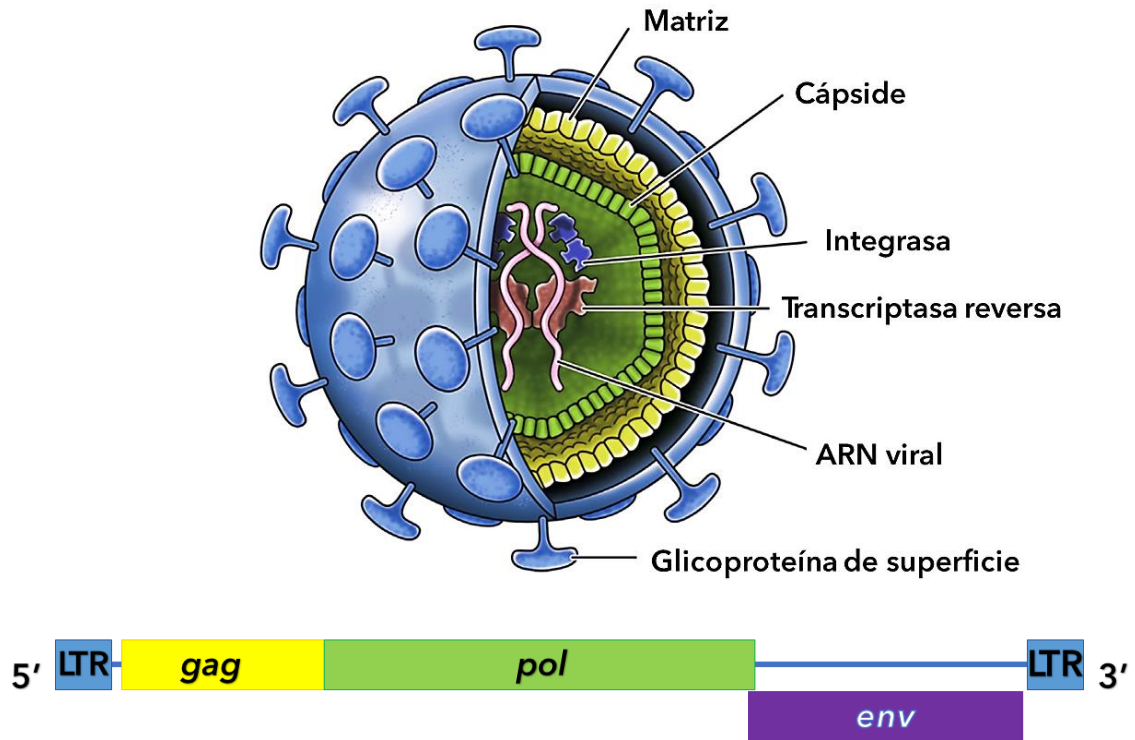


Figura 1. Estructura del virión y mapa genético del virus de leucemia felina. Modificado de Sykes & Hartmann, 2014.

Adicionalmente, el genoma del virus de inmunodeficiencia felina cuenta con tres genes accesorios: *vif*, que codifica una proteína que promueve la degradación de las proteínas APOBEC3 del hospedador a través de la vía ubiquitina-proteasoma, evitando la hipermutación del genoma generada por este factor de restricción (Yoshikawa *et al.*, 2017); *rev*, que expresa una proteína reguladora postranscripcional que participa en la exportación de los ARNm virales del núcleo al citoplasma (González & Affranchino, 2018); y *orf-A*, que se ha involucrado en la disminución de la expresión del receptor viral (CD134) en la superficie de los linfocitos, lo que promueve la diseminación viral al minimizar las interacciones del receptor con las partículas virales en gemación (Hong *et al.*, 2010).

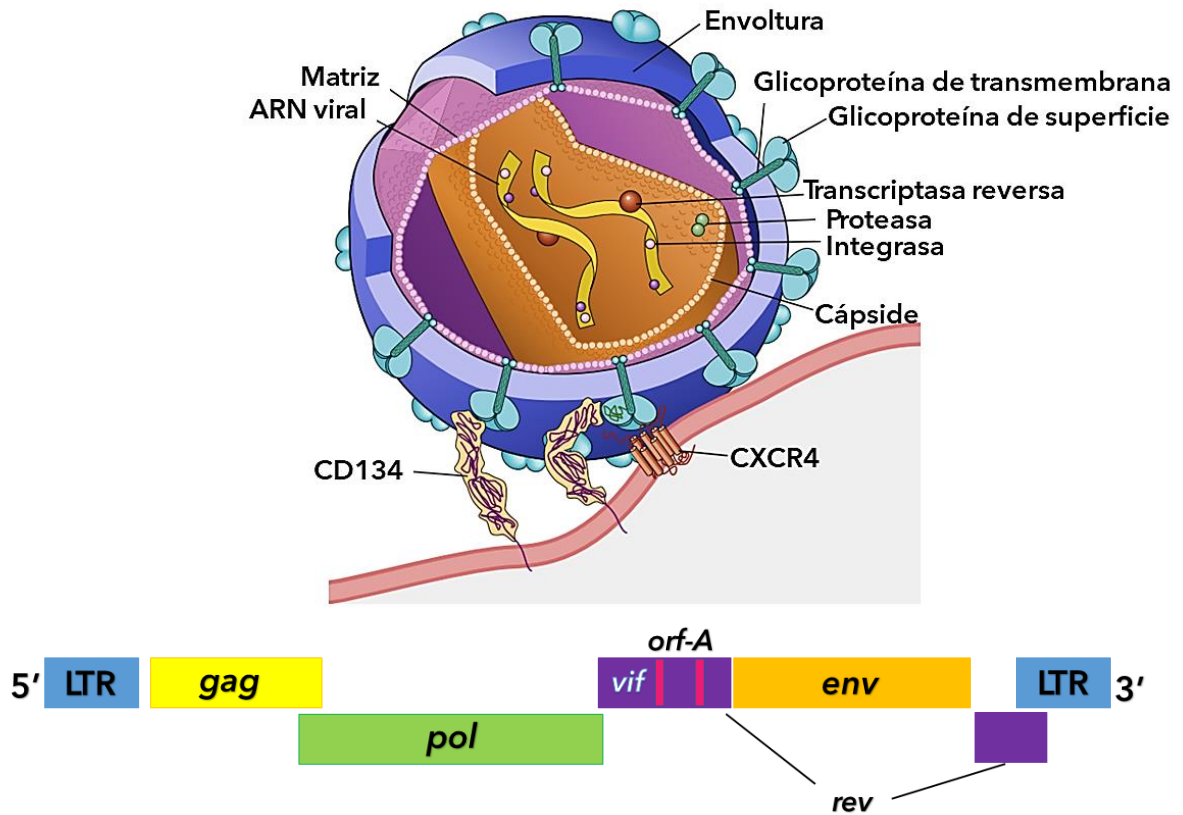


Figura 2. Estructura del virión y mapa genético del virus de inmunodeficiencia felina. Se muestra la unión del virión con la superficie de un linfocito T CD4+. Modificado de Sykes, 2014.

En su forma proviral, el genoma se encuentra flanqueado por secuencias reguladoras no traducibles denominadas *long terminal repeats* (LTR), las cuales se conforman de las regiones U3, R y U5. La región U3 contiene el promotor viral y sitios de unión a factores de transcripción que incrementan el nivel de transcripción del provirus. La región R incluye el sitio de iniciación del ARNm. La región U5 está involucrada en la poliadenilación eficiente de los ARNm virales. Los elementos de control del virus, así como las regiones reguladoras potenciadoras, se ubican dentro de las regiones U3 y R; e interactúan con proteínas celulares y virales. Estas interacciones, son cruciales para controlar la expresión viral en las células (Böhnlein *et al.*, 1989; Ryu, 2017).

## **1.2. Ciclo de replicación retroviral**

El ciclo de replicación de los retrovirus inicia con la unión de la glicoproteína de superficie de la envoltura viral con el receptor presente en la superficie celular. Esta interacción es altamente específica, lo que define tanto la susceptibilidad de la especie hospedadora como el tropismo celular (Chameettachal *et al.*, 2022). Después de la unión del virus, ocurre la fusión de la membrana de la célula hospedadora con el virus, lo que facilita la liberación de la cápside viral en el citoplasma de la célula. Dentro de la cápside viral se encuentra el genoma ARN diploide, las enzimas transcriptasa inversa e integrasa y las proteínas Gag asociadas (Muriaux *et al.*, 2001). Después de la penetración de la cápside viral en el citoplasma, la enzima transcriptasa inversa sintetiza una copia de ADN a partir del genoma de ARN monocatenario de sentido positivo del virus (Dharan *et al.*, 2020). Una vez que ocurre el proceso de retrotranscripción, el provirus se transloca al núcleo, donde la enzima integrasa lleva a cabo la integración de la copia lineal del provirus en el genoma de la célula hospedadora. La integración en el ADN cromosómico del hospedador no es completamente aleatoria, ya que tiende a ocurrir en regiones de cromatina abierta (áreas del cromosoma que experimentan transcripción activa). Una vez que el provirus se integra en el genoma nuclear, puede permanecer latente (transcripcionalmente inactivo) o puede replicarse y transcribirse mediante mecanismos dependientes de las ADN y ARN polimerasas celulares (Desfarges & Ciuffi, 2010). La transcripción del provirus integrado da como resultado tanto moléculas de ARN viral de longitud completa (ARN genómico) como moléculas de ARNm que codifican la información para las síntesis de las proteínas virales en los ribosomas (Chameettachal *et al.*, 2022). Las proteínas de Env (SU y TM) son glicosiladas y escindidas en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi, para posteriormente transportarse hacia la membrana plasmática (Murakami, 2012). El ARN viral genómico completo se empaqueta con proteínas Gag para formar la estructura central del virus (Freed, 1998). El ensamble de los viriones ocurre en la

membrana plasmática. Los viriones recién formados se liberan de la superficie celular mediante gemación a través de microdominios de membrana especializados conocidos como balsas lipídicas. Durante la gemación, los viriones se recubren con una capa externa de moléculas lipídicas derivadas de la membrana plasmática que contienen las glicoproteínas de la envoltura (MacLachlan & Dubovi, 2017a; Pedersen *et al.*, 2011).

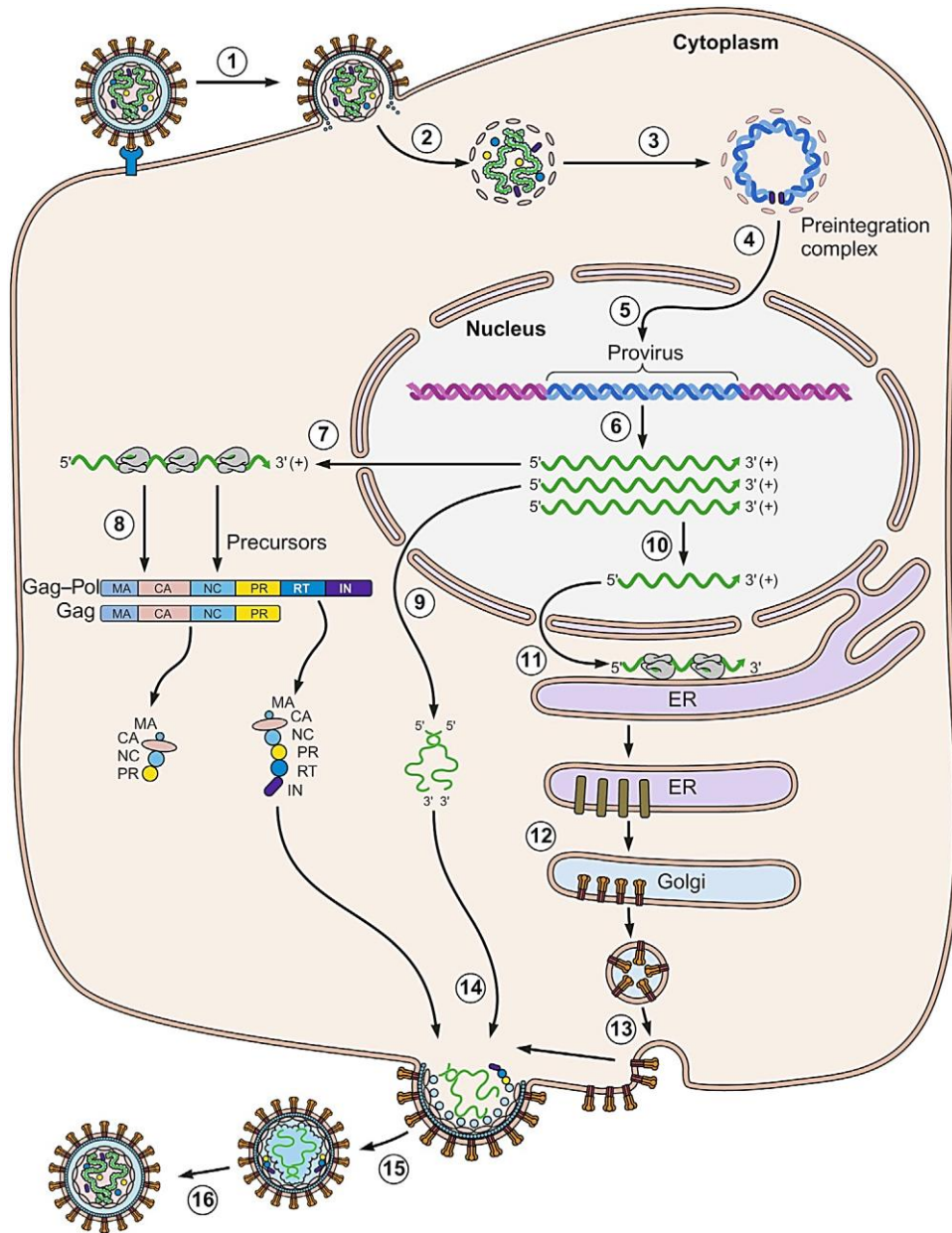


Figura 3. Ciclo de replicación de los retrovirus. 1) El virus se adhiere a los receptores celulares a través de las glicoproteínas de la envoltura para que ocurra la fusión con la membrana celular. 2) Internalización y descapsidación. 3) El genoma de ssRNA (+) se copia en una molécula de dsDNA por la transcriptasa inversa. 4) El complejo de preintegración se dirige al núcleo. 5) Ingreso al núcleo del dsDNA viral que se integra en el genoma de la célula por la integrasa viral (provirus). 6) Transcripción del provirus por ARN polimerasa II produce los ARNm y virales. 7 y 8) Exportación nuclear de los ARNm al citoplasma para su traducción en los ribosomas (poliproteínas Gag-Pol). 9) Exportación del genoma (ARN viral) hacia citoplasma. 10 y 11) Exportación nuclear de los ARNm al retículo endoplásmico rugoso para su traducción en los ribosomas asociados (poliproteínas Env). 12) Procesamiento postraduccion de las glicoproteínas de envoltura en retículo endoplásmico y aparato de Golgi. 13 y 14) Transporte vesicular de glicoproteínas de envoltura hacia membrana celular y ensamble de los viriones. 15) Liberación de los viriones a través de la membrana plasmática por gemación. 16) Maduración de los viriones por el procesamiento proteolítico de las poliproteínas precursoras por la proteasa viral (MacLachlan & Dubovi, 2017b).



### **1.3. *Retrovirus endógenos***

Los retrovirus generalmente infectan los tejidos somáticos; sin embargo, a medida que un retrovirus se propaga en una población determinada, existe la posibilidad de que la integración pueda ocurrir en los precursores o en las células de la línea germinal, lo que resulta en la producción de gametos del hospedador que llevan provirus como nuevas inserciones. La mayoría de los organismos eucariotas tienen ADN retroviral en sus genomas como elementos heredados de manera estable. Al ingresar al grupo de genes del hospedador de esta manera, este ADN proviral se conoce como retrovirus endógeno (ERV) y puede perderse o fijarse dependiendo de la deriva genética aleatoria y de la selección natural (Fan, 2009; Gifford & Tristem, 2003). Por lo tanto, los ERVs son loci genéticos cuyos últimos orígenes se remontan a los retrovirus de replicación exógena, independientemente de si conservan o no la capacidad de expresar viriones infecciosos. De hecho, la gran mayoría de los ERVs son defectuosos para la expresión génica viral como consecuencia de mutaciones acumuladas a lo largo de miles o millones de años de evolución de los vertebrados (Johnson, 2019).

Los ERVs son considerados como "fósiles genómicos" de sus contrapartes infecciosas, por lo que pueden proporcionar evidencia de retrovirus exógenos que previamente infectaron a una especie (Halo *et al.*, 2019). El impacto a largo plazo de los retrovirus en la evolución de los vertebrados es doble: primero, al igual que con otros virus, los retrovirus actúan como agentes de selección, impulsando la evolución de los genes del hospedador que bloquean la infección viral o que mitigan la patogénesis, y segundo, a través del fenómeno de la endogenización, los retrovirus aportan una gran cantidad de información genética a los genomas de los hospedadores, incluidos genes únicos que codifican proteínas y elementos reguladores (Johnson, 2019). De igual manera, se cree que los ERVs desempeñan un papel importante en las infecciones

retrovirales, pudiendo favorecer la infección por retrovirus exógenos (Rasmussen, 1997; Tandon *et al.*, 2008).

Los ERVs pueden ir desde restos de provirus altamente fragmentados hasta provirus completos. Incluso cuando permanecen porciones sustanciales de los genes *gag*, *pol* y *env*, a menudo no generan productos funcionales debido a la acumulación de sustituciones, deleciones e inserciones. Las LTR son las secuencias más variables en el genoma retroviral, y hay muy poca similitud entre las LTR de retrovirus de diferentes géneros (Johnson, 2019).

Aunque se sabe que los ERVs parcialmente inactivados pueden representar un riesgo potencial para el hospedador debido a la generación de nuevas variantes virales a través de la recombinación viral, también es posible que los ERVs adquieran una función biológica que favorezca al hospedador, por lo que están relacionados con la evolución de las especies (Kawasaki & Nishigaki, 2018).

Los ERVs representan aproximadamente del 6% al 10% del genoma en gatos, humanos y ratones. La mayoría de los ERVs están inactivos, pero se ha reportado la presencia de ERVs competentes para la replicación en varias especies, incluidos los ratones, los koalas, los cerdos y los gatos (Anai *et al.*, 2012; Kuse *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2020).

De acuerdo con su equivalencia con las variantes exógenas, los ERVs se agrupan en tres clases: clase I (ERV1, *Gammaretrovirus* y *Epsilonretrovirus*), clase II (ERV2, *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus* y *Lentivirus*) y clase III (ERV3 y *Spumavirus*). Estas clases se pueden dividir adicionalmente en familias o linajes. La nomenclatura de estos grupos de ERVs es variada y depende en gran medida de las especies (Chong *et al.*, 2014). Además, es muy probable que la clasificación de los ERVs requiera la adición de nuevos grupos para representar linajes extintos de retrovirus exógenos (Gifford *et al.*, 2018). Es importante mencionar que en esta clasificación, las categorías de clase y de familia no tienen una connotación

equivalente a la de los taxones empleados en la taxonomía de las especies (Blomberg *et al.*, 2009).

Los gatos domésticos albergan una amplia diversidad de ERVs, con predominancia de secuencias relacionadas con *Gammaretrovirus* (clase I). Dentro de esta clase se incluye a los ERV-DC, a RD-114 y al virus de leucemia felina endógeno. No obstante, también se han encontrado ERVs de las clases II y III (Mata *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2013).

Los ERVs de gatos domésticos (ERV-DC) son gammaretrovirus endógenos que se clasifican dentro de tres genotipos: genotipo I (ERV-DC1, -DC2, -DC3, -DC4, -DC8, -DC14, -DC17 y -DC19), genotipo II (ERV-DC7 y -DC16) y genotipo III (ERV-DC6, -DC10 y -DC18). ERV-DC10, -DC14 y -DC18 son considerados como provirus infecciosos (Anai *et al.*, 2012; Kuse *et al.*, 2016). Los ERV-DC tienen una estructura genómica simple de aproximadamente 8.8 kpb que codifica una poliproteína Gag-Pol y una proteína Env (Kawasaki & Nishigaki, 2018).

En algunos casos, las secuencias derivadas de ERVs han adquirido actividades relacionadas con el mantenimiento de la fisiología del hospedador, lo que sugiere un rol importante en la evolución de las especies, dicho fenómeno es conocido como "domesticación de ERVs" (Kawasaki & Nishigaki, 2018). La domesticación de los ERVs puede ejemplificarse a través de algunos factores de restricción retroviral (Malfavon-Borja & Feschotte, 2015).

Refrex-1, es un factor de restricción antirretroviral codificado por el gen *env* de ERV-DC7 y -DC16 que interfiere con la infección por ERV-DC del genotipo I y por el virus de leucemia felina subgrupo D causando interferencia extracelular del receptor (Ito *et al.*, 2013). Se ha descrito que los loci ERV-DC7 y -DC16 están fijados en el genoma del gato. Por lo tanto, la actividad antirretroviral de Refrex-1 puede haber contribuido a la supervivencia del hospedador durante la evolución felina (Kawasaki & Nishigaki, 2018).

Por otro lado, la mayoría de los provirus ERV-DC poseen marcos de lectura abiertos (ORF), por lo que debe considerarse la posibilidad de que otros provirus ERV-DC hayan adquirido nuevas funciones biológicas. El caso de ERV-DC6 es interesante porque conserva un ORF intacto en el gen *env*, lo que hace factible que ERV-DC6 tenga alguna función como gen del hospedador (Kawasaki & Nishigaki, 2018).

RD-114 es un ERV quimérico compuesto por los genes *gag-pol* de ERV-DC y el gen *env* de un retrovirus endógeno de babuino (BaEV) (van der Kuyl *et al.*, 1999). Otros estudios muestran que el BaEV también es un virus quimérico compuesto por los genes *gag-pol* de un retrovirus endógeno de babuino amarillo (PcEV) y el gen *env* de un retrovirus endógeno de simio (SERV) (Mang *et al.*, 1999; van der Kuyl *et al.*, 1997). Hasta ahora se sabe que al menos cuatro retrovirus distintos están involucrados en la generación de RD-114 a través de dos eventos de recombinación: la transducción de *env* de SERV en PcEV y la transducción de *env* de BaEV en ERV-DC. Estos datos sugieren que se han producido múltiples transmisiones retrovirales entre los monos del viejo mundo y los gatos, dando lugar a varios eventos de recombinación viral (Kim *et al.*, 2004).

### **1.3.1. Virus de leucemia felina endógeno**

El virus de leucemia felina endógeno (enFeLV) es un provirus de replicación defectuosa que se encuentra en especies del género *Felis*, incluyendo al gato doméstico (*Felis silvestris catus*) (Roca *et al.*, 2004). Es posible que haya ingresado en el genoma antes de la especiación del género *Felis* (Polani *et al.*, 2010). A pesar de que se cree que los enFeLV no inducen de manera directa la presentación de enfermedad en el hospedador, son muy relevantes para la biología del FeLV exógeno en los gatos domésticos. El FeLV endógeno se expresa en muchos tipos de tejidos y está asociado con la infección del FeLV exógeno (Krunic *et al.*, 2015; McDougall *et al.*, 1994; Tandon *et al.*, 2008). El sitio de integración del enFeLV,

así como el número de copias presentes, varían entre individuos y se ha estimado en un rango de 6-12 copias por genoma haploide (Polani *et al.*, 2010). Se ha asociado tanto el incremento, como la disminución del número de copias provirales del enFeLV con una mayor carga viral de FeLV (Powers *et al.*, 2018; Tandon *et al.*, 2008).

Se han detectado secuencias de longitud completa de enFeLV genómicamente intactos en el genoma de gatos domésticos, pero no en los de especies relacionadas en el género *Felis* (Roca *et al.*, 2004; 2005), lo que indica que pueden haber ingresado recientemente en la línea germinal y que el proceso de endogenización puede estar en curso (Stewart *et al.*, 2011; Willett & Hosie, 2013).

Las versiones endógenas y exógenas del FeLV son genéticamente similares un 86% aproximadamente. Las principales diferencias entre enFeLV y exFeLV se encuentran en los genes *gag* y *env*, así como en las regiones únicas 3' de la LTR. El enFeLV generalmente presenta inserciones y deleciones (INDELs), cambios en marcos de lectura y mutaciones sin sentido (Chiu *et al.*, 2018).

#### **1.4. Virus de leucemia felina exógeno**

El virus de leucemia felina (FeLV) fue descubierto en gatos que desarrollaron linfomas (Jarrett *et al.*, 1964) y posteriormente fue purificado y caracterizado morfológicamente a partir del plasma de gatos infectados experimentalmente (Kawakami *et al.*, 1967). Estos estudios fueron pioneros en la investigación sobre el FeLV e iniciaron el campo de la retrovirología felina (Willett & Hosie, 2013).

El FeLV en su forma exógena (exFeLV) se encuentra taxonómicamente en el orden *Ortervirales*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Gammaretrovirus* (Coffin *et al.*, 2021). Este retrovirus infecta principalmente a gatos domésticos, aunque la infección también ha sido reportada en felinos silvestres como el gato montés euroasiático (*Felis silvestris silvestris*) (Daniels *et*

*al.*, 1999; Fromont *et al.*, 2000; Leutenegger *et al.*, 1999), el guepardo o chita (*Acinonyx jubatus*) (Marker *et al.*, 2003), la pantera de Florida (*Puma concolor coryi*) (Brown *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2019; Cunningham *et al.*, 2008), el lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Meli *et al.*, 2009, 2010), el leopardo (*Panthera pardus*) (Tangsudjai *et al.*, 2010), el jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) (Filoni *et al.*, 2017), el ocelote (*Leopardus pardalis*) y el tigrillo oncilla o leopardo tigre (*Leopardus tigrinus*) (Guimaraes *et al.*, 2009).

La infección por el FeLV se asocia con múltiples síndromes fatales en gatos, que incluyen trastornos en la médula ósea, neoplasias hematológicas (leucemia y linfoma) e inmunosupresión (Jarrett, Martin, *et al.*, 1964; Mackey *et al.*, 1975; Ogilvie *et al.*, 1988; Pare *et al.*, 2022; Quigley *et al.*, 2000; Sykes & Hartmann, 2014). El exFeLV se transmite horizontalmente y se divide en subgrupos con base en su relación genética y funcional (Miyazawa, 2002).

La transmisión de exFeLV ocurre principalmente a través de la exposición oronasal con la saliva y las secreciones nasales, por ejemplo, al acicalarse mutuamente y compartir platos de comida y agua. El virus también se elimina a través de las heces y la orina de los animales infectados. Otras vías de transmisión consideradas de menor relevancia son: a través de mordeduras, transfusiones de sangre, la lactancia y posiblemente por pulgas (Cattori *et al.*, 2009; Gomes-Keller *et al.*, 2009; Sykes & Hartmann, 2014; Vobis *et al.*, 2003).

El subgrupo A del FeLV (FeLV-A) es el que se describe con mayor frecuencia (Jarrett *et al.*, 1978; Miyazawa, 2002). Aunque se ha informado que el FeLV-A es menos patógeno que otros subgrupos de FeLV, se ha asociado con anemia macrocítica, inmunosupresión y linfoma (Hartmann, 2012; Willett & Hosie, 2013). FeLV-A utiliza como receptor al transportador de tiamina THTR1 (Mendoza *et al.*, 2006).

Durante la infección por FeLV-A, la recombinación ocurre a menudo con el enFeLV en la región genética *env*, lo que resulta en la generación del subtipo

FeLV-B (Overbaugh *et al.*, 1988; Stewart *et al.*, 1986). El FeLV-B se asocia con el desarrollo de leucemia y linfoma (Bolin & Levy, 2011). Para el ingreso a la célula, el FeLV-B utiliza como receptores a los transportadores de fosfatos inorgánicos (PiT-1 y PiT-2) (Takeuchi *et al.*, 1992; Willett & Hosie, 2013). Se considera que la transmisión horizontal del FeLV-B es rara, a menos que ocurra de manera conjunta con el FeLV-A como un virus auxiliar (Chiu *et al.*, 2019).

El FeLV-C surge de mutaciones *de novo* en el gen *env* del FeLV-A y se ha asociado con el desarrollo de anemia aplásica. El FeLV-C utiliza el transportador de hem FLVCR1 como receptor (Quigley *et al.*, 2000; Tailor *et al.*, 1999). Aunque el receptor FLVCR1 se expresa ampliamente en los tejidos hematopoyéticos, su función en la exportación de hem citoplasmático parece ser esencial para el desarrollo de progenitores eritroides, protegiéndolos de la toxicidad del hem (Quigley *et al.*, 2004). La perturbación de esta función esencial de FLVCR1 en las células progenitoras eritroides da como resultado la pérdida selectiva de unidades formadoras de colonias-eritroides (CFU-E) y el desarrollo de una anemia severa no regenerativa (Dunham & Graham, 2008).

El FeLV-D es un subgrupo que se originó de la recombinación de las regiones genéticas *gag-pol* de FeLV y el gen *env* de ERV-DC del genotipo I. Este subgrupo ha sido asociado con la generación de neoplasias hematológicas, que incluyen al linfoma y la leucemia (Kawasaki & Nishigaki, 2018). El FeLV-D utiliza un receptor diferente al de los otros subgrupos, sin embargo, todavía no ha sido descrito (Anai *et al.*, 2012).

El FeLV-E es un subgrupo descrito recientemente, que fue aislado a partir de un macho castrado de un año que presentaba lesión por mordedura y estomatitis. Aunque este subgrupo es genéticamente similar al FeLV-A, presenta sustituciones e inserciones en el gen *env*. El receptor utilizado por este subgrupo es distinto a los previamente descritos (THTR1, PiT-1/PiT-2, y FLVCR1), sin embargo, aún no ha sido identificado (Chiu *et al.*, 2018; Miyake *et al.*, 2016).

El FeLV-T es un subgrupo que presenta tropismo por linfocitos T, induciendo un trastorno inmunosupresor fatal descrito como FeLV-FAIDS (síndrome de inmunodeficiencia adquirida felina). Este subgrupo es una variante del FeLV-A que presenta inserciones y deleciones en la región *env* (Chiu *et al.*, 2018). El marcado tropismo de linfocitos T de FeLV-T se debe a que para ingresar a las células, además del receptor (Pit1) necesita de un correceptor denominado FeLIX, el cual es expresado en linfocitos T (Anderson, 2000; Dunham & Graham, 2008). FeLIX es una proteína de envoltura truncada producida constitutivamente por enFeLV, que comparte más del 90% de identidad con la región *env* del FeLV-B (Anderson, 2000).

### ***1.5. Curso de la infección por el FeLV***

La infección por el FeLV puede causar una amplia variedad de signos clínicos, los cuales generalmente se asocian con desórdenes hematológicos, entre los que se encuentran citopenias y neoplasias como la leucemia y el linfoma que con frecuencia conducen a la muerte de los animales (Gleich & Hartmann, 2009). Se ha propuesto que aproximadamente un tercio de las muertes causadas por neoplasias en gatos son consecuencia de la infección por el FeLV y que la presentación de linfoma es el segundo signo clínico más frecuente asociado a la infección, después de la anemia (Hartmann, 2011). Clínicamente han sido descritas tres formas de linfoma asociadas con la infección por el FeLV: tímico, una neoplasia del mediastino anterior, conformada por células de linaje T en diferentes etapas de madurez; alimentario, en el que la neoplasia involucra al tracto gastrointestinal; y multicéntrico, en el que la neoplasia afecta a muchos órganos, pero generalmente excluye el timo (Cotter, 1992).

Después de la exposición con el virus, este llega al tejido linfoide regional, donde infecta principalmente a linfocitos y monocitos. Si el virus llega a la médula ósea, es capaz de infectar a células precursoras, neutrófilos y plaquetas.



Posteriormente, las mucosas y los tejidos glandulares se infectan (tracto gastrointestinal, glándulas salivales), por lo que el virus se elimina principalmente por la saliva, pero también por las heces, la orina y la leche (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020).

El curso de la infección por el FeLV está influenciado por diferentes factores, tales como la inmunosupresión, las coinfecciones o el cambio en el entorno (factores estresantes), mismos que pueden alterar la presentación y el pronóstico de la infección. Estos cursos se han denominado como: infección progresiva, infección regresiva, infección abortiva e infección focal o atípica y pueden determinarse mediante el seguimiento con diferentes pruebas diagnósticas (Hofmann-Lehmann & Hartmann, 2020).

### ***1.5.1. Infección progresiva***

En la infección progresiva por el FeLV, se produce una replicación viral extensa, inicialmente en los tejidos linfoides y posteriormente en la médula ósea y en los tejidos epiteliales glandulares y mucosos. Esta infección se asocia con la excreción de virus infecciosos y la respuesta inmune frente al virus es insuficiente, con niveles de anticuerpos neutralizantes bajos o indetectables. La infección progresiva se caracteriza por la presentación de viremia persistente y la excreción viral. Los gatos que cursan con esta infección generalmente desarrollan enfermedades asociadas con el FeLV que pueden ser fatales. En sitios donde se alojan múltiples gatos y no existe un control de la infección entre el 30 y el 40 % de los gatos se volverán persistentemente virémicos (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020; Lutz *et al.*, 2009; Sykes & Hartmann, 2014).

### ***1.5.2. Infección regresiva***

Se ha reportado que en entornos con varios gatos que excretan el FeLV (alta presión infecciosa), 30-40% de los gatos desarrollan una infección regresiva que se caracteriza por la presentación de viremia transitoria (Lutz *et al.*, 2009). En la infección regresiva se monta una adecuada respuesta inmunitaria, por lo que la replicación viral y la viremia se contienen antes (o poco después) del momento de la infección de la médula ósea (Hartmann, 2012). Estos gatos nunca desarrollan o eventualmente eliminan la viremia, generalmente dentro de las 3 a 6 semanas posteriores a la exposición al virus, por lo que es transitoria (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020). Aunque el ADN proviral permanece integrado, no existe una producción activa del virus; por lo tanto, estos gatos tienen resultados negativos en las pruebas de rutina que detectan el antígeno viral (Hartmann, 2012). Los gatos con infección regresiva no eliminan el virus infeccioso en la saliva, pero el ADN proviral aunque se presente en bajos niveles, puede transmitirse a través de transfusiones sanguíneas (Nesina *et al.*, 2015). La infección puede reactivarse y la viremia puede reaparecer en cualquier momento, especialmente seguida de episodios de inmunosupresión o durante la gestación, lo que trae como consecuencia la eliminación del virus en la saliva y la posibilidad de desarrollar la enfermedad asociada al FeLV (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020; Rojko *et al.*, 1982).

### ***1.5.3. Infección abortiva***

Las infecciones abortivas ocurren en aproximadamente 20-30% de los gatos infectados (Lutz *et al.*, 2009). Es probable que la infección abortiva sea causada por la exposición a dosis bajas del FeLV, en donde la replicación viral se limita inicialmente en el tejido linfoide local, como en la orofaringe, mediante una respuesta inmune humoral y mediada por células efícas; por lo que estos gatos

nunca se vuelven virémicos (Madewell & Jarrett, 1983; Willett & Hosie, 2013). Estos animales montan una respuesta inmune muy eficaz que los protege contra nuevos desafíos virales durante varios años. Por lo tanto, las infecciones abortivas se caracterizan por resultados negativos en las pruebas de aislamiento viral, así como en la detección de antígenos, de ARN viral y ADN proviral; siendo la presencia de anticuerpos contra el FeLV la única señal de exposición al virus, por lo que, los gatos que cursan con infecciones abortivas tienen la misma esperanza de vida que aquellos que nunca han estado expuestos al FeLV (Boenzli *et al.*, 2014; Hofmann-Lehmann & Hartmann, 2020; Major *et al.*, 2010).

#### ***1.5.4. Infección focal (atípica)***

Las infecciones focales, también llamadas infecciones atípicas, se han reportado hasta en el 10% de los gatos infectados experimentalmente. En estos gatos, la infección por el FeLV está restringida a ciertos tejidos, como la glándula mamaria, la vejiga, los ojos, el bazo, los linfonodos o el intestino delgado, en los que se presenta replicación viral local persistente (Hayes *et al.*, 1989; Hofmann-Lehmann & Hartmann, 2020). En esta infección, la producción del antígeno viral y su liberación en la sangre puede ser intermitente o en niveles muy bajos. Por lo tanto, estos gatos pueden tener resultados positivos débiles o discordantes en las pruebas para la detección de antígeno, o pueden alternar resultados positivos y negativos. Algunos de estos gatos dan positivo para el antígeno en sangre, pero resultan negativos en las pruebas de aislamiento del virus o incluso en la PCR de provirus, lo que también dependerá de la sensibilidad del ensayo empleado (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020; Miyazawa & Jarrett, 1997).

## **1.6. *Virus de inmunodeficiencia felina***

El virus de inmunodeficiencia felina (FIV) fue descrito por primera vez en gatos que presentaban marcada baja de peso y tenían una o más infecciones crónicas, como gingivitis, periodontitis, dermatitis, infecciones de oído, rinitis crónica, conjuntivitis crónica o diarrea (Pedersen *et al.*, 1987). Taxonómicamente se encuentra en el orden *Ortervirales*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* (Coffin *et al.*, 2021); e infecta a especies de la familia *Hyaenidae* y *Felidae* (Troyer *et al.*, 2005). Debido a que existen similitudes genéticas, estructurales y de patogenia con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el FIV es un modelo útil para en estudios terapéuticos y de profilaxis en la infección por el HIV (Elder *et al.*, 2010).

La transmisión del FIV ocurre principalmente a través de heridas causadas por mordeduras, por las que ingresa saliva que contiene al virus. La infección también puede ocurrir de forma iatrogénica a través de la inoculación con sangre o saliva infectada, como por ejemplo a través de transfusiones de sangre, esterilización inadecuada de equipos dentales y quirúrgicos, así como por la utilización de agujas contaminadas. Los gatitos también pueden adquirir el FIV verticalmente de sus madres, ya sea antes del nacimiento (es decir, en el útero) o después del nacimiento (a través de leche de madres infectadas y/o flujo vaginal), aunque esta parece ser una vía de transmisión de menor relevancia (Burkhard & Dean, 2003; Sykes, 2014; Westman *et al.*, 2022).

El FIV infecta principalmente a los linfocitos T CD4+ utilizando como receptor primario a la glicoproteína de transmembrana CD134 (OX40), que participa en la activación de células T, así como molécula coestimuladora (Shimojima *et al.*, 2004); y al receptor de quimiocinas CXCR4 como co-receptor (Willett & Hosie, 2008). El heparán sulfato proteoglicano (HSPG) también ha sido descrito como un posible receptor involucrado en el ingreso del FIV a las células (De Parseval & Elder, 2001; Hu *et al.*, 2011). El FIV también puede infectar a las células T CD8+,

los linfocitos B, los macrófagos, las células dendríticas, la microglía y los astrocitos (Brown *et al.*, 1991; Elder *et al.*, 2010; Frey *et al.*, 2001; Meeker & Hudson, 2017).

## **1.7. Curso de la infección por el FIV**

Existen tres fases de la infección por el FIV: aguda (inicial), subclínica y clínica (terminal). No todas las fases se reconocen en los gatos infectados naturalmente, lo que se debe principalmente a que los tutores de los gatos infectados con frecuencia no notan los primeros signos (Little *et al.*, 2020).

### **1.7.1. Fase aguda**

El virus se replica inicialmente en los tejidos linfoides y hay altas concentraciones de virus en la sangre a partir de las dos semanas posteriores a la infección, alcanzado el pico de viremia entre las 8 a 12 semanas después de la infección, cuando el virus se disemina por todo el organismo (Taniwaki *et al.*, 2013). Durante esta etapa inicial o fase aguda, los animales pueden presentar signos clínicos de leves a moderados, como fiebre, linfadenopatía generalizada transitoria, anorexia y letargo (Callanan *et al.*, 1992). Linfocitos T citotóxicos (CD8+) específicos contra el virus pueden detectarse desde la segunda semana post-infección, previo a la seroconversión (Beatty *et al.*, 1996). De dos a ocho semanas después de la infección, es posible identificar anticuerpos contra las proteínas SU y TM del gen *env*, y hacia las proteínas MA y CA del gen *gag* (Lecollinet & Richardson, 2008; Taniwaki *et al.*, 2013).

### **1.7.2. Fase subclínica**

A pesar del desarrollo de una respuesta inmune celular y humoral, los animales son incapaces de eliminar el virus, lo que conduce al establecimiento de una infección persistente por el FIV. En esta fase subclínica, los gatos permanecen infectados sin presentar signos clínicos, a menudo durante años o incluso de por vida. En esta etapa la replicación viral continúa en niveles bajos con una disminución lenta y progresiva en el número de células T CD4+, inversión en la proporción de células T CD4+:CD8+ y en algunos gatos, hiperglobulinemia que resulta de la hiperactivación de las células B (Miró *et al.*, 2007; Sykes, 2014; Taniwaki *et al.*, 2013).

### **1.7.3. Fase clínica**

Esta fase también es conocida como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) felino debido a su similitud con el causado por el HIV (Hartmann, 2012) y se caracteriza por una severa inmunosupresión con consecuente reducción de los anticuerpos circulantes, lo que permite el aumento de la carga viral y el desarrollo de enfermedades que son causadas por infecciones crónicas oportunistas o secundarias, neoplasias y trastornos neurológicos. A pesar de la inmunodeficiencia progresiva, el curso de la enfermedad depende de la interacción virus-hospedador, lo que explica porque no todos animales infectados desarrollen la fase terminal (Hartmann, 2011; Sykes, 2014; Taniwaki *et al.*, 2013).

### **1.8. Subtipos del FIV**

El FIV se clasifica en subtipos (A - F) con base en la divergencia de la región genética *env*, siendo la distancia genética entre los diferentes subtipos superior al 17% (Frankenfeld *et al.*, 2019). El subtipo A ha sido descrito en Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Sudáfrica y en el noroeste de Europa. El subtipo B se ha encontrado en Estados Unidos, en el centro y sur de Europa, Brasil y Japón. El subtipo C ha sido identificado en Canadá, Nueva Zelanda y en el sureste de Asia. El subtipo D se ha descrito en Japón y Vietnam. Los subtipos E y F se han encontrado en Argentina y en Portugal respectivamente. A medida que se obtienen más secuencias virales son propuestos nuevos subtipos, tal es el caso del más reciente subtipo asignado como U-NZenv, identificado en Nueva Zelanda (Andrade *et al.*, 2022; Perharić *et al.*, 2016).

La recombinación es un mecanismo de diversificación genética que puede originar variantes genéticas denominadas intersubtipos. Secuencias genéticas de las regiones *gag* y *env* del FIV han evidenciado la presencia de virus recombinantes A/B, A/C, A/D, B/C, B/D (Hayward & Rodrigo, 2010).

El FIV puede causar un síndrome de inmunodeficiencia adquirida en los gatos domésticos que inicia con una fase latente, seguida de la disminución de los linfocitos T CD4+, que conduce a un mayor riesgo de infecciones oportunistas, enfermedades neurológicas y neoplasias. No obstante, en la mayoría de los gatos infectados naturalmente, el FIV no causa un síndrome clínico severo y con el cuidado adecuado, los gatos infectados por el FIV pueden vivir muchos años y pueden morir a una edad avanzada por causas no relacionadas con la infección por el FIV (Hartmann, 2012).

## **1.9. Diagnóstico de los retrovirus felinos**

La medida más importante para el control del FeLV y el FIV es la identificación y segregación de los gatos infectados. Se recomienda evaluar a todos los gatos para detectar infecciones oportunamente; antes de la vacunación, luego de una posible exposición a gatos infectados, o si se muestran signos clínicos de enfermedad (Little *et al.*, 2020).

Las pruebas rápidas realizadas en el punto de atención (*point of care* o POC en inglés) están basadas en metodologías de inmunomigración rápida también denominada inmunocromatografía de flujo lateral (IFL). Estas pruebas rápidas se usan comúnmente en la práctica veterinaria para detectar el antígeno del FeLV y los anticuerpos contra el FIV en sangre total, suero o plasma (Levy *et al.*, 2017).

### **1.9.1. Diagnóstico de la infección por el FeLV**

El diagnóstico de infección por el FeLV se realiza con frecuencia con base en la detección del antígeno de cápside (p27) mediante pruebas de IFL. La mayoría de los gatos desarrollarán antigenemia y darán positivo dentro de los 30 días posteriores a la exposición. Dado que las consecuencias de una prueba de detección positiva para FeLV son significativas para el futuro del gato, se recomiendan pruebas adicionales para confirmar el diagnóstico. Para tal fin pueden enviarse muestras a un laboratorio para ser evaluadas con pruebas de ELISA que detecten el antígeno p27 o de PCR para la detección del provirus. Como alternativa, se puede usar una prueba de IFL de una marca diferente a la empleada inicialmente para confirmar el resultado (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001; Little *et al.*, 2020; Tandon *et al.*, 2005).

Las pruebas de PCR para detección del provirus proporcionan información adicional para conocer el estatus de la infección en el individuo. Los gatos que inicialmente resultan positivos tanto en la detección de antígeno p27 como en la



PCR pueden pasar a un patrón de infección regresivo, generalmente dentro de las 16 semanas posteriores a la infección (Hofmann-Lehmann & Hartmann, 2020; Little *et al.*, 2020).

Con las pruebas de RT-PCR para la detección de ARN viral en muestras de sangre y saliva ha sido posible detectar a los animales infectados desde 1 a 3 semanas post-exposición (Cattori *et al.*, 2009; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006). Adicionalmente, la detección de ARN en hisopados de saliva se considera un método confiable para determinar la presentación de antigenemia y de secreción viral, lo que resulta relevante en situaciones en las que la extracción de sangre no es factible, como ocurre en poblaciones grandes de gatos (Gomes-Keller, Gönczi, *et al.*, 2006; Gomes-Keller, Tandon, *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2020).

Se ha reportado que los ensayos de PCR en tiempo real para la cuantificación de cargas de ADN proviral y de ARN viral parecen tener relación con el estatus de la infección, al encontrar que los gatos con infecciones progresivas tienen niveles más altos de ARN viral y ADN proviral en comparación con los gatos con infecciones regresivas (Beall *et al.*, 2019; Cattori *et al.*, 2009).

Las pruebas de inmunofluorescencia (IFA) para frotis de sangre o médula ósea pueden estar disponibles en algunos laboratorios especializados para el diagnóstico de la infección por el FeLV, por lo que no se considera un método de detección de rutina. Estas pruebas detectan la presencia de antígeno viral (p27) en el citoplasma de neutrófilos y plaquetas, lo que es indicativo de infección de la médula ósea. Antes de que se establezca la infección de la médula ósea, como ocurre en la mayoría de los gatos con infecciones regresivas el resultado a esta prueba será negativo. También es posible obtener resultados falsos negativos en gatos con leucopenia (Hofmann-Lehmann & Hartmann, 2020; Little *et al.*, 2020).

Como se ha descrito anteriormente, es posible que existan resultados discordantes entre las pruebas de antígeno y otras técnicas, como PCR e IFA, ya que estas pruebas detectan la etapa de infección del gato en un solo momento,

por lo que es necesario repetir las pruebas posteriormente para esclarecer el estado de la infección en algunos individuos. Los gatos con resultados discordantes deben considerarse fuentes potenciales de infección para otros gatos hasta que se aclare su estado (Little *et al.*, 2020).

### ***1.9.2. Diagnóstico de la infección por el FIV***

La mayoría de los gatos producen altas concentraciones de anticuerpos contra el virus dentro de los 60 días posteriores a la infección, por lo que su detección es útil para el diagnóstico. Estos anticuerpos pueden identificarse con pruebas de IFL o ELISA basados en diferentes antígenos virales. Los kits disponibles de IFL pueden detectar anticuerpos dirigidos hacia una o más proteínas virales. La confirmación de resultados positivos puede realizarse a través de la detección de anticuerpos con Western blot o mediante la detección de ADN proviral y/o ARN viral por PCR. De igual manera, con base en la disponibilidad de las pruebas, se puede hacer uso de una prueba de IFL de una marca diferente a la inicialmente utilizada para confirmar el resultado (Little *et al.*, 2020).

Aunque las pruebas para la detección de anticuerpos contra el FIV se consideran altamente confiables en la mayoría de las situaciones, deben considerarse casos especiales, como ocurre en países donde la vacunación contra el FIV esté disponible (Australia, Nueva Zelanda y Japón), lo que complica el diagnóstico de infecciones por el FIV basado en la detección de anticuerpos en los animales vacunados. Otro factor que debe considerarse son los anticuerpos transferidos de forma pasiva a los gatitos que se alimentan de madres infectadas o vacunadas, ya que esto puede conducir a un resultado positivo en la prueba de anticuerpos hasta la edad de 6 meses en caso de que la madre se encuentre infectada (Little *et al.*, 2020; Westman *et al.*, 2022).

En circunstancias naturales, los gatitos nacidos de madres infectadas rara vez adquieren la infección por el FIV en el útero o después del nacimiento. En consecuencia, la mayoría de los gatitos que inicialmente resultan positivos en la prueba para detección de anticuerpos, resultarán negativos cuando los anticuerpos maternos hayan disminuido. Sin embargo, es probable que los gatitos que presenten persistentemente resultados positivos para anticuerpos contra el FIV después de los 6 meses de edad estén verdaderamente infectados. Debido a lo anterior, los gatitos positivos en la detección de anticuerpos contra el FIV deberían volver a analizarse con un ensayo de PCR confiable para esclarecer su estado (Little *et al.*, 2020; MacDonald *et al.*, 2004).

En contraparte, algunos gatos que entran en la fase terminal de la infección pueden tener resultados negativos en las pruebas para detección de anticuerpos debido a las altas cargas virales que secuestran anticuerpos en los complejos antígeno-anticuerpo (Hosie *et al.*, 2009; Little *et al.*, 2020; Matsumoto *et al.*, 1997).

Una consideración importante que debe tenerse con respecto a la detección de ácidos nucleicos virales (ADN proviral y ARN viral) por PCR es que es posible que no todos los gatos infectados sean detectados por esta prueba, lo que probablemente se deba a la existencia de variaciones en la secuencia viral o a las bajas cargas del virus. El diseño de estas pruebas debe dirigirse hacia la amplificación de regiones genéticas conservadas, con la intención de disminuir la posibilidad de obtener resultados falsos negativos (Hosie *et al.*, 2009; Little *et al.*, 2020).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México son reconocidas las infecciones por los retrovirus felinos (FeLV y FIV), sin embargo, no existen datos precisos de los tipos virales circulantes. Un estudio realizado previamente con gatos del centro del país reportó secuencias endógenas de FeLV (Ramírez *et al.*, 2016). Es por ello, que surge la necesidad de realizar análisis filogenéticos que permitan conocer los tipos virales que infectan a los felinos domésticos mexicanos. De igual manera, es de relevancia conocer la relación de estas infecciones retrovirales con la presentación de cuadros clínicos, considerando a las formas endógena y exógena del FeLV y a la posible infección con el virus de inmunodeficiencia felina.

### 3. HIPÓTESIS

Las regiones genéticas LTR y *gag* serán idóneas para la detección selectiva de variantes endógenas y exógenas del FeLV, y para la caracterización genética de los tipos virales del FeLV y el FIV que infectan a felinos domésticos, utilizando técnicas de PCR y secuenciación.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. *Objetivo general*

Detectar y caracterizar genéticamente a los retrovirus felinos (FeLV y FIV) que infectan a gatos domésticos mexicanos con diferentes alteraciones clínico-hematológicas.

### 4.2. *Objetivos particulares*

- Identificar gatos infectados con diferentes cuadros clínicos y alteraciones hematológicas relacionados a la infección con retrovirus felinos a través de PCR punto final e inmunocromatografía de flujo lateral.
- Amplificar de manera diferencial secuencias endógenas y exógenas del FeLV por PCR punto final.
- Caracterizar genéticamente los retrovirus felinos presentes (FeLV y FIV) en las muestras sanguíneas de felinos domésticos infectados.
- Determinar las cargas proviral y viral de exFeLV y enFeLV mediante PCR en tiempo real.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### ***5.1. Animales de estudio y colección de muestras***

En el estudio se incluyeron 50 gatos (27 machos y 23 hembras) a partir de los seis meses de edad, los cuales fueron atendidos en el Hospital de Pequeñas Especies de la FES-C, UNAM y en clínicas privadas del Estado de México. Se realizó un muestreo por conveniencia en el que se seleccionaron animales que presentaban signos clínicos compatibles con infecciones causadas por retrovirus, como enfermedad bucal, neoplasias y alteraciones hematológicas. También se consideraron animales que por su estilo de vida presentaban factores de riesgo asociados a estas infecciones, como es el caso de los animales no castrados, los gatos que tenían acceso al exterior, los que estuvieron en contacto con animales infectados, los provenientes de refugios de animales y/o los gatos callejeros rescatados. Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena radial o yugular en tubos con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer® con EDTA K2, México), a partir de las cuales se realizaron hemogramas. Se obtuvo el consentimiento previo otorgado por los tutores. Mediante centrifugación se separaron los leucocitos de sangre periférica (LSP) y el plasma sanguíneo, los cuales se almacenaron a - 75° C hasta su uso. Este proyecto fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales en Experimentación, CICUAE - FESC con la clave C19\_03.

### ***5.2. Detección de antígeno de FeLV y de anticuerpos contra FIV***

Se realizó la detección simultánea de antígeno de FeLV y de anticuerpos contra FIV por inmunocromatografía de flujo lateral utilizando el kit comercial Antigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag (BioNote, Inc., República de Corea) a partir de las muestras de plasma sanguíneo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.3. Detección de enFeLV, exFeLV y FIV por PCR**

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de los LSP utilizando un kit comercial, FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwán), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop Lite™ (Thermo Scientific™, USA) y se almacenó a -75 °C hasta su uso.

La detección inicial de las muestras positivas al FeLV se realizó con una PCR que amplifica una región parcial del gen *env* de 508 pb, utilizando los iniciadores y las condiciones previamente establecidas (Ramírez *et al.*, 2016). Debido a que esta PCR detecta tanto secuencias endógenas como exógenas de FeLV se diseñaron iniciadores que permitieran realizar la detección diferencial de secuencias endógenas o exógenas de FeLV. El diseño de los iniciadores se realizó en la LTR con el programa Primer3 Input (v.0.4.0), considerando secuencias disponibles en el GenBank. Los primers enFeLV LTR FW y FeLV LTR RV amplificaron un fragmento de 205 pb de enFeLV. Los primers exFeLV LTR FW y FeLV LTR RV amplificaron un fragmento de 215 pb de exFeLV (tabla 1). La mezcla de reacción contenía tampón 1X (Ampliqon, Odense M, Dinamarca), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Ampliqon), dNTPs 200 μM (Ampliqon), 500 nM de cada cebador, 5 U de ADN polimerasa Taq (Ampliqon) y 0.5 μg de ADN por reacción, en un volumen final de 25 μL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización a 95 °C durante 40 s, alineamiento a 62 °C para la exFeLV y 60 °C para enFeLV, extensión a 72 °C durante 13 s y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Para la obtención de secuencias del gen *gag* de FeLV, se estandarizó una PCR anidada para amplificar un producto inicial de 713 pb utilizando los primers FeLV *gag* FW1 y FeLV *gag* RV1. En la segunda ronda con los primers FeLV *gag* FW2 y FeLV *gag* RV2 se obtuvo el segundo producto de 562 pb (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía tampón 1X (Ampliqon, Odense M, Dinamarca), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM



(Ampliqon), dNTPs 200  $\mu$ M (Ampliqon), 500 nM de cada cebador, 5 U de ADN polimerasa Taq (Ampliqon) y 0.7  $\mu$ g de ADN por reacción, en un volumen final de 25  $\mu$ L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización a 95 °C durante 40 s, alineamiento a 53 °C para la primera reacción y 55 °C para la segunda reacción durante 40 s, extensión a 72 °C durante 45 s para la primera reacción y durante 35 s para la segunda reacción y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Con el propósito de obtener secuencias del gen *env*, se intentó estandarizar una PCR con los iniciadores FeLV-SU FW y FeLV-SU RV para la amplificación de un producto de 775 pb y utilizando diferentes condiciones de temperatura y concentraciones de componentes de la mezcla de reacción.

La detección de FIV se realizó mediante PCR anidada amplificando un fragmento del gen *gag*. Los primers FIV *gag* FW1 y FIV *gag* RV1 amplificaron un producto de 919 pb en la primera ronda y con los primers FIV *gag* FW2 y FIV *gag* RV2 se amplificó un producto de 458 pb en la segunda ronda (tabla 1). La mezcla de reacción contenía tampón 1X (Ampliqon, Odense M, Dinamarca), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (Ampliqon), dNTPs 200  $\mu$ M (Ampliqon), 500 nM de cada cebador, 5 U de ADN polimerasa Taq (Ampliqon) y 0.7  $\mu$ g de ADN por reacción, en un volumen final de 25  $\mu$ L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización a 95 °C durante 40 s, alineamiento a 57 °C para la primera reacción y 52 °C para la segunda reacción durante 40 s, extensión a 72 °C durante 56 s para la primera reacción y durante 30 s para la segunda reacción y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

#### ***5.4. Detección de enFeLV, exFeLV y FIV por RT-PCR***

Se extrajo el ARN a partir del plasma sanguíneo con kit comercial (FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction Kit, Taiwán) y posteriormente se realizó la RT-PCR en un solo paso utilizando el kit comercial OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, USA) con los iniciadores antes descritos y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### ***5.5. Electroforesis horizontal en geles de agarosa***

Los productos finales se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 µg / mL) y se visualizaron en un transiluminador UVP M-20E (BioSurplus, San Diego, CA, USA). Las bandas de los amplicones positivos se cortaron con una navaja de bisturí para su posterior purificación.

#### ***5.6. Purificación productos de PCR a partir de geles de agarosa***

La purificación de los amplicones positivos se realizó con el kit comercial FavorPrep GEL / PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwán), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### ***5.7. Secuenciación de productos de PCR***

La secuenciación de las muestras se realizó en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES - Iztacala, UNAM, utilizando el método Sanger en un equipo ABI 3130 × 1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Cuadro 1. Iniciadores diseñados para la detección de retrovirus felinos por PCR.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Posición <sup>a</sup>	TM	Tamaño del producto
enFeLV LTR FW	CCTCATTCTGGGAAATCGCC	8977 - 8996	60 °C	205 pb
FeLV LTR RV	GCGGTCAAGTCTCAGCAAAG	9162 - 9181		
exFeLV LTR FW	CCAAGAACAGTTAAACCCCGG	8120 - 8140	62 °C	215 pb
FeLV LTR RV	GCGGTCAAGTCTCAGCAAAG	8315 - 8334		
FeLV gag FW1	TGACCAGAGTTCGACCTTCC	235 - 254	53 °C	713 pb
FeLV gag RV 1	TCAAGGGTGAGGCTTAAGGG	928 - 947		
FeLV gag FW2	CTTTGCTGAGACTTGACCGC	350 - 369	55 °C	562 pb
FeLV gag RV2	CCCATGACGGTTTCTGCAAT	892 - 911		
FeLV-SU FW	CCAATGTAAAACACGGGGCA	6265 - 6284	59 °C	775 pb
FeLV-SU RV	GTCAGTTTATGTTGCGGAGT	7020 - 7039		
FIV gag FW1	GAGAAGGGAAYTTYAGATGGGC	719 - 740	57 °C	919 pb
FIV gag RV1	GTACTIONCTGGCTTAAGRTGRC	1616 - 1637		

FIV <i>gag</i> FW2	ATGGGATTAGACACYAGRCC	964 - 983	52 °C	458 pb
FIV <i>gag</i> RV2	CCTAATGCYTCRAGATACCA	1402 - 1421		

<sup>a</sup> Posiciones basadas en la secuencia enFeLV-AGTT (AY364318.1) de enFeLV, cepa Rickard (NC\_001940.1) de exFeLV y cepa Petaluma (NC\_001482.1) de FIV.

### ***5.8. Carga proviral y viral de exFeLV***

La carga proviral y viral se determinó en las muestras de ADN genómico de LSP y de ADNc mediante PCR en tiempo real en el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; con el apoyo del Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales. Se usó el kit comercial FIND-IT (BioTecMol, México) que utiliza una sonda TaqMan marcada con FAM/TAMRA para la detección de un fragmento de la LTR de exFeLV y la sonda del control interno está marcada con HEX/BHQ1.

### ***5.9. Carga proviral y viral de enFeLV***

Con la finalidad de conocer la carga proviral y viral de enFeLV en las muestras de ADN genómico de LSP y de ADNc respectivamente, se realizó la estandarización de una PCR en tiempo real, basada en la detección de un segmento de la región LTR, utilizando los iniciadores previamente descritos y SYBR® Green como fluoróforo (Tabla 1). El ADNc se obtuvo a partir del ARN extraído de las muestras de plasma con el kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific Baltics, UAB, Lituania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se prepararon en un volumen de 10 µL con el kit comercial SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA), de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Los ensayos se realizaron por duplicado en un

termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), utilizando como control positivo diluciones décuples seriadas de un gen sintético (gBlocks™, Integrated DNA Technologies, USA) que contenía la secuencia de interés (enFeLV-AGTT). El análisis de los datos y la determinación del número de copias se realizó con los programas Bio-Rad CFX Maestro 1.1 y NEBioCalculator 1.15.0. El análisis de correlación entre la carga proviral y viral se realizó en el programa GraphPad Prism 9.5.0.

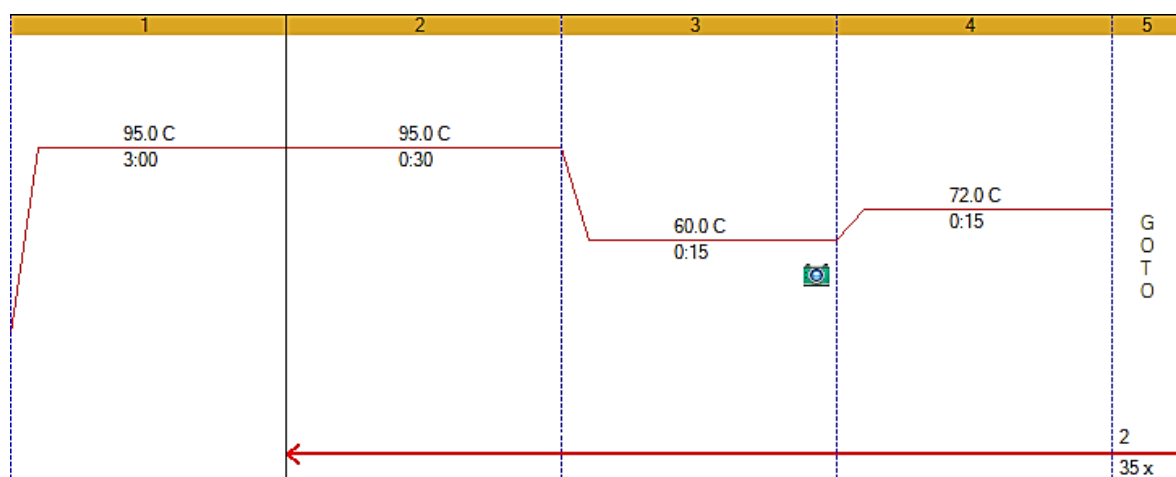


Figura 4. Condiciones de amplificación de enFeLV por qPCR. Desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos (1); seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 15 segundos, y extensión a 72 °C por 15 segundos (2, 3 y 4). 📷 Detección de la fluorescencia (3).

### 5.10. Secuenciación masiva (NGS)

Se enviaron muestras del ADN proviral y del ADNc retrotranscrito del ARN viral del plasma sanguíneo correspondientes a los individuos G01, G02, G03, G09, G26 y G37, entre los que se incluyeron tres machos y tres hembras que presentaban diferentes características clínico-hematológicas (apéndice 1) para su secuenciación con el sistema MiSeq™ de Illumina® (Illumina Inc., Estados Unidos) en el Centro Nacional de Recursos Genéticos - INIFAP, Tepatlán, Jalisco.

### ***5.11. Análisis de secuencias***

La edición de las secuencias se realizó con el programa BioEdit 7.0.4 y se utilizó ClustalW para hacer los diferentes alineamientos. La construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el programa Geneious 11.1.4 con el método de Neighbor-joining, empleando el modelo de distancia genética de Tamura-Nei y un soporte bootstrap de 1,000 réplicas. Las distancias genéticas se calcularon en el programa MEGA 11. Para la búsqueda de secuencias recombinantes se utilizó el programa RDP 5.23 y la proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas se calculó con el programa SNAP 2.1.1.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Presencia de ADN proviral y ARN viral del enFeLV

Todas las muestras de ADN genómico de LSP fueron positivas a enFeLV (figura 5). Por otro lado, a partir del ARN extraído de plasma sanguíneo se detectaron 48 animales positivos a enFeLV por RT-PCR. Veinticuatro animales resultaron negativos en las pruebas empleadas para la detección de exFeLV y FIV, por lo que únicamente fueron positivos a la enFeLV. Dentro de estos 24 animales exFeLV y FIV negativos, se encontraron siete animales que presentaron signos clínicos y/o alteraciones en el hemograma compatibles con la infección retroviral, entre los que se encontraron casos con gingivitis/gingivoestomatitis, linfoma, linfocitosis, linfopenia, anemia, neutropenia y/o trombocitopenia (figura 6).

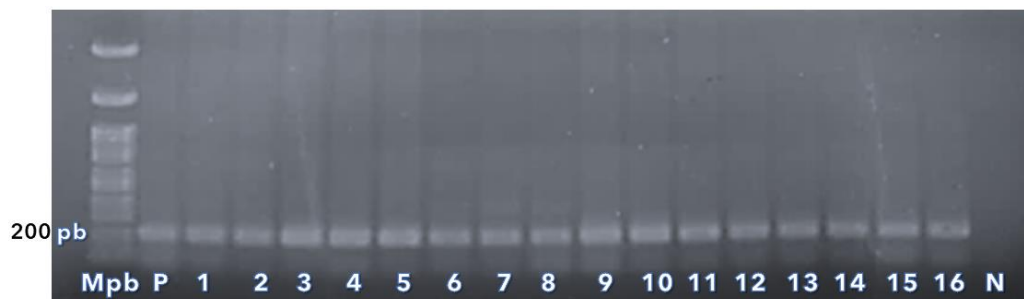


Figura 5. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}$  / mL) de los productos amplificados de la región LTR de enFeLV por PCR (205 pb). Carriles 1 - 16: muestras; Mpb: marcador de pares de bases; P: control positivo; N: control negativo.

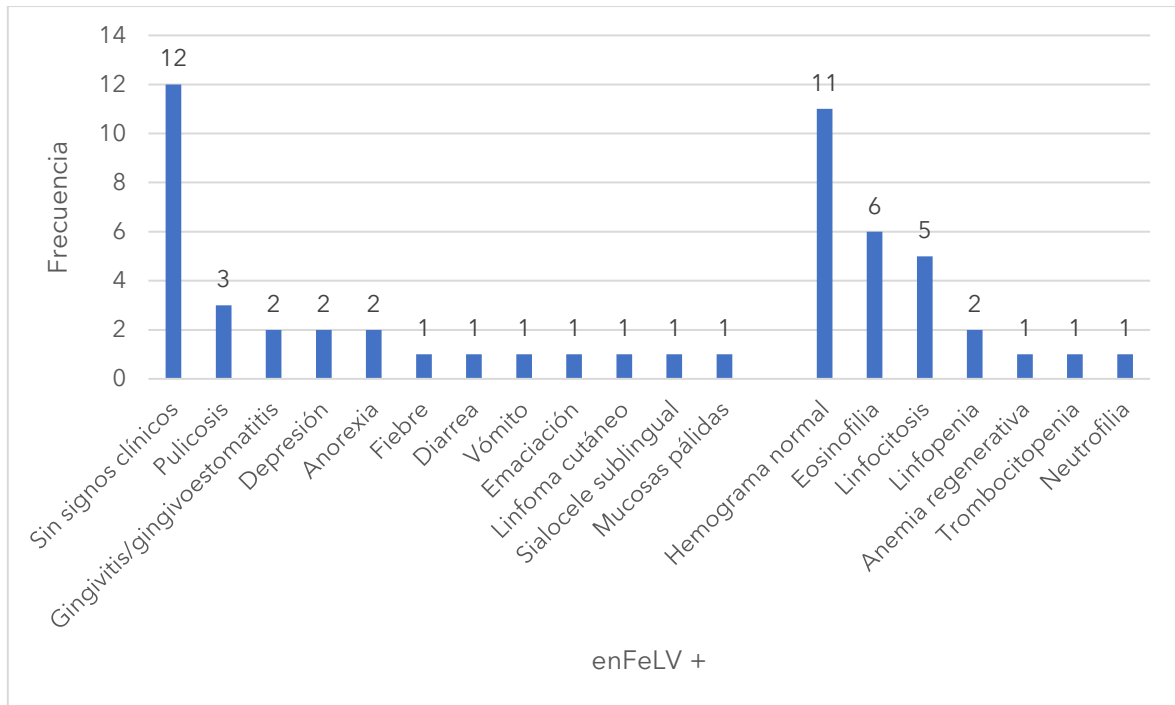


Figura 6. Signos clínicos y alteraciones hematológicas encontradas en los gatos domésticos positivos únicamente a enFeLV (n=24).

## 6.2. Presencia de antígeno, ADN proviral y ARN viral del exFeLV

De los 50 gatos evaluados, 17 de ellos resultaron positivos en al menos una de las pruebas para la detección del exFeLV. Se detectaron como positivas 6 de las 50 muestras de plasma para el antígeno del FeLV. Diez de las 50 muestras de LSP fueron positivas para ADN proviral del exFeLV. Por otro lado, 14 animales fueron positivos a ARN viral del exFeLV (figuras 7 y 8). La edad de los animales detectados como positivos a la infección por exFeLV en al menos una de las pruebas realizadas fue de 6 meses a 7 años (2.4 años en promedio), siete fueron hembras y diez machos. Dentro de estos animales positivos a exFeLV, cuatro no presentaron signos clínicos, no obstante, tres presentaron gingivitis o gingivoestomatitis, tres depresión y anorexia, dos diarrea y pérdida de peso, uno presentó linfoma y también se presentaron casos de animales con lesiones por mordida, vómito e ictericia, derrame pleural y pulicosis. Cinco de los animales



positivos a exFeLV no tuvieron alteraciones en el hemograma, sin embargo, se presentaron tres casos con anemia no regenerativa, dos con trombocitopenia, dos con linfopenia, dos con neutropenia, dos con eosinofilia, dos con neutrofilia, uno con linfocitosis y uno con monocitosis (figura 9).

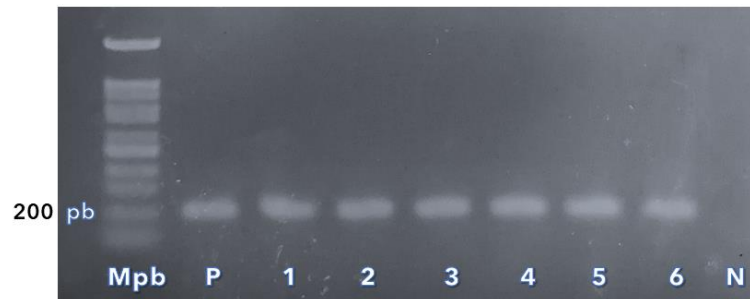


Figura 7. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de los productos amplificados de la región LTR de exFeLV por PCR (215 pb). Carriles 1 - 6: muestras; Mpb: marcador de pares de bases; P: control positivo; N: control negativo.

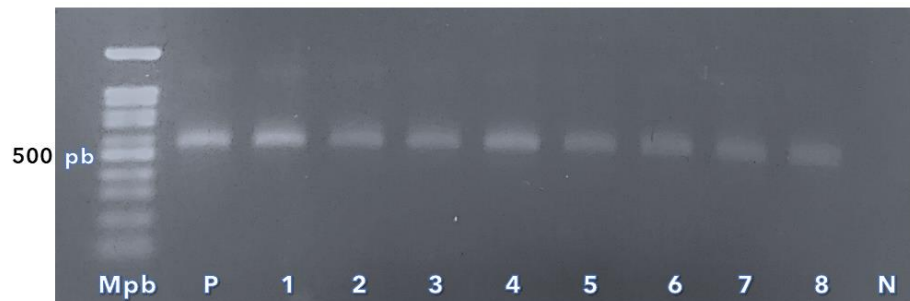


Figura 8. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de los productos amplificados de la región gag de FeLV por PCR anidada (562 pb). Carriles 1 - 8: muestras; Mpb: marcador de pares de bases; P: control positivo; N: control negativo.

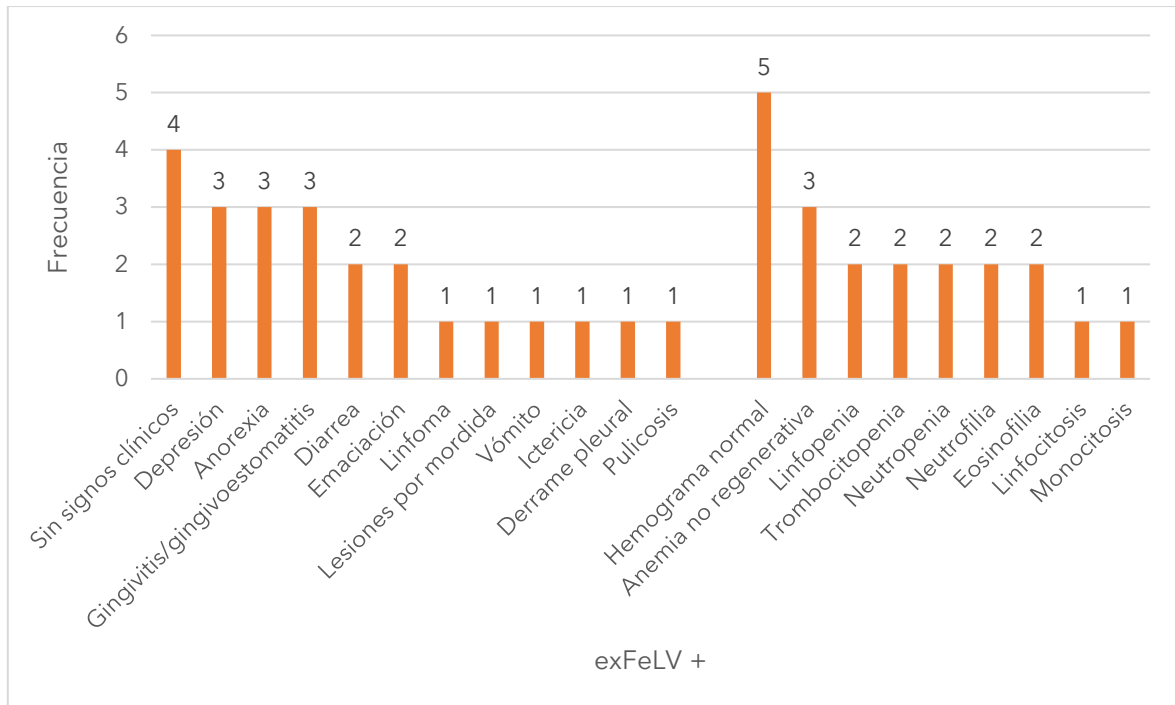


Figura 9. Signos clínicos y alteraciones hematológicas encontradas en los gatos domésticos positivos a exFeLV.

### **6.3. Presencia de anticuerpos, ADN proviral y ARN viral del FIV**

Se detectó la presencia de ADN proviral del FIV por PCR anidada en 10 de los 50 animales muestreados (figura 10) con edades que oscilaban de los 6 meses a los 15 años (7.05 años en promedio), cinco eran hembras y cinco eran machos, cinco animales presentaron depresión y anorexia, dos casos con baja de peso, dos con diarrea, uno presentó vómito, uno con gingivoestomatitis y un caso con adenocarcinoma mamario. Los hemogramas de estos animales positivos a FIV mostraron en seis de los casos la presencia de neutrofilia, dos casos con linfocitosis, anisocitosis, neutropenia, monocitosis y eosinofilia (con un caso cada uno) y uno de los animales no presentó ninguna alteración en el hemograma (figura 11). Ninguna de las muestras resultó positiva a anticuerpos contra el FIV ni a RT-PCR a partir de ARN de plasma sanguíneo.

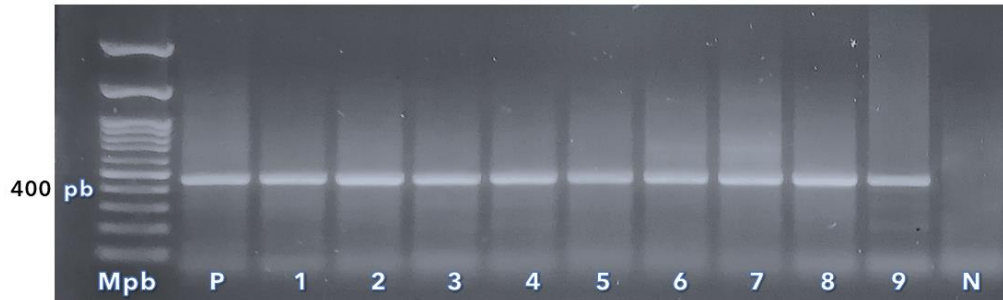


Figura 10. Visualización del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de los productos amplificados del gen gag del FIV por PCR anidada (458 pb). Carriles 1 - 9: muestras; Mbp: marcador de pares de bases; P: control positivo; N: control negativo.

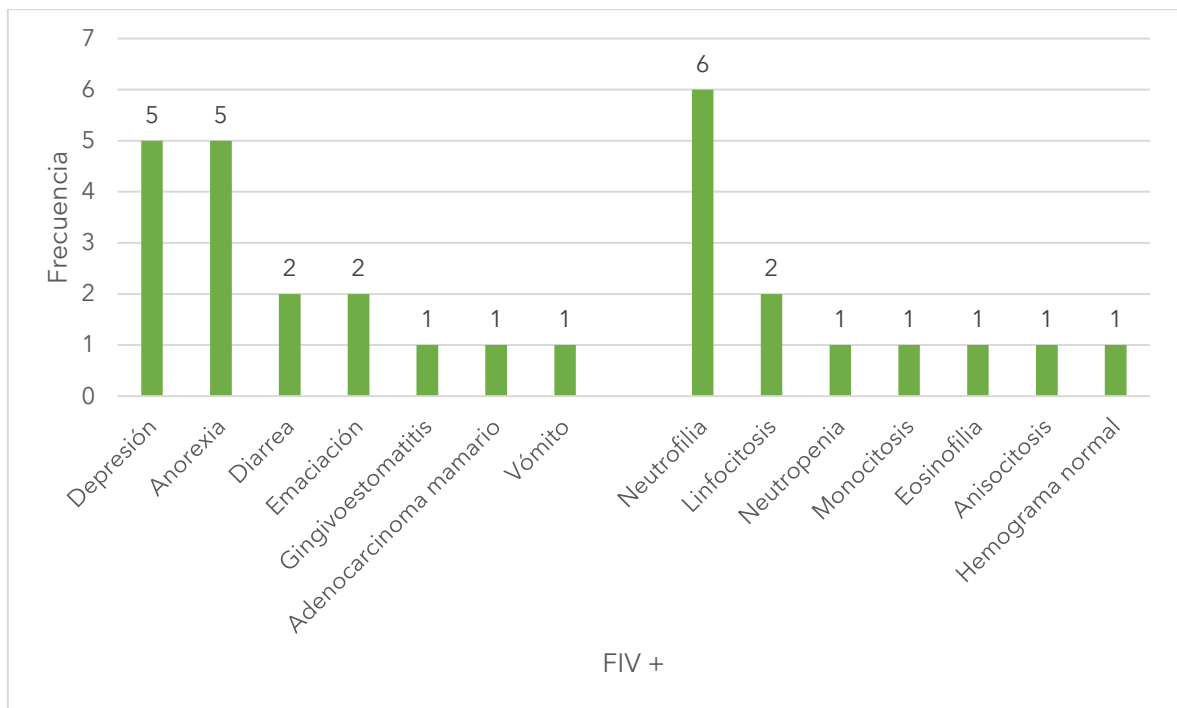


Figura 11. Signos clínicos y alteraciones hematológicas encontradas en los gatos domésticos positivos al FIV.

#### **6.4. Distancia genética y análisis de recombinación**

Las secuencias obtenidas en este estudio se encuentran disponibles en el GenBank con los números de acceso MZ334429 - MZ334466. El análisis de las distancias genéticas de las secuencias mostró que las secuencias obtenidas en el estudio de enFeLV-LTR tuvieron valores que oscilaron entre 0.02 - 0.45 y de 0.02 - 0.46 con respecto a las secuencias de referencia disponibles en el GenBank. En tanto que para las secuencias de exFeLV-LTR la distancia genética fue de 0 - 0.03 entre las secuencias obtenidas en el estudio y de 0 - 0.13 con respecto a secuencias exógenas disponibles en el GenBank. La distancia genética de las secuencias de exFeLV-gag fue de cero entre las secuencias obtenidas en el estudio y tuvo valores que oscilaron entre 0.02 - 0.06 con respecto a secuencias de la misma región de exFeLV disponibles en el GenBank. No se detectaron secuencias recombinantes en ninguna de las dos regiones genéticas analizadas (LTR y gag). Dado que no se obtuvieron resultados positivos para la amplificación por PCR del gen *env* del exFeLV en ninguna de las muestras, no se obtuvieron secuencias de esta región genética. El servicio de secuenciación masiva de las muestras reportó que no se encontraron secuencias endógenas ni exógenas de FeLV en ninguna de las muestras enviadas.

Por otro lado, para las secuencias obtenidas de FIV, los valores de distancia genética fueron de 0 - 0.05 entre las secuencias obtenidas en el estudio y con respecto a secuencias previamente descritas del subtipo A: de 0.13 - 0.18, del subtipo B: 0.01 - 0.06, del subtipo C: 0.17 - 0.20, del subtipo D: 0.10 - 0.16 y del subtipo E: 0.26 - 0.29. De igual manera, ninguna de las secuencias del gen *gag* mostró ser de origen recombinante.

El servicio de secuenciación masiva de las muestras reportó que no se encontraron secuencias endógenas ni exógenas de FeLV en ninguna de las muestras enviadas.

## 6.5. Análisis filogenético de enFeLV

El árbol filogenético se construyó con las secuencias endógenas obtenidas que corresponden a un fragmento de la región LTR de enFeLV (figura 12). Se incluyeron secuencias disponibles en el GenBank identificadas con los siguientes números de acceso: AY364318.1, AY364319.1, AY364320.1, GU300829.1, GU300839.1, GU300855.1, GU300949.1, GU300970.1, GU300986.1, GU301018.1, GU301066.1, LC196053.1, LC196055.1, LC198317.1, MH325041.1, MH325043.1 y MH325049.1.

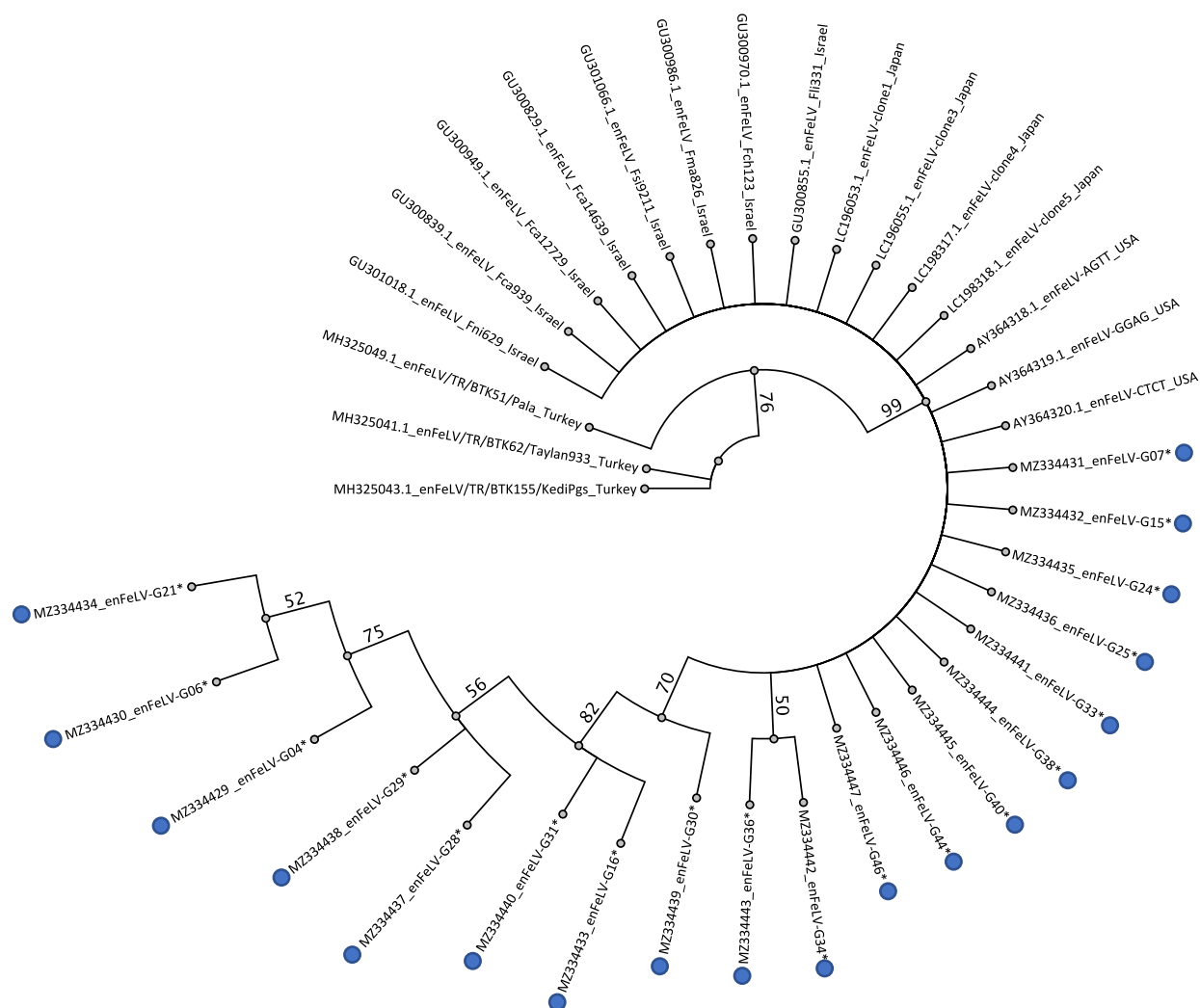


Figura 12. Árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas de la región LTR de enFeLV con el método de Neighbor-joining en el programa Geneious 11.1.4 (Acevedo-Jiménez *et al.*, 2023). Las secuencias obtenidas en este estudio se muestran en azul (●).





## 6.8. Análisis filogenético del FIV

El árbol filogenético se construyó con las secuencias obtenidas que corresponden a un fragmento del gen *gag* del FIV (figura 15). Se consideraron secuencias de diferentes subtipos disponibles en el GenBank identificadas con los siguientes números de acceso: del subtipo A: GQ422125.1, KM880117.1, KM880121.1, M25381.1 y M36968.1; subtipo B: M59418.1, MW142027.1, MW142038.1, MW142043.1, MW142046.1, MW142047.1, U11820.1 y Y13867.1; del subtipo C: AF474246.1 y AY600517.1; del subtipo D: AY679785.1, D37818.1 y D37822.1; del subtipo E: EU117992.1.

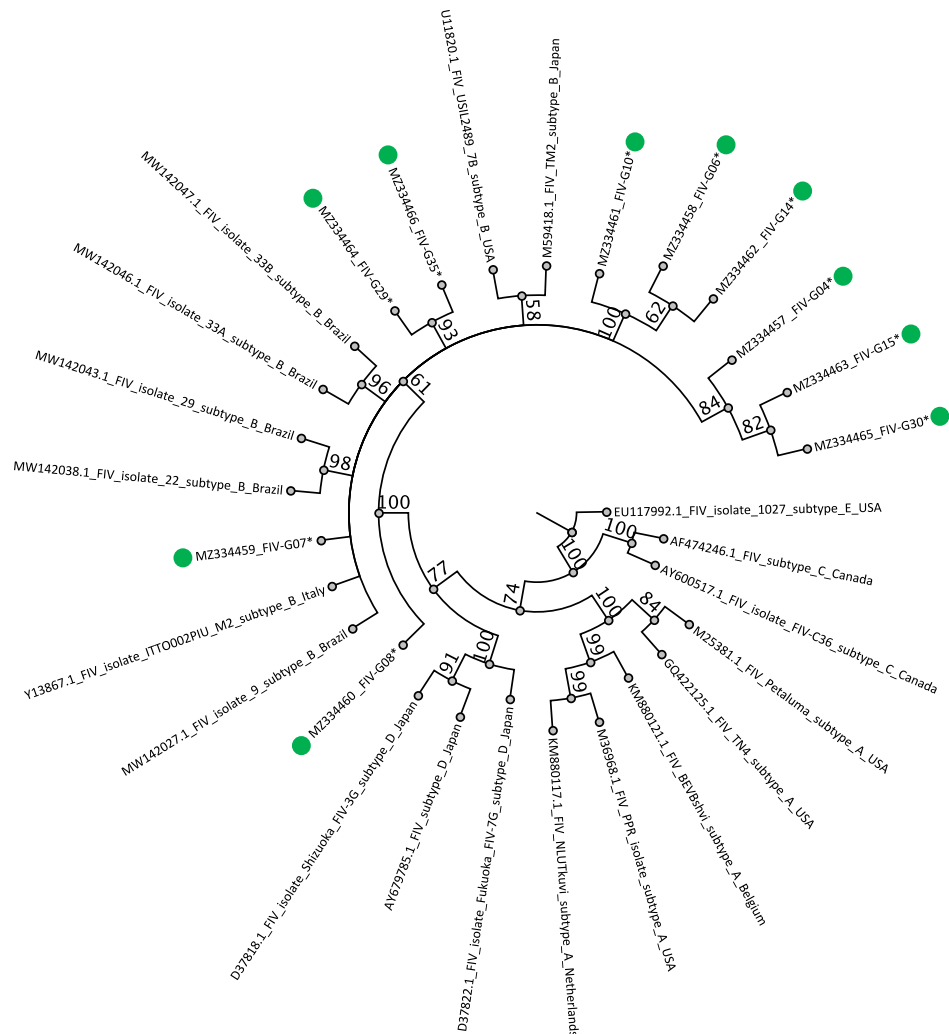


Figura 15. Árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas del gen *gag* del FIV con el método de Neighbor-joining en Geneious 11.1.4 (Acevedo-Jiménez et al., 2023). Las secuencias obtenidas en este estudio se muestran en verde (●).



### ***6.9. Proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas***

Considerando que cuando la proporción de sustituciones sinónimas (ds) y no sinónimas (dn) es cercana a 1 se refiere a una evolución neutral, cuando es menor que 1 se asume presión de selección negativa y cuando el valor es mayor que 1, la secuencia evoluciona bajo selección positiva. Las secuencias del gen *gag* de FeLV tuvieron proporciones ds/dn que iban de 0.58 a 0.98 entre los individuos; lo que sugiere una selección negativa. Por otro lado, las proporciones ds/dn obtenidas con las secuencias del gen *gag* de FIV fueron de 6.76 a 56.56; lo que indica la presentación de selección positiva de estas secuencias entre los animales.

### ***6.10. Carga proviral y viral de exFeLV***

Se detectó la carga proviral en dos de los animales siendo de  $1.09 \times 10^6$  y de  $2.65 \times 10^6$  copias por muestra. La carga proviral más baja se detectó en animal de siete años que presentaba linfoma y anemia no regenerativa, mientras que la carga proviral más alta se encontró en un animal de un año que no tenía signos clínicos y presentaba neutropenia. Por otro lado, la carga viral se detectó en seis animales que tuvieron valores de  $2.78 \times 10^5$ ,  $7.45 \times 10^5$ ,  $1.50 \times 10^6$ ,  $4.15 \times 10^6$ ,  $5.10 \times 10^6$  y  $1.72 \times 10^7$  copias por muestra y no parecía existir relación entre el número de copias y la presentación de signos clínicos o alteraciones en el hemograma (figura 16).

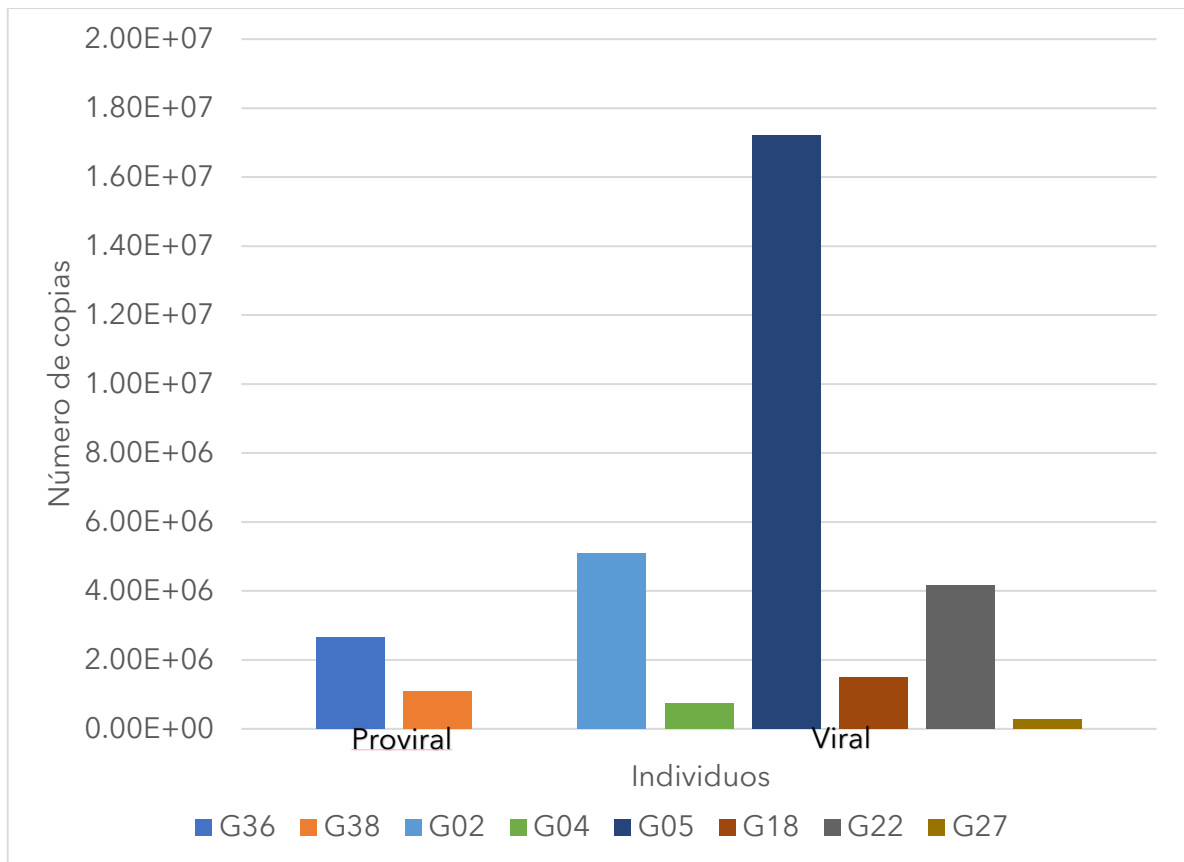


Figura 16. Carga proviral y viral expresada en número de copias por muestra de ocho gatos positivos a exFeLV por qPCR.

### 6.11. Carga proviral y viral de enFeLV

Los valores de carga proviral de enFeLV en las muestras fueron de  $1.32 \times 10^1$  a  $6.28 \times 10^5$ , con un valor promedio de  $3.39 \times 10^5$  número de copias/ $\mu$ L. La carga viral de enFeLV tuvo valores de  $1.42 \times 10^1$  a  $1.57 \times 10^2$  y una media de  $3.54 \times 10^1$  número de copias/ $\mu$ L. Lo anterior confirmó la presencia de transcritos de enFeLV en las muestras evaluadas (figuras 17-19). De igual manera, se determinó el coeficiente de correlación entre los niveles de carga proviral y los de carga viral de enFeLV, obteniéndose un valor de  $R^2$  igual a 0.01, por lo que la correlación entre ambas cargas es nula (figura 20).

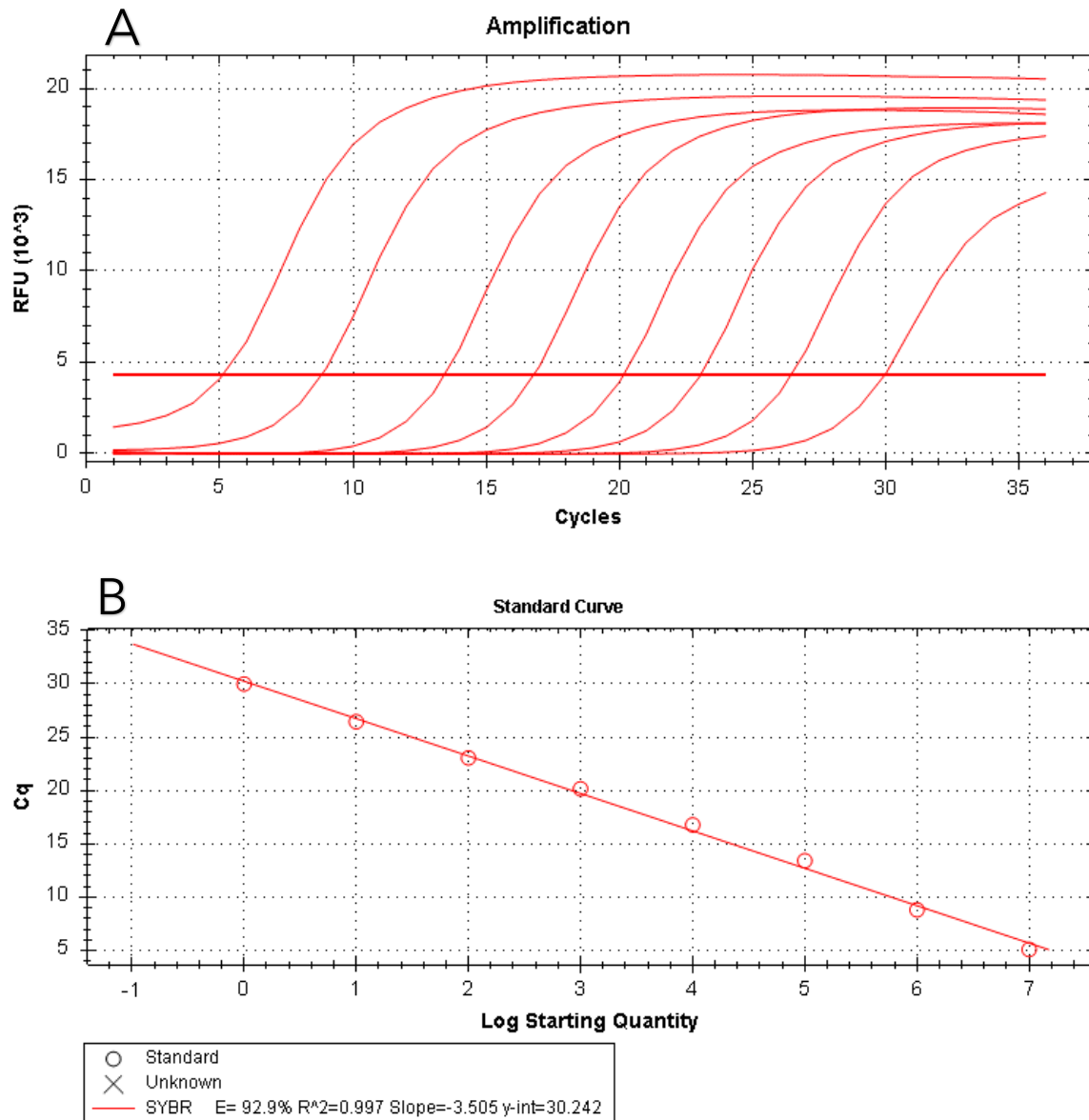


Figura 17. A) Curvas obtenidas de la amplificación de las diluciones seriadas (base 10) del control positivo (concentración inicial: 1 ng/ $\mu$ L). B) Curva estándar con valores de E, R<sup>2</sup>, Slope e intersección.

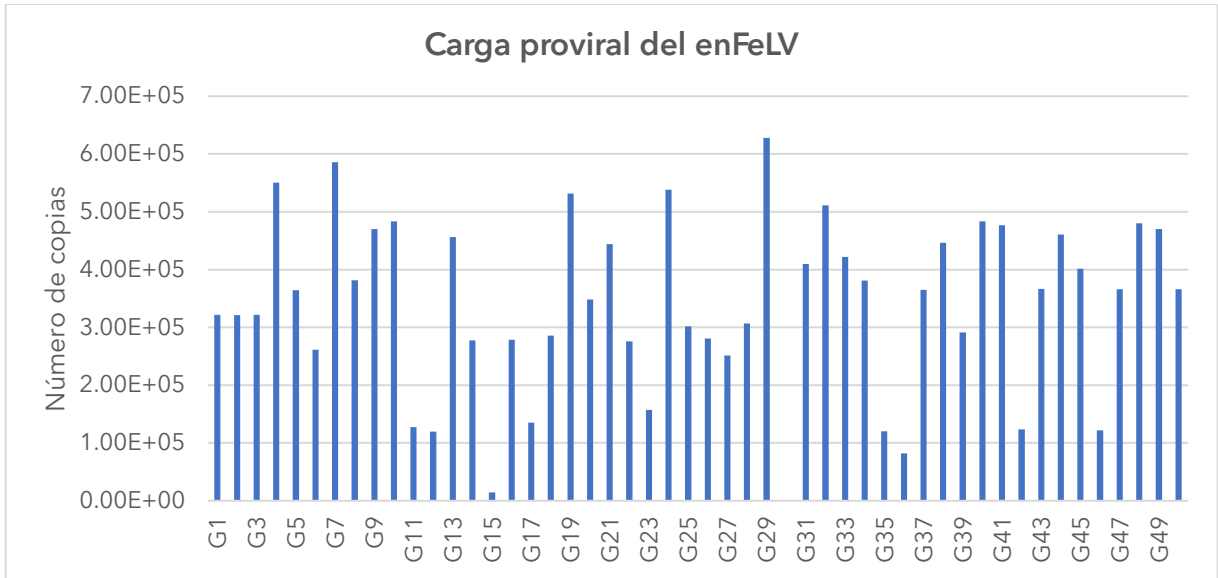


Figura 18. Niveles de carga proviral de enFeLV expresado en número de copias/ $\mu$ L en las muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica.

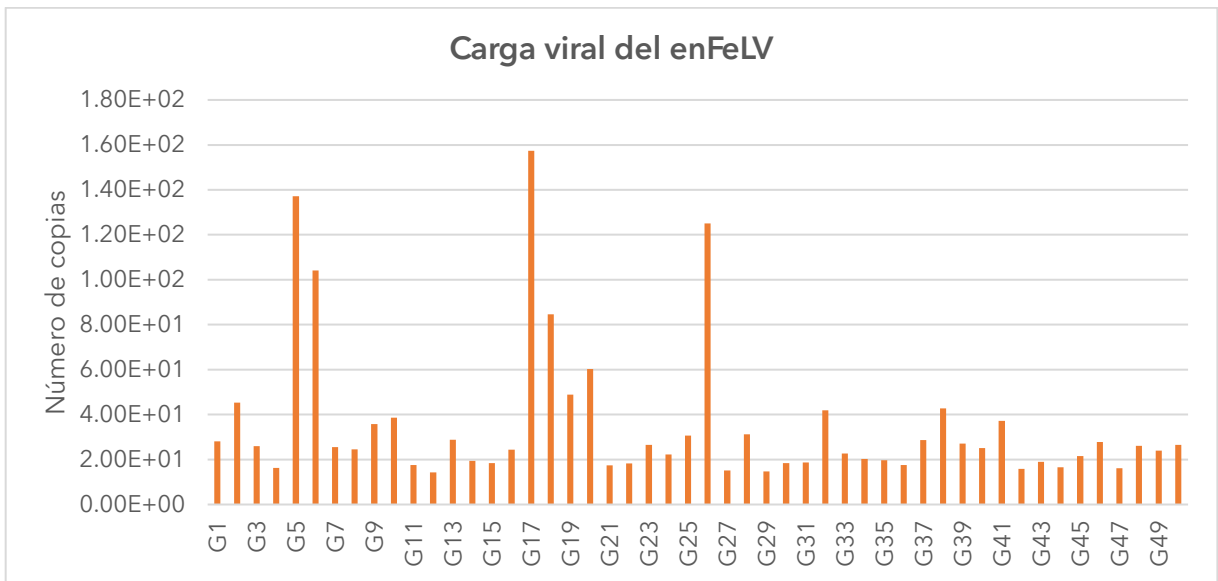


Figura 19. Niveles de carga viral de enFeLV expresado en número de copias/ $\mu$ L en las muestras de ADNc obtenido a partir del ARN de plasma sanguíneo.

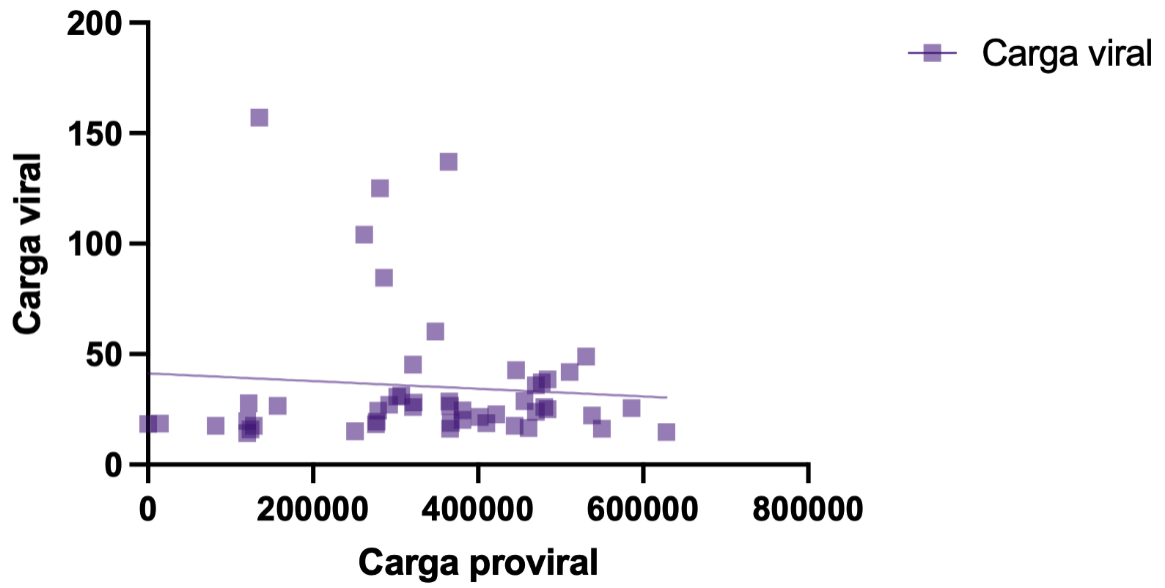


Figura 20. Gráfica que muestra la ausencia de correlación entre las cargas provirales y virales del enFeLV en los gatos domésticos del estudio (n= 50).

## 7. DISCUSIÓN

Se desarrollaron herramientas moleculares para detectar y caracterizar retrovirus felinos (enFeLV, exFeLV y FIV) en gatos domésticos que presentaron diferentes alteraciones clínicas y hematológicas. Estudios previos han descrito la presencia de estos virus en el país utilizando pruebas de detección de antígeno del FeLV y de anticuerpos contra el FIV (Ortega-Pacheco *et al.*, 2014) y de FeLV mediante PCR (Ramírez *et al.*, 2016). Sin embargo, son escasos los estudios en los que con el uso de la técnica de PCR se logre diferenciar entre enFeLV y exFeLV y adicionalmente se obtenga información para la caracterización genética de estos retrovirus felinos.

En este estudio se diseñaron un par de PCRs en la región U3 de la LTR para diferenciar virus de FeLV endógenos y exógenos, logrando la amplificación específica de cada virus, comprobándolo al analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas, lo que confirma que la región LTR es adecuada para la amplificación diferencial entre secuencias endógenas o exógenas del FeLV por PCR en tiempo real (Torres *et al.*, 2005; Tandon *et al.*, 2005).

Las secuencias de enFeLV presentes en el genoma de especies pertenecientes al género *Felis*, tienen un papel importante en la generación de variantes exógenas de FeLV que resultan más patógenas (Vail *et al.*, 2020), aunque las recombinaciones que suceden en el gen *env* son las más importantes y son las que permiten la caracterización de los subgrupos del FeLV (Miyake *et al.*, 2016), también se ha descrito la recombinación en otras regiones genéticas como *gag* y *pol* (Stewart *et al.*, 2013; Tzavaras *et al.*, 1990). Podría suponerse que la variabilidad de las secuencias endógenas también puede tener impacto en la variabilidad genética de los tipos exógenos resultantes por recombinación y en consecuencia en su nivel de patogenicidad, como ya se ha descrito en los subgrupos conocidos (Ahmad & Levy, 2010; Boomer *et al.*, 1994). Once de las secuencias de enFeLV obtenidas en este estudio se agruparon con la mayoría de

las secuencias endógenas previamente descritas (Roca *et al.*, 2004). No obstante, el árbol filogenético (figura 12) muestra que el resto de ellas (n=8) se asociaron en un grupo independiente. Los valores de distancia genética de las secuencias de enFeLV, mostraron que estas secuencias pueden ser muy variables, encontrándose la mayor proximidad genética con algunas secuencias endógenas de felinos domésticos previamente reportadas (Polani *et al.*, 2010; Roca *et al.*, 2004). Estos datos apoyan que las secuencias de enFeLV son genéticamente diversas (Polani *et al.*, 2010; Roca *et al.*, 2005; Tandon *et al.*, 2007). En contraste, las secuencias de exFeLV obtenidas en este estudio mostraron distancias genéticas menores, encontrado que de manera general fueron menos variables que las secuencias endógenas. La distancia genética menor se encontró con secuencias del subgrupo A previamente descritas (Chiu *et al.*, 2019). Dentro de las secuencias exógenas las pertenecientes al subgrupo A muestran la mayor conservación a nivel de sus secuencias, incluso entre aislados procedentes de distintas áreas geográficas, pudiendo alcanzar valores de similitud de hasta el 98% en la glicoproteína de superficie (Chiu *et al.*, 2018; Donahue *et al.*, 1988).

El análisis de las secuencias obtenidas de la región *gag* corroboró que los gatos se encontraban infectados con el subgrupo A del FeLV. No se encontraron secuencias recombinantes de FeLV en ninguna de las regiones genéticas analizadas (LTR y *gag*) en las muestras de este estudio. Es muy probable que en otros genes, incluido el de la envoltura (*env*) ocurra algo similar. Esto no pudo confirmarse, debido a que no fue posible obtener secuencias de esta región, lo que puede deberse a que probablemente exista variabilidad de las secuencias en el sitio de unión de los iniciadores (Watanabe *et al.*, 2013). No obstante, los datos de la secuenciación del gen *gag* han mostrado ser confiables, pues se trata de una región genética en la que también hay mutaciones y recombinaciones. Lo anterior, aunado a que el análisis filogenético del gen *gag* ha mostrado resultados similares a los obtenidos con el gen *env*, hace que sea una región candidata para la caracterización genética del FeLV (Kawamura *et al.*, 2015).

La endogenización de enFeLV al parecer sucedió después de la divergencia inicial del linaje del gato doméstico del resto de la familia *Felidae* (Polani *et al.*, 2010), sin embargo se reconoce la inserción más reciente de algunos enFeLV (Roca *et al.*, 2004; 2005). Aunque se sabe que el enFeLV no genera viriones infecciosos (Soe *et al.*, 1985), se han reportado enFeLV que conservan marcos de lectura abiertos funcionales (Kumar *et al.*, 1989; Roca *et al.*, 2004). En el presente estudio además de detectar enFeLV en todas las muestras de ADN de los gatos estudiados, se detectó ARN de enFeLV en 48 de los 50 gatos del estudio, lo que puede indicar una actividad frecuente de transcripción de la región LTR como se ha demostrado en otros estudios (McDougall *et al.*, 1994; Tandon *et al.*, 2008). La expresión del enFeLV está asociada con la infección por el exFeLV (Krunic *et al.*, 2015; McDougall *et al.*, 1994; Tandon *et al.*, 2008) y la generación de recombinantes que ocurren entre exFeLV y enFeLV podría tener lugar en los viriones que han co-empaquetado transcritos de origen endógeno y exógeno (Stewart *et al.*, 2011). Adicionalmente, no pareció existir correlación entre los niveles de carga proviral y los de carga viral de enFeLV en los gatos incluidos en el presente estudio, lo anterior contrasta con lo propuesto por Chiu *et al.*, 2021; que indican que individuos con bajos niveles de transcripción de enFeLV correlacionan con bajas cargas provirales del enFeLV. La importancia de lo antes descrito radica en la posibilidad de que la presencia del enFeLV en el genoma de los gatos domésticos y su expresión esté involucrada con la susceptibilidad a la infección por su contraparte exógena (Chiu & VandeWoude, 2020).

Los signos clínicos que mostraban con mayor frecuencia los animales al momento de la toma de muestras fueron: depresión y anorexia (18%), gingivitis/gingivoestomatitis (12%) diarrea (10%), emaciación (10%), pulicosis (8%) y vómito (6%). Aunque los padecimientos antes descritos pueden asociarse con la infección por el FeLV (Hartmann, 2011), especialmente los casos de gingivitis/gingivoestomatitis son relevantes dado que son frecuentemente observados en gatos infectados con FeLV o FIV, esto debido a que los gatos



infectados son más susceptibles a desarrollar enfermedad periodontal como consecuencia del deterioro del sistema inmunitario y su capacidad de responder ante las infecciones en general (Lee *et al.*, 2020; Thengchaisri *et al.*, 2017). Diecisiete de los animales resultaron positivos en alguna de las pruebas para detección de exFeLV (34%). Cuatro animales se detectaron como positivos en las 3 pruebas: detección de antígeno, detección ADN viral (provirus) y detección de ARN viral en plasma sanguíneo. Estos cuatro animales podrían estar cursando una infección progresiva, sin embargo, en estos casos es recomendable repetir las pruebas de antígeno para evaluar si es posible obtener un resultado negativo lo que sería indicativo de una posible infección regresiva (Hofmann-Lehmann & Hartmann, 2020). No obstante, las infecciones progresivas además de presentar viremia persistente, se caracterizan porque los animales generalmente desarrollan enfermedades asociadas a la infección con el virus (Hartmann, 2012), como la presentación de linfoma y anemia no regenerativa, así como gingivoestomatitis y otras citopenias que se presentaron en algunos animales del estudio, lo que podría sugerir un curso progresivo de la infección (Meichner *et al.*, 2012; Sykes & Hartmann, 2014). En la infección progresiva se produce una replicación viral extensa en tejidos linfoides, médula ósea y en tejidos epiteliales mucosos y glandulares, caracterizándose por la presentación de viremia persistente, por lo que es posible detectar tanto ADN como ARN viral por PCR y al antígeno (p27) en sangre (Little *et al.*, 2020). En cinco animales se detectó material genético del exFeLV tanto por PCR como por RT-PCR, pero no fueron positivos en la prueba de antígeno. A pesar de que uno de estos animales presentó gingivoestomatitis y otro presentó anemia no regenerativa, el resto podría cursar con una infección regresiva, en donde la replicación viral logra restringirse por la respuesta inmune del animal antes o poco después de la infección de la médula ósea pudiendo pasar o no por un estado de viremia (viremia transitoria) (Hartmann, 2012). En las infecciones progresivas, los gatos no eliminan el virus infeccioso en saliva, sin embargo, en episodios de inmunosupresión la infección puede reactivarse trayendo como consecuencia

que el animal excrete al virus en saliva y pueda presentar alguna enfermedad asociada con la infección (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020). No obstante, en estos casos se sugiere repetir las pruebas diagnósticas para conocer si la viremia persiste o no y esclarecer el tipo de infección, lo que resulta útil para determinar la prognosis de la infección (Hofmann-Lehmann & Hartmann, 2020). Uno de los gatos resultó positivo a la infección tanto en prueba de antígeno como en la prueba de RT-PCR de plasma sanguíneo; dos de ellos únicamente resultaron positivos en la prueba de antígeno y cuatro de los animales fueron únicamente positivos al exFeLV por RT-PCR de plasma sanguíneo. De manera conjunta, en este grupo de siete animales pudo detectarse viremia con la prueba de detección de antígeno o por RT-PCR, sin embargo, no pudo detectarse la forma proviral, lo que puede deberse a diferentes factores como la cantidad y calidad de la muestra de ADN, carga proviral baja, así como la sensibilidad de la prueba empleada (Beall *et al.*, 2021). De manera general los ensayos de PCR han mostrado ser más sensibles que la detección de antígeno en sangre en infecciones tempranas, ya que los gatos resultan positivos en esta prueba de una a dos semanas antes de que el antígeno sea detectable en sangre (Tandon *et al.*, 2005). En este estudio con la PCR en tiempo real fue posible detectar a dos animales que no fueron detectados por ninguna otra de las pruebas, confirmando que las pruebas de PCR en tiempo real resultan ser muy sensibles en la detección del FeLV en las diferentes etapas de la infección (Torres *et al.*, 2005). Por otro lado, las cargas proviral y viral pueden ser parámetros importantes en la progresión de la enfermedad en los animales infectados (Tandon *et al.*, 2005), no obstante, en este estudio no se encontró relación entre las cargas viral y proviral y la presentación de signos clínicos y/o alteraciones en el hemograma, lo que contrasta con lo previamente reportado (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001; Tandon *et al.*, 2005). Es posible que se observe una asociación más clara si se analizara a un número mayor de animales.

El hemograma de los animales que resultaron positivos en alguna de las pruebas para la detección de FeLV, mostraron que cinco de estos animales no tuvieron alteraciones, siendo el resultado más frecuente. Aunque la infección causada por el FeLV suele asociarse con diferentes desórdenes hematológicos (Costa *et al.*, 2017; Gleich & Hartmann, 2009), la ausencia de alteraciones hematológicas también ha sido reportada en animales detectados como positivos a la infección por el FeLV (Lacerda *et al.*, 2020) y podría explicarse por el curso de la infección en estos animales, que probablemente no sea del tipo progresivo al momento del estudio. Es importante señalar que dos de estos animales fueron positivos tanto al ADN proviral como al ARN viral, por lo que es posible que en un futuro desarrollen alguna de las alteraciones hematológicas asociadas con la infección (Hartmann, 2012). El segundo hallazgo más frecuentemente encontrado en estos animales fue la anemia no regenerativa en tres de los casos, seguido de trombocitopenia, linfopenia, neutrofilia y eosinofilia que se presentaron en dos casos cada una, no obstante, la neutrofilia y la eosinofilia no pueden asociarse de manera directa con la presencia de FeLV. Dentro de los desórdenes hematológicos que caracterizan a la infección por el FeLV, las citopenias son el hallazgo más frecuentemente reportado (Collado *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2017; Gleich & Hartmann, 2009; Lacerda *et al.*, 2020) y se atribuyen a la afección causada por el virus a las células hematopoyéticas y estructurales de la médula ósea (estromales y fibroblastos), lo que altera el microambiente necesario para la hematopoyesis y da lugar a la mielosupresión (Hartmann, 2011). Es importante señalar que citopenias como la anemia no regenerativa, linfopenia, neutropenia y trombocitopenia se encontraron en tres de los cuatro gatos considerados como “progresivos” debido a que resultaron positivos a la infección por el FeLV en todas las pruebas, por lo que podrían ser una manifestación de la enfermedad causada por la infección.

Para el caso del FIV, se detectó en su forma proviral por PCR anidada. El análisis filogenético de las secuencias obtenidas reveló que se agrupan con secuencias

pertenecientes al subtipo B, el cual es uno de los subtipos más frecuentemente reportados en el mundo (Huguet *et al.*, 2019; Kakinuma *et al.*, 1995; Perharić *et al.*, 2016; Steinrigl & Klein, 2003; Teixeira *et al.*, 2019; Weaver, 2010). Aunque se han reportado recombinaciones en el gen *gag* del FIV (Hayward & Rodrigo, 2008; Reggeti & Bienzle, 2004), en este caso ninguna de las secuencias mostró tener origen en más de un subtipo. Por otro lado, no fue posible detectar animales positivos a FIV por RT-PCR ni en la prueba rápida para detección de anticuerpos contra el virus, lo que resalta la importancia de realizar más de una prueba para un diagnóstico más preciso. En este caso es posible que la forma proviral fuera la única detectable debido a que el virus no se encuentra replicándose y/o hay ausencia de anticuerpos contra el virus o su título es muy bajo y no fue detectado por la prueba de IFL.

Los signos clínicos con mayor frecuencia encontrados en los gatos positivos a FIV fueron depresión y anorexia, los cuales por ser considerados como inespecíficos, no pueden atribuirse a la infección con este virus. Sin embargo, una hembra presentó adescarcinoma mamario y neutropenia; y otro de estos animales presentó gingivoestomatitis, siendo padecimientos que podrían atribuirse a la infección por FIV, ya que la infección por este retrovirus predispone a infecciones diversas, entre las que se encuentran las de la cavidad oral (gingivoestomatitis) (Hartmann, 2011; Older *et al.*, 2020). De igual manera, este retrovirus se ha asociado con un riesgo mayor para la presentación de neoplasias en los animales infectados, siendo las neoplasias del tejido mamario encontradas en casos FIV-positivos (Magden *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha reportado que las citopenias como la neutropenia son alteraciones frecuentes encontradas en el hemograma de gatos FIV-positivos (Collado *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2017; Gleich & Hartmann, 2009; Lacerda *et al.*, 2020).

En lo que respecta a las técnicas de detección de estos retrovirus, se encontró que mediante PCR fue posible detectar mayor número de animales infectados en comparación con la prueba de inmunocromatografía de flujo lateral. Para exFeLV

se detectaron trece animales positivos por RT-PCR de plasma y siete positivos en inmunocromatografía de flujo lateral, de los cuales únicamente cinco resultaron positivos en ambas técnicas. Se detectaron ocho animales positivos por RT-PCR que fueron negativos en la prueba de inmunocromatografía de flujo lateral y dos animales positivos en la prueba de inmunocromatografía de flujo lateral y negativos por RT-PCR. Sin embargo, no es posible esclarecer si existen casos de resultados falsos positivos y falsos negativos en las técnicas antes mencionadas. Se ha reportado una concordancia sustancial ( $Kappa = 0.68$ ) entre la detección de ARN viral en plasma y la antigenemia, sin embargo, la RT-PCR es una técnica más sensible en comparación con la detección del antígeno de cápside en plasma (Torres *et al.*, 2008). En cuatro casos en los que se detectó ARN viral por RT-PCR de plasma no fue posible detectar el ADN proviral en las muestras de LSP, esto podría deberse a una baja carga proviral, es por ello que los ensayos de PCR en tiempo real al ser más sensibles son de utilidad para la detección de animales en los que la carga proviral es baja (Tandon *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005). La detección del FIV se logró únicamente en su forma proviral. Ninguna de las muestras resultó positiva en la prueba de detección de anticuerpos contra el virus por inmunocromatografía de flujo lateral. Se han reportado casos en los que los animales son indetectables a la infección por FIV a través de pruebas de búsqueda de anticuerpos contra el virus (ELISA e inmunocromatografía de flujo lateral) (Frankenfeld *et al.*, 2019). Una posible explicación para esto es que la prueba utilizada en este estudio detecta anticuerpos contra la proteína de transmembrana del virus (gp40) (Westman *et al.*, 2019), que aunque contiene epítomos inmunodominantes que inducen una buena respuesta de anticuerpos (Avrameas *et al.*, 1992; Calzolari *et al.*, 1995; Fontenot *et al.*, 1992; Pancino *et al.*, 1993), esta proteína se encuentra codificada por el gen *env* que es una región genética sujeta a presentar variaciones importantes, debido a que es el gen en el que principalmente ocurre la recombinación genética (Bęczkowski *et al.*, 2014; Carpenter *et al.*, 1998). De igual manera, la baja fidelidad del proceso de retrotranscripción aunada a la aparición de cuasiespecies en los gatos infectados

conducen a la diversidad genética viral que puede traer como consecuencia cambios en la secuencia proteica, que a su vez no permitan que las pruebas diagnósticas detecten los anticuerpos generados por estos animales (Kyaw-Tanner & Robinson, 1996; Willett *et al.*, 2013). Por el contrario, el gen *gag* codifica a las proteínas de cápside (p24) y matriz (p15) que también son de relevancia diagnóstica y que tienen como ventaja ser producto de una región genética más conservada con respecto al gen *env* y, por lo tanto, los anticuerpos generados hacia estos antígenos virales podrían ser detectados de manera más eficiente en las pruebas diagnósticas (Greene *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1990). Existen pruebas comerciales basadas en la combinación de antígenos derivados de los genes *gag* y *env* (proteínas de cápside, matriz y/o transmembrana) que podrían ser más eficientes en la detección de animales infectados con respecto a las pruebas diagnósticas basadas únicamente en el uso de la proteína de transmembrana (Rimmelzwaan *et al.*, 1994; Westman *et al.*, 2015; Westman *et al.*, 2019). Para el caso de los animales de este estudio, la PCR mostró ser más sensible en comparación con la prueba para detección de anticuerpos. En contraparte, a través de RT-PCR no se detectaron casos positivos, lo que puede deberse a que las muestras de estos animales presentaban bajos niveles de carga viral. Lo anterior reafirma la importancia de utilizar más de una prueba para tener un diagnóstico más certero.

## 8. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia tanto de FeLV (endógenos y exógenos) como de FIV en gatos domésticos mexicanos. Los resultados obtenidos por PCR - secuenciación confirmaron la presencia de enFeLV, exFeLV-A; así como, la presencia del subtipo B del FIV.

Las alteraciones clínico-hematológicas más frecuentes en los gatos infectados por retrovirus felinos de este estudio fueron: depresión, anorexia, gingivoestomatitis, anemia no regenerativa, linfopenia, trombocitopenia, linfocitosis y neutrofilia.

Por medio de RT-PCR fue posible detectar más gatos infectados con exFeLV, en contraste, la técnica comercial de IFL fue la que identificó la menor cantidad de gatos infectados. Por su parte, la detección de FIV se consiguió por PCR anidada del gen *gag* y con IFL no se detectaron animales positivos a la infección por este retrovirus.

No se encontró correlación entre las cargas provirales y virales de enFeLV ni se encontró asociación entre la carga viral de exFeLV con la presentación de signos clínicos y/o alteraciones hematológicas.

Es importante el estudio conjunto de retrovirus felinos que de forma global aporten información sobre la frecuencia, tipos virales circulantes, así como de la eficiencia de las pruebas diagnósticas empleadas en su detección.

## 9. REFERENCIAS

- Acevedo-Jiménez, G. E., Sarmiento-Silva, R. E., Alonso-Morales, R. A., Córdova-Ponce, R., & Ramírez-Álvarez, H. (2023). Detection and genetic characterization of feline retroviruses in domestic cats with different clinical signs and hematological alterations. *Archives of Virology*, *168*(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05627-z>
- Ahmad, S., & Levy, L. S. (2010). The frequency of occurrence and nature of recombinant feline leukemia viruses in the induction of multicentric lymphoma by infection of the domestic cat with FeLV-945. *Virology*, *403*(2), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.04.011>
- Anai, Y., Ochi, H., Watanabe, S., Nakagawa, S., Kawamura, M., Gojobori, T., & Nishigaki, K. (2012). Infectious Endogenous Retroviruses in Cats and Emergence of Recombinant Viruses. *Journal of Virology*, *86*(16), 8634-8644. <https://doi.org/10.1128/JVI.00280-12>
- Anderson, M. M. (2000). Identification of a Cellular Cofactor Required for Infection by Feline Leukemia Virus. *Science*, *287*(5459), 1828-1830. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1828>
- Andrade, L. A. F., Versiani, A. F., Barbosa-Stancioli, E. F., dos Reis, J. K. P., dos Reis, J. G. A. C., & da Fonseca, F. G. (2022). Developing a Feline Immunodeficiency Virus Subtype B Vaccine Prototype Using a Recombinant MVA Vector. *Vaccines*, *10*(10), 1717. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101717>
- Avrameas, A., Guillet, J.-G., Chouchane, L., Moraillon, A., Sonigo, P., & Strosberg, A. D. (1992). Localisation of three epitopes of the ENV protein of feline immunodeficiency virus. *Molecular Immunology*, *29*(5), 565-572. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(92\)90192-Z](https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90192-Z)
- Beall, M. J., Buch, J., Cahill, R. J., Clark, G., Hanscom, J., Estrada, M., Leutenegger, C. M., & Chandrashekar, R. (2019). Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *67*(May), 101348. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101348>
- Beall, M. J., Buch, J., Clark, G., Estrada, M., Rakitin, A., Hamman, N. T., Frenden, M. K., Jefferson, E. P., Amirian, E. S., & Levy, J. K. (2021). Feline Leukemia Virus p27 Antigen Concentration and Proviral DNA Load Are Associated with Survival in Naturally Infected Cats. *Viruses*, *13*(2), 302. <https://doi.org/10.3390/v13020302>
- Beatty, J. A., Willett, B. J., Gault, E. A., & Jarrett, O. (1996). A longitudinal study of



feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *Journal of Virology*, 70(9), 6199-6206. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.6199-6206.1996>

- Bęczkowski, P. M., Hughes, J., Biek, R., Litster, A., Willett, B. J., & Hosie, M. J. (2014). Feline immunodeficiency virus (FIV) envrecombinants are common in natural infections. *Retrovirology*, 11(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0080-1>
- Blomberg, J., Benachenhou, F., Blikstad, V., Sperber, G., & Mayer, J. (2009). Classification and nomenclature of endogenous retroviral sequences (ERVs). *Gene*, 448(2), 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.06.007>
- Boenzli, E., Hadorn, M., Hartnack, S., Huder, J., Hofmann-Lehmann, R., & Lutz, H. (2014). Detection of Antibodies to the Feline Leukemia Virus (FeLV) Transmembrane Protein p15E: an Alternative Approach for Serological FeLV Detection Based on Antibodies to p15E. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 2046-2052. <https://doi.org/10.1128/JCM.02584-13>
- Böhnlein, S., Hauber, J., & Cullen, B. R. (1989). Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Journal of Virology*, 63(1), 421-424. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.1.421-424.1989>
- Bolin, L. L., & Levy, L. S. (2011). Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort. *Viruses*, 3(9), 1681-1698. <https://doi.org/10.3390/v3091681>
- Boomer, S., Gasper, P., Whalen, L. R., & Overbaugh, J. (1994). Isolation of a Novel Subgroup B Feline Leukemia Virus from a Cat Infected with FeLV-A. *Virology*, 204(2), 805-810. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1597>
- Brown, M. A., Cunningham, M. W., Roca, A. L., Troyer, J. L., Johnson, W. E., & O'Brien, S. J. (2008). Genetic Characterization of Feline Leukemia Virus from Florida Panthers. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 252-259. <https://doi.org/10.3201/eid1402.070981>
- Brown, W. C., Bissey, L., Logan, K. S., Pedersen, N. C., Elder, J. H., & Collisson, E. W. (1991). Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Journal of Virology*, 65(6), 3359-3364. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.3359-3364.1991>
- Burkhard, M., & Dean, G. (2003). Transmission and Immunopathogenesis of FIV in Cats as a Model for HIV. *Current HIV Research*, 1(1), 15-29. <https://doi.org/10.2174/1570162033352101>
- Callanan, J. J., Thompson, H., Toth, S. R., O'Neil, B., Lawrence, C. E., Willett, B., & Jarrett, O. (1992). Clinical and pathological findings in feline

- immunodeficiency virus experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 35(1-2), 3-13. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90116-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90116-8)
- Calzolari, M., Young, E., Cox, D., Davis, D., & Lutz, H. (1995). Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 46(1-2), 83-92. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)07008-U](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)07008-U)
- Carpenter, M. A., Brown, E. W., MacDonald, D. W., & O'Brien, S. J. (1998). Phylogeographic Patterns of Feline Immunodeficiency Virus Genetic Diversity in the Domestic Cat. *Virology*, 251(2), 234-243. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9402>
- Cattori, V., Tandon, R., Riond, B., Pepin, A. C., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome. *Veterinary Microbiology*, 133(3), 292-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.001>
- Chameettachal, A., Mustafa, F., & Rizvi, T. A. (2022). Understanding Retroviral Life Cycle and its Genomic RNA Packaging. *Journal of Molecular Biology*, 167924. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167924>
- Chiu, E., Hoover, E., & VandeWoude, S. (2018). A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/v10010029>
- Chiu, E. S., Kraberger, S., Cunningham, M., Cusack, L., Roelke, M., & VandeWoude, S. (2019). Multiple Introductions of Domestic Cat Feline Leukemia Virus in Endangered Florida Panthers. *Emerging Infectious Diseases*, 25(1), 92-101. <https://doi.org/10.3201/eid2501.181347>
- Chiu, E. S., McDonald, C. A., & VandeWoude, S. (2021). Endogenous Feline Leukemia Virus (FeLV) siRNA Transcription May Interfere with Exogenous FeLV Infection. *Journal of Virology*, 95(23). <https://doi.org/10.1128/JVI.00070-21>
- Chiu, E. S., & VandeWoude, S. (2020). Presence of Endogenous Viral Elements Negatively Correlates with Feline Leukemia Virus Susceptibility in Puma and Domestic Cat Cells. *Journal of Virology*, 94(21). <https://doi.org/10.1128/JVI.01274-20>
- Chong, A. Y., Kojima, K. K., Jurka, J., Ray, D. A., Smit, A. F. A., Isberg, S. R., & Gongora, J. (2014). Evolution and gene capture in ancient endogenous retroviruses - insights from the crocodylian genomes. *Retrovirology*, 11(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0071-2>

- Coffin, J., Blomberg, J., Fan, H., Gifford, R., Hatzioannou, T., Lindemann, D., Mayer, J., Stoye, J., Tristem, M., & Johnson, W. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102(12), 1–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001712>
- Coffin, J. M. (2004). Evolution of retroviruses: fossils in our DNA. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 148(3), 264–280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551500>
- Collado, V. M., Domenech, A., Miró, G., Martin, S., Escolar, E., & Gomez-Lucia, E. (2012). Epidemiological Aspects and Clinicopathological Findings in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus (FeLV) and/or Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Open Journal of Veterinary Medicine*, 02(01), 13–20. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2012.21003>
- Costa, F. V. A. da, Valle, S. de F., Machado, G., Corbellini, L. G., Coelho, E. M., Rosa, R. B., & González, F. H. D. (2017). Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(12), 1531–1536. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001200028>
- Cotter, S. M. (1992). Feline Leukemia Virus: Pathophysiology, Prevention, and Treatment. *Cancer Investigation*, 10(2), 173–181. <https://doi.org/10.3109/07357909209032778>
- Cunningham, M. W., Brown, M. A., Shindle, D. B., Terrell, S. P., Hayes, K. A., Ferree, B. C., McBride, R. T., Blankenship, E. L., Jansen, D., Citino, S. B., Roelke, M. E., Kiltie, R. A., Troyer, J. L., & O'Brien, S. J. (2008). Epizootiology and management of feline leukemia virus in the Florida puma. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(3), 537–552. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.3.537>
- Daniels, M. J., Golder, M. C., Jarrett, O., & MacDonald, D. W. (1999). Feline Viruses in Wildcats from Scotland. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 121–124. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.1.121>
- De Parseval, A., & Elder, J. H. (2001). Binding of Recombinant Feline Immunodeficiency Virus Surface Glycoprotein to Feline Cells: Role of CXCR4, Cell-Surface Heparans, and an Unidentified Non-CXCR4 Receptor. *Journal of Virology*, 75(10), 4528–4539. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4528-4539.2001>
- Desfarges, S., & Ciuffi, A. (2010). Retroviral Integration Site Selection. *Viruses*, 2(1), 111–130. <https://doi.org/10.3390/v2010111>
- Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwickelmaier, V., & Campbell, E. M. (2020). Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription

- and uncoating in the nucleus. *Nature Microbiology*, 5(9), 1088-1095.  
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0735-8>
- Donahue, P. R., Hoover, E. A., Beltz, G. A., Riedel, N., Hirsch, V. M., Overbaugh, J., & Mullins, J. I. (1988). Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *Journal of Virology*, 62(3), 722-731. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.3.722-731.1988>
- Dunham, S. P., & Graham, E. (2008). Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 879-901.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.005>
- Elder, J., Lin, Y.-C., Fink, E., & Grant, C. (2010). Feline Immunodeficiency Virus (FIV) as A Model for Study of Lentivirus Infections: Parallels with HIV. *Current HIV Research*, 8(1), 73-80. <https://doi.org/10.2174/157016210790416389>
- Fan, H. (2009). Retroviruses. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 519-534). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00315-1>
- Filoni, C., Helfer-Hungerbuehler, A. K., Catão-Dias, J. L., Marques, M. C., Torres, L. N., Reinacher, M., & Hofmann-Lehmann, R. (2017). Putative progressive and abortive feline leukemia virus infection outcomes in captive jaguarundis (*Puma yagouaroundi*). *Virology Journal*, 14(1), 226.  
<https://doi.org/10.1186/s12985-017-0889-z>
- Fontenot, J. D., Hoover, E. A., Elder, J. H., & Montelaro, R. C. (1992). Evaluation of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus transmembrane peptides for serological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1885-1890. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.7.1885-1890.1992>
- Frankenfeld, J., Meili, T., Meli, M., Riond, B., Helfer-Hungerbuehler, A., Bönzli, E., Pineroli, B., & Hofmann-Lehmann, R. (2019). Decreased Sensitivity of the Serological Detection of Feline Immunodeficiency Virus Infection Potentially Due to Imported Genetic Variants. *Viruses*, 11(8), 697.  
<https://doi.org/10.3390/v11080697>
- Freed, E. O. (1998). HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology*, 251(1), 1-15. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9398>
- Frey, S. C. S., Hoover, E. A., & Mullins, J. I. (2001). Feline Immunodeficiency Virus Cell Entry. *Journal of Virology*, 75(11), 5433-5440.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.11.5433-5440.2001>
- Fromont, E., Pontier, D., Sager, A., Jouquelet, E., Artois, M., Léger, F., Stahl, P., & Bourguemestre, F. (2000). Prevalence and pathogenicity of retroviruses in wildcats in France. *Veterinary Record*, 146(11), 317-319.  
<https://doi.org/10.1136/vr.146.11.317>
- Gifford, R. J., Blomberg, J., Coffin, J. M., Fan, H., Heidmann, T., Mayer, J., Stoye,

- J., Tristem, M., & Johnson, W. E. (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. *Retrovirology*, 15(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0442-1>
- Gifford, R., & Tristem, M. (2003). The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes*, 26(3), 291-315. <https://doi.org/10.1023/A:1024455415443>
- Gleich, S., & Hartmann, K. (2009). Hematology and Serum Biochemistry of Feline Immunodeficiency Virus-Infected and Feline Leukemia Virus-Infected Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 552-558. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0303.x>
- Gomes-Keller, M. A., Gönczi, E., Grenacher, B., Tandon, R., Hofman-Lehmann, R., & Lutz, H. (2009). Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acids: A transmission potential. *Veterinary Microbiology*, 134(3-4), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.011>
- Gomes-Keller, M. A., Gönczi, E., Tandon, R., Riondato, F., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M. L., & Lutz, H. (2006). Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Results with Those of Current Diagnostic Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 916-922. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.916-922.2006>
- Gomes-Keller, M. A., Tandon, R., Gönczi, E., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., & Lutz, H. (2006). Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*, 112(1), 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.027>
- González, S., & Affranchino, J. (2018). Properties and Functions of Feline Immunodeficiency Virus Gag Domains in Virion Assembly and Budding. *Viruses*, 10(5), 261. <https://doi.org/10.3390/v10050261>
- Greene, W. K., Meers, J., del Fierro, G., Carnegie, P. R., & Robinson, W. F. (1993). Extensive sequence variation of feline immunodeficiency virus env genes in isolates from naturally infected cats. *Archives of Virology*, 133(1-2), 51-62. <https://doi.org/10.1007/BF01309743>
- Guimaraes, A. M. S., Brandão, P. E., De Moraes, W., Cubas, Z. S., Santos, L. C., Villarreal, L. Y. B., Robes, R. R., Coelho, F. M., Resende, M., Santos, R. C. F., Oliveira, R. C., Yamaguti, M., Marques, L. M., Neto, R. L., Buzinhani, M., Marques, R., Messick, J. B., Biondo, A. W., & Timenetsky, J. (2009). Survey of feline leukemia virus and feline coronaviruses in captive neotropical wild felids from Southern Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(2), 360-364. <https://doi.org/10.1638/2008-0067.1>
- Halo, J. V., Pendleton, A. L., Jarosz, A. S., Gifford, R. J., Day, M. L., & Kidd, J. M. (2019). Origin and recent expansion of an endogenous gammaretroviral

- lineage in domestic and wild canids. *Retrovirology*, 16(1), 6.  
<https://doi.org/10.1186/s12977-019-0468-z>
- Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3-4), 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.003>
- Hartmann, K. (2012). Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses*, 4(11), 2684-2710. <https://doi.org/10.3390/v4112684>
- Hartmann, K., & Hofmann-Lehmann, R. (2020). What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 50(5), 1013-1036. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.05.006>
- Hayes, K., Rojko, J., Tarr, M., Polas, P., Olsen, R., & Mathes, L. (1989). Atypical localised viral expression in a cat with feline leukaemia. *Veterinary Record*, 124(13), 344-346. <https://doi.org/10.1136/vr.124.13.344>
- Hayward, J. J., & Rodrigo, A. G. (2008). Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. *Virology Journal*, 5(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-76>
- Hayward, J. J., & Rodrigo, A. G. (2010). Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(1-2), 68-74.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.011>
- Hofmann-Lehmann, R., & Hartmann, K. (2020). Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 22(9), 831-846. <https://doi.org/10.1177/1098612X20941785>
- Hofmann-Lehmann, R., Huder, J. B., Gruber, S., Boretti, F., Sigrist, B., & Lutz, H. (2001). Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of General Virology*, 82(7), 1589-1596. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-7-1589>
- Hofmann-Lehmann, R., Tandon, R., Boretti, F., Meli, M., Willi, B., Cattori, V., Gomes-Keller, M., Ossent, P., Golder, M., Flynn, J., & Lutz, H. (2006). Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine*, 24(8), 1087-1094.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.010>
- Hong, Y., Fink, E., Hu, Q.-Y., Kiesses, W. B., & Elder, J. H. (2010). OrfA Downregulates Feline Immunodeficiency Virus Primary Receptor CD134 on the Host Cell Surface and Is Important in Viral Infection. *Journal of Virology*, 84(14), 7225-7232. <https://doi.org/10.1128/JVI.00434-10>
- Hosie, M. J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G.,

- Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M. C., & Lloret, A. (2009). Feline Immunodeficiency: ABCD Guidelines on Prevention and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), 575-584. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.006>
- Hu, Q.-Y., Fink, E., Happer, M., & Elder, J. H. (2011). Identification of Amino Acid Residues Important for Heparan Sulfate Proteoglycan Interaction within Variable Region 3 of the Feline Immunodeficiency Virus Surface Glycoprotein. *Journal of Virology*, 85(14), 7108-7117. <https://doi.org/10.1128/JVI.00573-11>
- Huguet, M., Novo, S. G., & Bratanich, A. (2019). Detection of feline immunodeficiency virus subtypes A and B circulating in the city of Buenos Aires. *Archives of Virology*, 164(11), 2769-2774. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04363-1>
- Ito, J., Watanabe, S., Hiratsuka, T., Kuse, K., Odahara, Y., Ochi, H., Kawamura, M., & Nishigaki, K. (2013). Refrex-1, a Soluble Restriction Factor against Feline Endogenous and Exogenous Retroviruses. *Journal of Virology*, 87(22), 12029-12040. <https://doi.org/10.1128/JVI.01267-13>
- Jarrett, O., Hardy, W. D., Golder, M. C., & Hay, D. (1978). The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. *International Journal of Cancer*, 21(3), 334-337. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910210314>
- Jarrett, W. F. H., Crawford, E. M., Martin, W. B., & Davie, F. (1964). Leukæmia in the Cat: A Virus-like Particle associated with Leukæmia (Lymphosarcoma). *Nature*, 202(4932), 567-568. <https://doi.org/10.1038/202567a0>
- Jarrett, W. F. H., Martin, W. B., Crichton, G. W., Dalton, R. G., & Stewart, M. F. (1964). Leukæmia in the Cat: Transmission Experiments with Leukæmia (Lymphosarcoma). *Nature*, 202(4932), 566-567. <https://doi.org/10.1038/202566a0>
- Johnson, W. E. (2019). Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 355-370. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0189-2>
- Kakinuma, S., Motokawa, K., Hohdatsu, T., Yamamoto, J. K., Koyama, H., & Hashimoto, H. (1995). Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. *Journal of Virology*, 69(6), 3639-3646. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.6.3639-3646.1995>
- Kawakami, T. G., Theilen, G. H., Dungworth, D. L., Munn, R. J., & Beall, S. G. (1967). "C"-Type Viral Particles in Plasma of Cats with Feline Leukemia. *Science*, 158(3804), 1049-1050. <https://doi.org/10.1126/science.158.3804.1049>

- Kawamura, M., Watanabe, S., Odahara, Y., Nakagawa, S., Endo, Y., Tsujimoto, H., & Nishigaki, K. (2015). Genetic diversity in the feline leukemia virus gag gene. *Virus Research*, 204, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.04.008>
- Kawasaki, J., & Nishigaki, K. (2018). Tracking the Continuous Evolutionary Processes of an Endogenous Retrovirus of the Domestic Cat: ERV-DC. *Viruses*, 10(4), 179. <https://doi.org/10.3390/v10040179>
- Kim, F. J., Battini, J.-L., Manel, N., & Sitbon, M. (2004). Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture. *Virology*, 318(1), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.026>
- Kronic, M., Ertl, R., Hagen, B., Sedlazeck, F. J., Hofmann-Lehmann, R., von Haeseler, A., & Klein, D. (2015). Decreased expression of endogenous feline leukemia virus in cat lymphomas: a case control study. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0378-9>
- Kumar, D. V, Berry, B. T., & Roy-Burman, P. (1989). Nucleotide sequence and distinctive characteristics of the env gene of endogenous feline leukemia provirus. *Journal of Virology*, 63(5), 2379-2384. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.5.2379-2384.1989>
- Kuse, K., Ito, J., Miyake, A., Kawasaki, J., Watanabe, S., Makundi, I., Ngo, M. H., Otoi, T., & Nishigaki, K. (2016). Existence of Two Distinct Infectious Endogenous Retroviruses in Domestic Cats and Their Different Strategies for Adaptation to Transcriptional Regulation. *Journal of Virology*, 90(20), 9029-9045. <https://doi.org/10.1128/JVI.00716-16>
- Kyaw-Tanner, M. T., & Robinson, W. F. (1996). Quasispecies and naturally occurring superinfection in feline immunodeficiency virus infection. *Archives of Virology*, 141(9), 1703-1713. <https://doi.org/10.1007/BF01718293>
- Lacerda, L. C., Silva, A. N. da, Cruz, R. D. S., Freitas, J. de S., & Munhoz, R. A. S. & A. D. (2020). Hematological and biochemical aspects of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and feline leukemia. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 42(1), 1-7. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm110020>
- Lecollinet, S., & Richardson, J. (2008). Vaccination against the feline immunodeficiency virus: The road not taken. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(2-3), 167-190. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.07.007>
- Lee, D. Bin, Verstraete, F. J. M., & Arzi, B. (2020). An Update on Feline Chronic Gingivostomatitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 50(5), 973-982. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.04.002>
- Leutenegger, C. M., Hofmann-Lehmann, R., Riols, C., Liberek, M., Worel, G.,



- Lups, P., Fehr, D., Hartmann, M., Weilenmann, P., & Lutz, H. (1999). Viral infections in free-living populations of the European wildcat. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(4), 678–686. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.4.678>
- Levy, J. K., Crawford, P. C., & Tucker, S. J. (2017). Performance of 4 Point-of-Care Screening Tests for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), 521–526. <https://doi.org/10.1111/jvim.14648>
- Little, S., Levy, J., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M., Olah, G., & Denis, K. S. (2020). 2020 AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 22(1), 5–30. <https://doi.org/10.1177/1098612X19895940>
- Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., & Horzinek, M. C. (2009). Feline Leukaemia: ABCD Guidelines on Prevention and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.005>
- MacDonald, K., Levy, J. K., Tucker, S. J., & Crawford, P. C. (2004). Effects of passive transfer of immunity on results of diagnostic tests for antibodies against feline immunodeficiency virus in kittens born to vaccinated queens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(10), 1554–1557. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.225.1554>
- Mackey, L., Jarrett, W., Jarrett, O., & Laird, H. (1975). Anemia Associated With Feline Leukemia Virus Infection in Cats. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 54(1), 209–217. <https://doi.org/10.1093/jnci/54.1.209>
- MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2017a). Retroviridae. In *Fenner's Veterinary Virology* (pp. 269–297). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00014-3>
- MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2017b). Virus Replication. In *Fenner's Veterinary Virology* (pp. 17–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00002-7>
- Madewell, B., & Jarrett, O. (1983). Recovery of feline leukaemia virus from non-viraemic cats. *Veterinary Record*, 112(15), 339–342. <https://doi.org/10.1136/vr.112.15.339>
- Magden, E., Quackenbush, S. L., & VandeWoude, S. (2011). FIV associated neoplasms—A mini-review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3–4), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.016>
- Major, A., Cattori, V., Boenzli, E., Riond, B., Ossent, P., Meli, M. L., Hofmann-

- Lehmann, R., & Lutz, H. (2010). Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Veterinary Research*, 41(2), 17. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009065>
- Malfavon-Borja, R., & Feschotte, C. (2015). Fighting Fire with Fire: Endogenous Retrovirus Envelopes as Restriction Factors. *Journal of Virology*, 89(8), 4047-4050. <https://doi.org/10.1128/JVI.03653-14>
- Mang, R., Goudsmit, J., & van der Kuyl, A. C. (1999). Novel Endogenous Type C Retrovirus in Baboons: Complete Sequence, Providing Evidence for Baboon Endogenous Virusgag-pol Ancestry. *Journal of Virology*, 73(8), 7021-7026. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.7021-7026.1999>
- Marker, L., Munson, L., Basson, P. A., & Quackenbush, S. (2003). Multicentric T-cell lymphoma associated with feline leukemia virus infection in a captive Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 690-695. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.690>
- Mata, H., Gongora, J., Eizirik, E., Alves, B. M., Soares, M. A., & Ravazzolo, A. P. (2015). Identification and characterization of diverse groups of endogenous retroviruses in felids. *Retrovirology*, 12(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0152-x>
- Matsumoto, H., Takemura, N., Sako, T., Koyama, H., Motoyoshi, S., & Inada, Y. (1997). Serum Concentration of Circulating Immune Complexes in Cats Infected with Feline Immunodeficiency Virus Detected by Immune Adherence Hemagglutination Method. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(5), 395-396. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.395>
- McDougall, A. S., Terry, A., Tzavaras, T., Cheney, C., Rojko, J., & Neil, J. C. (1994). Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *Journal of Virology*, 68(4), 2151-2160. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.4.2151-2160.1994>
- Meeker, R., & Hudson, L. (2017). Feline Immunodeficiency Virus Neuropathogenesis: A Model for HIV-Induced CNS Inflammation and Neurodegeneration. *Veterinary Sciences*, 4(4), 14. <https://doi.org/10.3390/vetsci4010014>
- Meichner, K., Kruse, D. B., Hirschberger, J., & Hartmann, K. (2012). Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *Veterinary Record*, 171(14), 348-348. <https://doi.org/10.1136/vr.100813>
- Meli, M. L., Cattori, V., Martínez, F., López, G., Vargas, A., Palomares, F., López-Bao, J. V., Hofmann-Lehmann, R., & Lutz, H. (2010). Feline leukemia virus infection: A threat for the survival of the critically endangered Iberian lynx

- (*Lynx pardinus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(1-2), 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.010>
- Meli, M. L., Cattori, V., Martínez, F., López, G., Vargas, A., Simón, M. A., Zorrilla, I., Muñoz, A., Palomares, F., López-Bao, J. V., Pastor, J., Tandon, R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., & Lutz, H. (2009). Feline Leukemia Virus and Other Pathogens as Important Threats to the Survival of the Critically Endangered Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *PLoS ONE*, 4(3), e4744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004744>
- Mendoza, R., Anderson, M. M., & Overbaugh, J. (2006). A Putative Thiamine Transport Protein Is a Receptor for Feline Leukemia Virus Subgroup A. *Journal of Virology*, 80(7), 3378-3385. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3378-3385.2006>
- Miró, G., Doménech, A., Escolar, E., Collado, V. M., Tejerizo, G., De Las Heras, A., & Gómez-Lucía, E. (2007). Plasma Electrophoretogram in Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and/or Feline Leukaemia Virus (FeLV) Infections. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 54(4), 203-209. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00902.x>
- Miyake, A., Watanabe, S., Hiratsuka, T., Ito, J., Ngo, M. H., Makundi, I., Kawasaki, J., Endo, Y., Tsujimoto, H., & Nishigaki, K. (2016). Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the env Gene. *Journal of Virology*, 90(9), 4832-4837. <https://doi.org/10.1128/JVI.03229-15>
- Miyazawa, T. (2002). Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Frontiers in Bioscience*, 7(4), A791. <https://doi.org/10.2741/A791>
- Miyazawa, T., & Jarrett, O. (1997). Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Archives of Virology*, 142(2), 323-332. <https://doi.org/10.1007/s007050050079>
- Murakami, T. (2012). Retroviral Env Glycoprotein Trafficking and Incorporation into Virions. *Molecular Biology International*, 2012, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/682850>
- Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., & Rein, A. (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9), 5246-5251. <https://doi.org/10.1073/pnas.091000398>
- Nesina, S., Katrin Helfer-Hungerbuehler, A., Riond, B., Boretto, F. S., Willi, B., Meli, M. L., Grest, P., & Hofmann-Lehmann, R. (2015). Retroviral DNA—the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. *Retrovirology*, 12(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0231-z>

- Ngo, M. H., Soma, T., Youn, H.-Y., Endo, T., Makundi, I., Kawasaki, J., Miyake, A., Nga, B. T. T., Nguyen, H., Arnal, M., Fernández de Luco, D., Deshapriya, R. M. C., Hatoya, S., & Nishigaki, K. (2020). Distribution of infectious endogenous retroviruses in mixed-breed and purebred cats. *Archives of Virology*, *165*(1), 157-167. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04454-z>
- Ogilvie, G. K., Tompkins, M. B., & Tompkins, W. A. F. (1988). Clinical and immunologic aspects of FeLV-induced immunosuppression. *Veterinary Microbiology*, *17*(3), 287-296. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90070-3)
- Older, C. E., Gomes, M. D. O. S., Hoffmann, A. R., Policano, M. D., Reis, C. A. C. dos, Carregaro, A. B., Ambrósio, C. E., & Carregaro, V. M. L. (2020). Influence of the FIV Status and Chronic Gingivitis on Feline Oral Microbiota. *Pathogens*, *9*(5), 383. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050383>
- Ortega-Pacheco, A., Aguilar-Caballero, A. J., Colin-Flores, R. F., Acosta-Viana, K. Y., Guzman-Marin, E., & Jimenez-Coello, M. (2014). Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *16*(6), 460-464. <https://doi.org/10.1177/1098612X13509995>
- Overbaugh, J., Riedel, N., Hoover, E. A., & Mullins, J. I. (1988). Transduction of endogenous envelope genes by feline leukaemia virus in vitro. *Nature*, *332*(6166), 731-734. <https://doi.org/10.1038/332731a0>
- Pancino, G., Chappey, C., Saurin, W., & Sonigo, P. (1993). B epitopes and selection pressures in feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology*, *67*(2), 664-672. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.2.664-672.1993>
- Pare, A., Ellis, A., & Juette, T. (2022). Clinicopathological findings of FeLV-positive cats at a secondary referral center in Florida, USA (2008-2019). *PLOS ONE*, *17*(4), e0266621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266621>
- Pedersen, F. S., Pyrz, M., & Duch, M. (2011). Retroviral Replication. In *eLS* (pp. 1-10). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000430.pub3>
- Pedersen, N. C., Ho, E. W., Brown, M. L., & Yamamoto, J. K. (1987). Isolation of a T-Lymphotropic Virus from Domestic Cats with an Immunodeficiency-Like Syndrome. *Science*, *235*(4790), 790-793. <https://doi.org/10.1126/science.3643650>
- Perharić, M., Biđin, M., Starešina, V., Milas, Z., Turk, N., Štritof, Z., Hađina, S., Habuš, J., Stevanović, V., Mojčec-Perko, V., Kovač, S., Martinković, K., & Barbić, L. (2016). Phylogenetic characterisation of feline immunodeficiency virus in naturally infected cats in Croatia indicates additional heterogeneity of subtype B in Europe. *Archives of Virology*, *161*(9), 2567-2573.

<https://doi.org/10.1007/s00705-016-2928-2>

- Phillips, T. R., Talbott, R. L., Lamont, C., Muir, S., Lovelace, K., & Elder, J. H. (1990). Comparison of two host cell range variants of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, *64*(10), 4605-4613. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.10.4605-4613.1990>
- Polani, S., Roca, A. L., Rosensteel, B. B., Kolokotronis, S.-O., & Bar-Gal, G. K. (2010). Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*, *405*(2), 397-407. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.010>
- Powers, J. A., Chiu, E. S., Kraberger, S. J., Roelke-Parker, M., Lowery, I., Erbeck, K., Troyer, R., Carver, S., & VandeWoude, S. (2018). Feline Leukemia Virus (FeLV) Disease Outcomes in a Domestic Cat Breeding Colony: Relationship to Endogenous FeLV and Other Chronic Viral Infections. *Journal of Virology*, *92*(18), JVI.00649-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00649-18>
- Quigley, J. G., Burns, C. C., Anderson, M. M., Lynch, E. D., Sabo, K. M., Overbaugh, J., & Abkowitz, J. L. (2000). Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood*, *95*(3), 1093-1099. [https://doi.org/10.1182/blood.V95.3.1093.003k01\\_1093\\_1099](https://doi.org/10.1182/blood.V95.3.1093.003k01_1093_1099)
- Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., & Abkowitz, J. L. (2004). Identification of a Human Heme Exporter that Is Essential for Erythropoiesis. *Cell*, *118*(6), 757-766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.014>
- Rabson, A., & Graves, B. (1997). Synthesis and Processing of Viral RNA. In *Retroviruses*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21433339>
- Ramírez, H., Autran, M., García, M. M., Carmona, M. Á., Rodríguez, C., & Martínez, H. A. (2016). Genotyping of feline leukemia virus in Mexican housecats. *Archives of Virology*, *161*(4), 1039-1045. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2740-4>
- Reggeti, F., & Bienzle, D. (2004). Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. *Journal of General Virology*, *85*(7), 1843-1852. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19743-0>
- Rimmelzwaan, G. F., Siebelink, K. H. J., Broos, H., Drost, G. A., Weijer, K., van Herwijnen, R., & Osterhaus, A. D. M. E. (1994). gag- and env-specific serum antibodies in cats after natural and experimental infection with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Microbiology*, *39*(1-2), 153-165. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90096-5)
- Roca, A. L., Nash, W. G., Menninger, J. C., Murphy, W. J., & O'Brien, S. J. (2005). Insertional Polymorphisms of Endogenous Feline Leukemia Viruses. *Journal*

of *Virology*, 79(7), 3979-3986. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.3979-3986.2005>

- Roca, A. L., Pecon-Slattery, J., & O'Brien, S. J. (2004). Genomically Intact Endogenous Feline Leukemia Viruses of Recent Origin. *Journal of Virology*, 78(8), 4370-4375. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4370-4375.2004>
- Rojko, J. L., Hoover, E. A., Quackenbush, S. L., & Olsen, R. G. (1982). Reactivation of latent feline leukaemia virus infection. *Nature*, 298(5872), 385-388. <https://doi.org/10.1038/298385a0>
- Ryu, W.-S. (2017). Retroviruses. In *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (pp. 227-246). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00017-5>
- Shimajima, M., Miyazawa, T., Ikeda, Y., McMonagle, E. L., Haining, H., Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M. J., & Willett, B. J. (2004). Use of CD134 As a Primary Receptor by the Feline Immunodeficiency Virus. *Science*, 303(5661), 1192-1195. <https://doi.org/10.1126/science.1092124>
- Soe, L. H., Shimizu, R. W., Landolph, J. R., & Roy-Burman, P. (1985). Molecular analysis of several classes of endogenous feline leukemia virus elements. *Journal of Virology*, 56(3), 701-710. <https://doi.org/10.1128/jvi.56.3.701-710.1985>
- Song, N., Jo, H., Choi, M., Kim, J.-H., Seo, H. G., Cha, S.-Y., Seo, K., & Park, C. (2013). Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in silico data analysis. *Journal of General Virology*, 94(7), 1587-1596. <https://doi.org/10.1099/vir.0.051862-0>
- Steinrigl, A., & Klein, D. (2003). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *Journal of General Virology*, 84(5), 1301-1307. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18736-0>
- Stewart, H., Jarrett, O., Hosie, M. J., & Willett, B. J. (2011). Are endogenous feline leukemia viruses really endogenous? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3-4), 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.011>
- Stewart, H., Jarrett, O., Hosie, M. J., & Willett, B. J. (2013). Complete Genome Sequences of Two Feline Leukemia Virus Subgroup B Isolates with Novel Recombination Sites. *Genome Announcements*, 1(1), 1-2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00036-12>
- Stewart, M. A., Warnock, M., Wheeler, A., Wilkie, N., Mullins, J. I., Onions, D. E., & Neil, J. C. (1986). Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *Journal of Virology*, 58(3),

825-834.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=252989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Sykes, J. E. (2014). Feline Immunodeficiency Virus Infection. In *Canine and Feline Infectious Diseases* (Issue January, pp. 209-223). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00021-1>
- Sykes, J. E., & Hartmann, K. (2014). Feline Leukemia Virus Infection. In *Canine and Feline Infectious Diseases* (Issue January, pp. 224-238). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00022-3>
- Taylor, C. S., Willett, B. J., & Kabat, D. (1999). A Putative Cell Surface Receptor for Anemia-Inducing Feline Leukemia Virus Subgroup C Is a Member of a Transporter Superfamily. *Journal of Virology*, 73(8), 6500-6505.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6500-6505.1999>
- Takeuchi, Y., Vile, R. G., Simpson, G., O'Hara, B., Collins, M. K., & Weiss, R. A. (1992). Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus. *Journal of Virology*, 66(2), 1219 LP - 1222. <http://jvi.asm.org/content/66/2/1219.abstract>
- Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, M. A., Meli, M. L., Golder, M. C., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2005). Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 130(1-2), 124-132.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.06.017>
- Tandon, R., Cattori, V., Pepin, A. C., Riond, B., Meli, M. L., McDonald, M., Doherr, M. G., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2008). Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research*, 135(1), 136-143.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.02.016>
- Tandon, R., Cattori, V., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2008). Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1-2), 129-133.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.027>
- Tandon, R., Cattori, V., Willi, B., Meli, M. L., Gomes-Keller, M. A., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2007). Copy number polymorphism of endogenous feline leukemia virus-like sequences. *Molecular and Cellular Probes*, 21(4), 257-266. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.01.003>
- Tangsudjai, S., Malidang, S., Phonarknguen, R., Boonyarittichaikit, R., Pattanarangsarn, R., Buddhirongawatr, R., & Chaichoun, K. (2010). Feline Leukemia Virus (FeLV) in Captive Wild Felids in Thailand during 2004-2005.

*Journal of Applied Animal Welfare Science*, 3(1-3), 25-31.

<https://www.researchgate.net/publication/234839354>[http://www.researchgate.net/publication/234839354\\_Feline\\_Leukemia\\_Virus\\_\(FeLV\)\\_in\\_Captive\\_Wild\\_Felids\\_in\\_Thailand\\_during\\_2004-2005](http://www.researchgate.net/publication/234839354_Feline_Leukemia_Virus_(FeLV)_in_Captive_Wild_Felids_in_Thailand_during_2004-2005)

- Taniwaki, S. A., Figueiredo, A. S., & Araujo Jr., J. P. (2013). Virus-host interaction in feline immunodeficiency virus (FIV) infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(6), 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.001>
- Teixeira, B. M., Taniwaki, S. A., Menezes, P. M. M., Rodrigues, A. K. P. P., Mouta, A. N., Arcebispo, T. L. M., Braz, G. F., da Cruz, J. C. M., Brandão, P. E., Heinemann, M. B., Silva, M. X., & Hosie, M. J. (2019). Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 5(2), 205511691985911. <https://doi.org/10.1177/2055116919859112>
- Thengchaisri, N., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., & Sattasathuchana, P. (2017). Association of gingivitis with dental calculus thickness or dental calculus coverage and subgingival bacteria in feline leukemia virus- and feline immunodeficiency virus-negative cats. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 81(1), 46-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28154463>
- Torres, A. N., Mathiason, C. K., & Hoover, E. A. (2005). Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*, 332(1), 272-283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.050>
- Torres, A. N., O'Halloran, K. P., Larson, L. J., Schultz, R. D., & Hoover, E. A. (2008). Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1-2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.013>
- Troyer, J. L., Pecon-Slattery, J., Roelke, M. E., Johnson, W., VandeWoude, S., Vazquez-Salat, N., Brown, M., Frank, L., Woodroffe, R., Winterbach, C., Winterbach, H., Hemson, G., Bush, M., Alexander, K. A., Revilla, E., & O'Brien, S. J. (2005). Seroprevalence and Genomic Divergence of Circulating Strains of Feline Immunodeficiency Virus among Felidae and Hyaenidae Species. *Journal of Virology*, 79(13), 8282-8294. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8282-8294.2005>
- Tzavaras, T., Stewart, M., McDougall, A., Fulton, R., Testa, N., Onions, D. E., & Neil, J. C. (1990). Molecular cloning and characterization of a defective recombinant feline leukaemia virus associated with myeloid leukaemia. *Journal of General Virology*, 71(2), 343-354. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-2-343>
- Vail, D. M., Thamm, D. H., & Liptak, J. M. (2020). The Etiology of Cancer. In



- Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (Vol. 2, Issue 2011, pp. 1-35). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-59496-7.00001-3>
- van der Kuyl, A. C., Dekker, J. T., & Goudsmit, J. (1999). Discovery of a New Endogenous Type C Retrovirus (FcEV) in Cats: Evidence for RD-114 Being an FcEV Gag-Pol/Baboon Endogenous Virus BaEV Env Recombinant. *Journal of Virology*, *73*(10), 7994-8002. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.7994-8002.1999>
- van der Kuyl, A. C., Mang, R., Dekker, J. T., & Goudsmit, J. (1997). Complete nucleotide sequence of simian endogenous type D retrovirus with intact genome organization: evidence for ancestry to simian retrovirus and baboon endogenous virus. *Journal of Virology*, *71*(5), 3666-3676. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.5.3666-3676.1997>
- Vobis, M., D'Haese, J., Mehlhorn, H., & Mencke, N. (2003). Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology Research*, *91*(6), 467-470. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0949-8>
- Watanabe, S., Kawamura, M., Odahara, Y., Anai, Y., Ochi, H., Nakagawa, S., Endo, Y., Tsujimoto, H., & Nishigaki, K. (2013). Phylogenetic and Structural Diversity in the Feline Leukemia Virus Env Gene. *PLoS ONE*, *8*(4), e61009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061009>
- Weaver, E. A. (2010). A Detailed Phylogenetic Analysis of FIV in the United States. *PLoS ONE*, *5*(8), e12004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012004>
- Westman, M., Coggins, S., van Dorselaer, M., Norris, J., Squires, R., Thompson, M., & Malik, R. (2022). Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic pet cats in Australia and New Zealand: Guidelines for diagnosis, prevention and management. *Australian Veterinary Journal*, *100*(8), 345-359. <https://doi.org/10.1111/avj.13166>
- Westman, M. E., Malik, R., Hall, E., Sheehy, P. A., & Norris, J. M. (2015). Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *42*, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.07.004>
- Westman, M., Malik, R., & Norris, J. (2019). Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. *Australian Veterinary Journal*, *97*(3), 47-55. <https://doi.org/10.1111/avj.12781>
- Westman, M., Norris, J., Malik, R., Hofmann-Lehmann, R., Harvey, A., McLuckie, A., Perkins, M., Schofield, D., Marcus, A., McDonald, M., Ward, M., Hall, E.,

- Sheehy, P., & Hosie, M. (2019). The Diagnosis of Feline Leukaemia Virus (FeLV) Infection in Owned and Group-Housed Rescue Cats in Australia. *Viruses*, 11(6), 503. <https://doi.org/10.3390/v11060503>
- Willett, B. J., & Hosie, M. J. (2008). Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: Unravelling feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1-2), 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.012>
- Willett, B. J., & Hosie, M. J. (2013). Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. *The Veterinary Journal*, 195(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.004>
- Willett, B. J., Kraase, M., Logan, N., McMonagle, E., Varela, M., & Hosie, M. J. (2013). Selective Expansion of Viral Variants following Experimental Transmission of a Reconstituted Feline Immunodeficiency Virus Quasispecies. *PLoS ONE*, 8(1), e54871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054871>
- Yoshikawa, R., Takeuchi, J. S., Yamada, E., Nakano, Y., Misawa, N., Kimura, Y., Ren, F., Miyazawa, T., Koyanagi, Y., & Sato, K. (2017). Feline Immunodeficiency Virus Evolutionarily Acquires Two Proteins, Vif and Protease, Capable of Antagonizing Feline APOBEC3. *Journal of Virology*, 91(11). <https://doi.org/10.1128/JVI.00250-17>

## 10. APÉNDICES

Cuadro 2. Características clínico - hematológicas y resultado de las pruebas diagnósticas de los gatos domésticos incluidos en este estudio.

ID	Raza	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico clínico	Hemograma	PCR-env	PCR-enFeLV	RT-PCR enFeLV	PCR-exFeLV	RT-PCR exFeLV	qPCR-exFeLV	RT-qPCR-exFeLV	PCR-FIV	RT-PCR FIV	FIV Ab	FeLV Ag
G01	Europeo doméstico	9	Macho	Gingivostomatitis	Linfopenia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	Europeo doméstico	1	Macho	Sin signos clínicos	Trombocitopenia y Monocitosis	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
G03	Doméstico mexicano	3	Hembra	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G04	Europeo doméstico	1.5	Macho	Depresión y anorexia	Anisocitosis eritrocitaria	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
G05	Doméstico mexicano	0.6	Hembra	Depresión y anorexia	Linfocitosis	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
G06	Doméstico mexicano	2	Macho	Depresión y anorexia	Neutrofilia	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G07	Doméstico mexicano	1	Macho	Depresión y anorexia	Linfocitosis	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G08	Doméstico mexicano	0.5	Macho	Depresión y anorexia	Linfocitosis y Neutrofilia	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G09	Doméstico mexicano	2	Hembra	Sin signos clínicos	Linfocitosis	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G10	Doméstico mexicano	2.5	Hembra	Depresión y anorexia	Neutrofilia	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G11	Europeo doméstico	2	Macho	Depresión y anorexia	Linfopenia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G12	Europeo doméstico	0.5	Macho	Depresión y anorexia	Sin alteraciones	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G13	Doméstico mexicano	1.5	Hembra	Fiebre	Sin alteraciones	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G14	Doméstico mexicano	13	Hembra	Emaciación	Sin alteraciones	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-


G15	Europeo doméstico	11	Hembra	Adenocarcinoma mamario	Neutropenia	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G16	Doméstico mexicano	0.5	Macho	Lesiones por mordidas	Eosinofilia	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
G17	Doméstico mexicano	7	Hembra	Vómito, ictericia	Linfopenia y Trombocitopenia	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
G18	Europeo doméstico	2	Macho	Derrame pleural	Anemia no regenerativa	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
G19	Europeo doméstico	0.5	Macho	Pulicosis	Sin alteraciones	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
G20	Doméstico mexicano	2	Macho	Gingivoestomatitis	Eosinofilia	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
G21	Doméstico mexicano	3	Macho	Gingivoestomatitis	Neutrofilia	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
G22	Europeo doméstico	1	Macho	Diarrea y emaciación	Neutrofilia	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
G23	Doméstico mexicano	1.5	Hembra	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
G24	Europeo doméstico	1	Macho	Sialocele sublingual	Anemia regenerativa, eosinofilia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G25	Doméstico mexicano	7	Hembra	Depresión y anorexia	Anemia no regenerativa, neutropenia y linfopenia	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
G26	Doméstico mexicano	1	Macho	Gingivitis	Sin alteraciones	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
G27	Doméstico mexicano	1	Hembra	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
G28	Europeo doméstico	1	Macho	Diarrea y emaciación	Sin alteraciones	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
G29	Europeo doméstico	12	Macho	Gingivitis	Neutrofilia y monocitosis	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G30	Europeo doméstico	12	Hembra	Diarrea y vómito	Neutrofilia, eosinofilia	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G31	Europeo doméstico	1.5	Macho	Gingivitis	Linfocitosis, neutrofilia y eosinofilia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G32	Europeo doméstico	0.5	Hembra	Diarrea, vómito y emaciación	Neutrofilia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

G33	Europeo doméstico	1	Macho	Sin signos clínicos	Eosinofilia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G34	Doméstico mexicano	1	Macho	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G35	Europeo doméstico	15	Hembra	Diarrea y emaciación	Neutrofilia	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G36	Doméstico mexicano	1	Hembra	Sin signos clínicos	Neutropenia leve	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
G37	Europeo doméstico	8	Hembra	Linfoma cutáneo	Linfocitosis y trombocitopenia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G38	Doméstico mexicano	7	Hembra	Linfoma	Anemia no regenerativa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
G39	Doméstico mexicano	11	Hembra	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G40	Doméstico mexicano	15	Hembra	Sin signos clínicos	Eosinofilia	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G41	Europeo doméstico	1.5	Macho	Sin signos clínicos	Eosinofilia	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G42	Doméstico mexicano	9	Hembra	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G43	Europeo doméstico	1	Macho	Sin signos clínicos	Linfocitosis	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G44	Doméstico mexicano	2	Macho	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G45	Doméstico mexicano	1	Macho	Mucosas pálidas	Eosinofilia	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G46	Europeo doméstico	2	Hembra	Pulicosis	Sin alteraciones	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G47	Europeo doméstico	2.5	Macho	Pulicosis	Eosinofilia	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G48	Doméstico mexicano	1.5	Hembra	Pulicosis	Sin alteraciones	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G49	Europeo doméstico	0.5	Macho	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G50	Doméstico mexicano	6	Hembra	Sin signos clínicos	Sin alteraciones	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

[Home](#) > [Archives of Virology](#) > [Article](#)

[Published: 19 December 2022](#)

## Detection and genetic characterization of feline retroviruses in domestic cats with different clinical signs and hematological alterations

[Gabriel Eduardo Acevedo-Jiménez](#), [Rosa Elena SarmientoSilva](#), [Rogelio Alejandro Alonso-Morales](#), [Rodolfo CórdovaPonce](#) & [Hugo Ramírez-Álvarez](#) 

[Archives of Virology](#) **168**, Article number: 2 (2023)

**173** Accesses | **1** Altmetric | [Metrics](#)

### Abstract

---

Feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) are globally distributed retroviruses that infect domestic cats and cause various syndromes that can lead to death. The aim of this study was to detect and genotype feline retroviruses in Mexican domestic cats. We used PCR assays to identify proviral DNA and viral RNA in 50 domestic cats with different clinical signs and hematological alterations. Endogenous FeLV (enFeLV) was identified in the genomic DNA of all cats in the study, and we detected transcripts of the LTR region of enFeLV in 48 individuals. Exogenous FeLV (exFeLV) was found in 13 cats. Furthermore, we detected FIV proviral DNA in 10 cats. The enFeLV sequences were shown to be the most variable, while the exFeLV sequences were highly conserved and related to previously reported subgroup A sequences. Sequencing of the FIV *gag* gene revealed the presence of subtype B in the infected cats.

---

## Acknowledgements

---

We thank the veterinarians who kindly assisted with the collection of the samples for this study. Gabriel Eduardo Acevedo Jiménez is a doctoral student in the program Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM, supported by a CONACyT grant scholarship.

## Funding

---

This study was funded by CI2224 FESC, UNAM, and by FOP02-2021-04 CONACyT project 316257.

## About this article

---

### Cite this article

Acevedo-Jiménez, G.E., Sarmiento-Silva, R.E., Alonso-Morales, R.A. *et al.* Detection and genetic characterization of feline retroviruses in domestic cats with different clinical signs and hematological alterations. *Arch Virol* **168**, 2 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05627-z>

DOI

<https://doi.org/10.1007/s00705-022-05627-z>

Not logged in - 201.121.47.195 Not affiliated

**SPRINGER NATURE**

© 2023 Springer Nature Switzerland AG. Part of [Springer Nature](#).

**Detection and genetic characterization of feline retroviruses in domestic cats  
with different clinical signs and hematological alterations**

Gabriel Eduardo Acevedo-Jiménez<sup>1</sup>, Rosa Elena Sarmiento-Silva<sup>2</sup>, Rogelio Alejandro Alonso-Morales<sup>2</sup>, Rodolfo Córdova-Ponce<sup>1</sup>, Hugo Ramírez-Álvarez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Virology, Genetics and Molecular Biology Laboratory. Faculty of Higher Studies, Cuautitlan, Veterinary Medicine, Campus 4. National Autonomous University of Mexico.

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico, University City, Mexico City, Mexico.

\*Corresponding author: Hugo Ramírez Álvarez, FES Cuautitlán, UNAM, México. Ctra. Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP. 54714.

Tel: +52 555 623 1920; e-mail: [ramiralh@unam.mx](mailto:ramiralh@unam.mx)

Gabriel Eduardo Acevedo-Jiménez: <https://orcid.org/0000-0002-2026-9918>

Rosa Elena Sarmiento-Silva: <https://orcid.org/0000-0001-7430-5657>

Rogelio Alejandro Alonso-Morales: <https://orcid.org/0000-0002-4159-1682>

Hugo Ramírez-Álvarez: <https://orcid.org/0000-0003-1682-8104>



## **Abstract**

Feline leukemia (FeLV) and immunodeficiency (FIV) viruses are globally distributed retroviruses that infect domestic cats and cause various syndromes, which can lead to death. The aim of our study was to detect and genotyping feline retroviruses in Mexican domestic cats. We used PCR assays to identify proviral DNA and viral RNA in 50 domestic cats with different clinical signs and hematological alterations. Endogenous FeLV (enFeLV) was identified in the genomic DNA samples from all cats in the study, and we detected enFeLV transcripts of LTR region in 48 individuals. Exogenous FeLV (exFeLV) was found in 13 cats. Furthermore, we detected FIV proviral DNA in ten cats. The enFeLV sequences were shown to be the most variable, while the exFeLV sequences were highly conserved and related to previously described subgroup A sequences. Additionally, FIV *gag* gene sequences revealed the presence of subtype B in the infected cats.

**Keywords:** FeLV; FIV; Endogenous retroviruses; PCR; Genotyping

The viruses that cause feline leukemia and immunodeficiency are globally distributed retroviruses that infect domestic cats and cause different syndromes that can lead to the death of infected animals [1]. Genetically, retroviruses are made up of three main genes: *gag*, which codes for structural proteins (matrix, capsid, and nucleocapsid), *pol*, which codes for enzymes that participate in viral replication (protease, integrase, and reverse transcriptase), and *env*, which codes for envelope proteins (transmembrane and surface). The retrovirus genome is flanked by non-translatable regulatory sequences called long terminal repeats (LTRs) [2]. Additionally, the feline immunodeficiency virus (FIV) genome contains three accessory genes (*vif*, *ORF A*, and *rev*) that are related to viral infectivity and replication [3].

Feline leukemia virus (FeLV) can be categorized as either endogenous or exogenous depending on how it is transmitted. Exogenous FeLV (exFeLV) is transmitted horizontally as an infectious agent. Endogenous FeLV (enFeLV) is part of the genome of species in the *Felis* genus, including domestic cats (*Felis silvestris catus*), and it is passed from parents to offspring [4].

Genomically intact, full-length enFeLV sequences have been detected in the genome of domestic cats [4]. While enFeLV have not been shown to directly induce disease presentation in their host, they are relevant to FeLV biology. Namely, enFeLV are expressed in various tissues and they are involved in the generation of new exogenous variants through recombination like FeLV-B, which increases their pathogenicity [5–7].

Nucleotide sequences in enFeLV and exFeLV are about 86% similar [2]. However, differences found in the LTR genetic region allow for differential PCR amplification of either endogenous or exogenous FeLV sequences [8, 9].

Taxonomically, exFeLV is placed in the order *Ortervirales*, family *Retroviridae*, subfamily *Orthoretrovirinae*, genus *Gammaretrovirus* [10]. Based on its genetic and functional relationships, exFeLV is divided into subgroups [11]. The main subgroups described to date are A, B, C, D and T, which differ in their degree of pathogenicity and therefore in the course of disease infection and presentation [12].

FeLV subgroup A (FeLV-A) is the most frequently described and least pathogenic type [11, 13]. FeLV-B arises through recombination of FeLV-A with enFeLV within the host, primarily in the *env* gene [14, 15]. FeLV-B is mainly associated with development of leukemia and lymphoma [16]. FeLV-C develops from *de novo* mutations in the FeLV-A *env* gene, and it has been associated with the development of aplastic anemia [17]. FeLV-D originated from recombination of FeLV *gag-pol* genetic regions with the domestic cat endogenous retrovirus (ERV-DC) *env* gene. This subgroup was detected in cats that developed hematologic neoplasms, including lymphoma and leukemia [18]. FeLV-T is a variant of FeLV-A that has insertions and deletions in the *env* gene. It presents T-lymphocyte tropism and induces an immunosuppressive disorder described as feline acquired immunodeficiency syndrome (FeLV-FAIDS) [19, 20].

FeLV infection is generally associated with hematological disorders, including cytopenias and neoplasms such as leukemia and lymphoma, which frequently lead to the death of infected cats [21]. Once a cat is infected with the virus, the infection can follow one of four different courses: abortive infection, progressive infection, regressive infection, and focal (atypical) infection [1].

FIV is taxonomically placed in the order *Ortervirales*, family *Retroviridae*, subfamily *Orthoretrovirinae*, genus *Lentivirus* [10], and infects animals in the Hyaenidae and Felidae families. FIV can cause an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in domestic cats that begins with a latent phase. This is followed by decreased CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, which, in turn, lead to an increased risk of opportunistic infections, neurological diseases and neoplasms. However, FIV does not cause a severe clinical syndrome in most cats infected naturally. With proper care, infected cats can live for many years and die at an advanced age from causes unrelated to infection with this retrovirus [1].

FIV is classified into subtypes A – F, based on *env* genetic region divergence. Subtype A has been found in Australia, New Zealand, the United States, South Africa, and in northeastern Europe. Subtype B has been found in the United States, central and southern Europe, Brazil, and Japan. Subtype C has been identified in Canada, New

Zealand, and Southeast Asia. Subtype D has been reported in Japan and Vietnam, subtype E in Argentina, and subtype F in the United States [22, 23].

It is important to consider feline retroviral genetic diversity, and to identify the viral types that are present and may be predominant in a particular region. These types of studies can generate information on the efficacy of diagnostic tools. In this study, we set out to detect feline retroviruses using PCR and RT-PCR from peripheral blood leukocytes and blood plasma. Our goal was to identify the retroviral genotypes present in Mexican domestic cats that had different clinical signs and hematological alterations.

The study included 50 cats (27 males and 23 females) that were at least six months old, which were patients either at private clinics or at the University Small Animal Hospital (Hospital de Pequeñas Especies of the FES-C, UNAM) in the State of Mexico. A convenience sampling was carried out in which animals that presented clinical signs compatible with retroviral infection were included; mainly, oral disease, abscess, and hematological alterations; as well as cats that, according to their lifestyle, had risk factors associated with these infections, such as non-neutered animals, with access to the outside, in contact with infected animals, from animal shelters and/or rescued stray cats. Hemograms were performed on blood samples obtained by puncture of the radial or jugular vein in tubes with EDTA (BD Vacutainer® with EDTA K2, Mexico). Peripheral blood leukocytes (PBL) and blood plasma were obtained by centrifugation. These were then stored at -75 °C until use.

Genomic DNA extraction from PBL was performed using the commercial FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan), and following the manufacturer's instructions. RNA was extracted from blood plasma with FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Taiwan) and treated with enzyme ezDNAase™, Invitrogen™ (Thermo Scientific™, USA) to eliminate contaminating genomic DNA. Both DNA and RNA were quantified with a Nanodrop Lite™ spectrophotometer (Thermo Scientific™) and stored at -75 °C until use. As positive controls we used synthetic genetic fragments (gBlocks™, Integrated DNA Technologies, USA) that included the target sequences of interest for enFeLV, exFeLV and FIV amplification. Molecular biology grade water instead of gBlocks was used as a negative control.

We designed enFeLV, exFeLV and FIV primers using the Primer3 Input program (v.0.4.0) with sequences available in GenBank that were also used for phylogenetic analysis. enFeLV and exFeLV primers were designed in the LTR region for endpoint PCR, in order to independently detect both exogenous and endogenous FeLV sequences. The enFeLV LTR FW and FeLV LTR RV primers amplified a 205 bp fragment of enFeLV. The exFeLV LTR FW and FeLV LTR RV primers amplified a 215 bp fragment of exFeLV (Table 1).

The reaction mix contained 1X buffer (Ampliqon, Odense M, Denmark), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Ampliqon), 200 μM dNTPs (Ampliqon), 500 nM of each primer, 5 U of Taq DNA polymerase (Ampliqon) and 0.5 μg of DNA per reaction, in a final volume of 25 μL. The amplification conditions included initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles, each with three steps: denaturation at 95 °C for 40 s, alignment at 62 °C for exFeLV and 60 °C for enFeLV, extension at 72 °C for 13 s and a final extension at 72 °C for 5 min.

FIV detection was performed using nested PCR which amplified a *gag* gene fragment. The FIV *gag* FW1 and FIV *gag* RV1 primers amplified a 919 bp product in the first round, and then the FIV *gag* FW2 and FIV *gag* RV2 primers amplified a 458 bp product in the second round (Table 1). The reaction mix contained 1X buffer (Ampliqon, Odense M, Denmark), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Ampliqon), 200 μM dNTPs (Ampliqon), 500 nM of each primer, 5 U of Taq DNA polymerase (Ampliqon) and 0.7 μg of DNA per reaction, in a final volume of 25 μL. Amplification occurred with initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles with three steps. First, denaturation at 95 °C for 40 s, alignment at 57 °C for the first reaction and 52 °C for the second reaction, extension at 72 °C for 56 s for the first reaction and for 30 s for the second reaction and a final extension at 72 °C for 5 min.

For the detection of FeLV and FIV viral RNA, one-step RT-PCR was performed with a commercial kit (OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN, USA), following the manufacturer's instructions, and using the primers previously described (Table 1).

Following separation using horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel with ethidium bromide (0.5 µg / mL), final products were visualized in a UVP M-20E transilluminator (BioSurplus, San Diego, CA, USA). Positive amplicon purification was carried out with the commercial FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan), following the manufacturer's instructions.

Sample sequencing was carried out in the Biotechnology and Prototypes Unit of the National Autonomous University of Mexico, FES – Iztacala campus, using the Sanger method in an ABI 3130 × 1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

All PBL genomic DNA samples were positive for enFeLV, and 48 enFeLV-positive animals were detected via RT-PCR of RNA extracted from blood plasma. Eleven cats that were only positive for enFeLV DNA and RNA presented clinical signs and/or blood count alterations consistent with retroviral infection. These included gingivitis, gingivostomatitis, lymphoma, lymphocytosis, lymphopenia, anemia, neutropenia and thrombocytopenia (Figure 1).

Of the 50 cats evaluated, 13 tested positive for exFeLV infection by PCR. Nine of the 50 PBL samples were positive for exFeLV proviral DNA, while 13 were positive for exFeLV viral RNA in plasma. Cats that tested positive ranged in ages from six months to seven years old (2.65 years on average), five were female and eight were male. Among the exFeLV-positive animals, two showed no clinical signs, but three had gingivitis or gingivostomatitis, two had diarrhea and weight loss, and one had lymphoma. Likewise, there were cases of animals with bite injuries, vomiting and jaundice, one cat with pleural effusion and another with pulicosis (Figure 1). Five of the exFeLV-positive animals did not have hemogram alterations, however three cats had non-regenerative anemia, two had lymphopenia, one had neutropenia, two presented eosinophilia, two neutrophilia and one had thrombocytopenia (Figure 1).

Nested PCR detected FIV proviral DNA in 10 of the 50 study animals. These cats ranged from in age from 6 months to 15 years (7.05 years on average), five were female and five were male. Five animals presented depression and anorexia, there were two cases each of weight loss and diarrhea, and one case each with vomiting, gingivitis, and

mammary adenocarcinoma. The hemograms of these FIV-positive animals showed the presence of neutrophilia in six cases, two cases with lymphocytosis, anisocytosis, neutropenia, monocytosis and eosinophilia (with one case each), and one of the animals presented a hemogram without alterations (Figure 1). No sample tested positive for RT-PCR from RNA obtained from blood plasma.

We got 19 enFeLV sequences, nine exFeLV sequences and ten FIV sequences from the amplicons obtained via PCR. Sequences were edited using the BioEdit program v7.0.4 and Clustal W was used for sequence alignment. We used the nucleotide sequences to construct three phylogenetic trees that were built with the Geneious program v11.1.4 using Neighbor-Joining method and Tamura-Nei as genetic distance model with bootstrap support based on 1000 replicates. The FeLV trees included endogenous (Figure 2) or exogenous sequences (Figure 3) from a fragment of the FeLV LTR. Sequences obtained from a fragment of the FIV *gag* gene were included in the second tree (Figure 4). In the trees, we considered sequences available in GenBank that included enFeLV genetic regions of interest AY364318.1, AY364319.1, AY364320.1, GU300829.1, GU300839.1, GU300855.1, GU300949.1, GU300970.1, GU300986.1, GU301018.1, GU301066.1, LC196053.1, LC196055.1, LC198317.1, LC198318.1, MH325041.1, MH325043.1 and MH325049.1. Similarly, with exFeLV regions: AB060732.3, AB672612.1, AB673426.1, AF052723.1, KP728112.1, M14331.1, M18247.1, M89997.1, MF681664.1, MF681665.1, MF681666.1, MF681667.1, MF681669.1, MF681670.1, MF681671.1 and X00188.1; and for FIV: AF474246.1, AY600517.1, AY679785.1, D37818.1, D37822.1, EU117992.1, GQ422125.1, KM880117.1, KM880121.1, M25381.1, M36968.1, M59418.1, MW142027.1, MW142038.1, MW142043.1, MW142046.1, MW142047.1, U11820.1 and Y13867.1. The sequences obtained in this study are available from GenBank under accession numbers MZ334429 - MZ334466.

Genetic distances were performed with MEGA v11, showing values ranging from 0.02 - 0.45 for the obtained enFeLV sequences, and values ranging from 0.02 - 0.46 with respect to previously described endogenous sequences. In the case of exFeLV sequences, the genetic distance was 0 - 0.03 between the sequences obtained in the

study, and 0 - 0.13 with respect to previously described exogenous sequences. We performed recombination detection of the enFeLV and exFeLV sequences using the Recombinant Detection Program (RDP v5.23) software with seven detection methods.

Previous studies described the presence of these viruses in Mexico using FeLV antigen detection tests and FIV antibodies [24] and by detecting FeLV through PCR [25]. However, we detect and genetically characterize feline retroviruses (enFeLV, exFeLV and FIV) in domestic cats with different clinical signs and hematological alterations.

Our study used a pair of PCRs in the LTR region to differentiate endogenous and exogenous FeLV viruses, achieving the specific amplification of each virus. We corroborated this by analyzing the obtained nucleotide sequences, confirming that the LTR region is adequate for differential amplification of endogenous and exogenous FeLV sequences, which has been carried out mainly for real-time PCR assays [8, 9].

The enFeLV sequences present in the genome of species belonging to the genus *Felis* play an important role in the generation of exogenous FeLV variants that are more pathogenic [26]. Although recombinations that occur in the *env* gene are the most important and are the ones that allow the characterization of the FeLV subgroups [27], recombination has also been described in other genetic regions such as *gag* and *pol* [28, 29]. Endogenous sequence variability may impact the genetic variability of the exogenous types that result from recombination, and consequently on their level of pathogenicity, as has already been described in currently recognized subgroups [30, 31].

Eleven of the enFeLV sequences obtained in our study were grouped with most of the previously described endogenous sequences [4]. However, in our phylogenetic tree the rest of them (n = 8) were grouped in an independent clade, which had the highest values of genetic distance (data not shown). The genetic distance values of enFeLV sequences showed that these can be highly variable. The lower genetic distance values were identified in previously reported domestic feline endogenous sequences [4, 32]. These data support that enFeLV sequences are genetically diverse [32–34]. In contrast, the exFeLV sequences obtained in this study showed smaller genetic distances (0-0.13),



indicating that exogenous sequences are less variable. The shortest genetic distance was found in sequences from subgroup A that were previously described in the USA [35], and with which the sequences of our study were mainly associated. Exogenous sequences belonging to subgroup A are the most conserved, even among isolates from different geographical areas, reaching similarity values of up to 98% in surface glycoprotein [2, 36].

None of the analyzed sequences showed any point of recombination between enFeLV and exFeLV sequences. However, only one of the sequences (MZ334447, enFeLV-G46) was identified as endogenous recombinant by two of the methods with  $p \leq 0.01$ .

Endogenization of enFeLV appears to have occurred after the initial divergence of the domestic cat lineage from the rest of the *Felidae* family [32], although more recent insertions of some enFeLV are recognized [4, 33]. While enFeLV is known to not generate infectious virions [37], enFeLV that retain functional open reading frames have been reported [4, 38].

In addition to detecting enFeLV in all the DNA samples from the cats in our study, enFeLV RNA was detected in 48 of the 50 cats tested, which may indicate a frequent transcription activity of the LTR region, as other studies have shown [6, 7]. The expression of enFeLV is associated with exFeLV infection [5–7] and the generation of exFeLV and enFeLV recombinants may take place in virions that have co-packaged transcripts of endogenous and exogenous origin [39].

On the other hand, we identified 11 cats that tested negative on all exFeLV and FIV tests but were positive for proviral DNA and enFeLV RNA transcripts. Additionally, these cats showed clinical signs and hemogram alterations that are compatible with feline retrovirus infection, such as gingivitis, gingivostomatitis, lymphoma, lymphocytosis, lymphopenia, anemia, neutropenia, and thrombocytopenia. This finding could be associated with recently integrated enFeLV retroviruses in the cat genome that may be capable of generating disease, however sequencing other genetic regions and verifying viral genome expression and replication would be necessary to confirm this. Another possibility relating to the cat population with clinical signs and hematological

alterations not associated with exFeLV and FIV infection is a new exFeLV genetic variant that could not be detected with the PCR we used. The enFeLV sequences with the greatest diversity observed in the phylogenetic tree may be related to this new genetic variant (figure 2).

The clinical signs most frequently shown by cats at the time of sampling were depression and anorexia (18%), gingivitis or gingivostomatitis (12%), diarrhea (10%), emaciation (10%), pulicosis (8%) and vomiting (6%; Figure 1). While most of these conditions can be associated with FeLV infection [40], the cases of gingivitis / gingivostomatitis are especially relevant because they are frequently observed in cats infected with FeLV or FIV. Infected cats are more susceptible to developing periodontal disease as a consequence of immune system deterioration and its consequent inability to respond to infections in general [41, 42].

Thirteen cats (26%) were exFeLV positive by PCR. Nine animals tested positive for both proviral DNA and viral RNA. These cats may be experiencing a progressive infection, since this course of FeLV infection is characterized by the presentation of persistent viremia, being possible to detect both viral DNA and RNA with PCR, and p27 antigen in blood [43]. However, in these cases it is recommended to follow up with antigen and/or viral RNA detection tests in which it is possible to obtain a negative result in the future, which would indicate a possible regressive infection [44]. In addition, progressive infections in cats are characterized by the development of diseases associated with the virus infection [1]. These include lymphoma and non-regenerative anemia, as well as gingivostomatitis and cytopenias that occurred in six of the nine FeLV proviral DNA and viral RNA positive cats. This could suggest a progressive course of infection [45, 46].

On the other hand, in regressive infection, viral replication is restricted by the animal's immune response either before or shortly after bone marrow infection, and they may or may not go through a state of viremia (transient viremia) [1]. Nevertheless, the infection can be reactivated during immunosuppression episodes and disease associated with the infection may occur [12]. We did not detect any animal only positive for proviral DNA, as occurs in regressive infections. In contrast, four of the animals were

only positive to exFeLV using blood plasma RT-PCR. In these cats, viremia could be detected by RT-PCR, but the proviral form could not be detected. This may be due to different factors such as low exFeLV proviral load, or the sensitivity of the test used [47]. Real-time PCR tests have shown to be very sensitive in detecting FeLV at different stages of infection [8, 48].

Normal hemograms were the most frequent result found in cats that tested positive using any FeLV detection test. While FeLV infection is usually associated with a variety of hematological disorders [21, 49], the absence of hematological alterations has also been reported in FeLV positive animals [50]. This could be explained by these cats probably not having progressive type infections at the time of the study. It is important to note that two of these cats were positive for both proviral DNA and viral RNA, so it is possible that they will develop hematological alterations associated with the infection in the future [1].

The second most frequent result found in these animals (three cases) was non-regenerative anemia, followed by lymphopenia, neutrophilia, and eosinophilia, which occurred in two cases each. Neither neutrophilia nor eosinophilia can be associated in any direct way with FeLV presence. Cytopenias are the most frequently reported hematological disorders that characterize FeLV infection [21, 49–51]. These are attributed to viral infection of bone marrow hematopoietic and structural cells (stromal and fibroblasts), which alters the necessary microenvironment for hematopoiesis, and leads to myelosuppression [40].

FIV was detected in its proviral form using nested PCR. Phylogenetic analysis of obtained sequences revealed that they are grouped with sequences belonging to subtype B, which is one of the most frequently reported subtypes in other studies [22, 52–56]. We were unable to detect FIV positive cats using RT-PCR. In this case, the proviral form may have been the only detectable form because the virus was not replicating, or viral load was too low to be detected.

Depression and anorexia were the most frequent clinical signs found in FIV-positive cats. However, these signs are considered nonspecific, and thus cannot be attributed to

infection with this virus. One female presented mammary adenocarcinoma and neutropenia while another cat presented gingivostomatitis. Both of these conditions can be attributed to FIV infection given that the retrovirus predisposes hosts to various infections including those of the oral cavity [40, 57], and FIV infection is associated with a greater risk of neoplasm development, including mammary tissue neoplasms [58]. Cytopenias, including neutropenia, are frequent alterations found in FIV-positive cat blood counts [21, 49–51].

In summary, our results confirmed the presence of exFeLV-A and the first report describing FIV subtype B in naturally infected domestic cats in Mexico. The clinical characteristics of cats infected by feline retrovirus were the ones most frequently described in other studies. The joint study of feline retroviruses is important to better understand the role that enFeLV plays directly in disease presentation, as well as for the development of diagnostic tools that can provide global information on their efficiency, course of infection and genetic characterization of feline retroviruses.

### **Ethical approval**

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

### **Funding**

This study was funded by PIAPI2041 FESC, UNAM and by FOP02-2021-04 CONACyT project 316257.

### **Declaration of Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

We thank the veterinarians who kindly assisted with the collection of the samples for this study. Gabriel Eduardo Acevedo Jiménez is a doctoral student in the program: Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM, supported by a CONACyT grant scholarship.

## References

1. Hartmann K (2012) Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses* 4:2684–2710. <https://doi.org/10.3390/v4112684>
2. Chiu E, Hoover E, VandeWoude S (2018) A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses* 10:29. <https://doi.org/10.3390/v10010029>
3. Miyazawa T, Tomonaga K, Kawaguchi Y, Mikami T (1994) The genome of feline immunodeficiency virus. *Archives of Virology* 134:221–234. <https://doi.org/10.1007/BF01310563>
4. Roca AL, Pecon-Slattery J, O'Brien SJ (2004) Genomically Intact Endogenous Feline Leukemia Viruses of Recent Origin. *Journal of Virology* 78:4370–4375. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4370-4375.2004>
5. Kronic M, Ertl R, Hagen B, *et al* (2015) Decreased expression of endogenous feline leukemia virus in cat lymphomas: a case control study. *BMC Veterinary Research* 11:90. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0378-9>
6. McDougall AS, Terry A, Tzavaras T, *et al* (1994) Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *Journal of Virology* 68:2151–2160. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.4.2151-2160.1994>
7. Tandon R, Cattori V, Pepin AC, *et al* (2008) Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research* 135:136–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.02.016>
8. Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA (2005) Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology* 332:272–283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.050>

9. Tandon R, Cattori V, Gomes-Keller MA, *et al* (2005) Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 130:124–132. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.06.017>
10. Coffin J, Blomberg J, Fan H, *et al* (2021) ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. *Journal of General Virology* 102:1–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001712>
11. Miyazawa T (2002) Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Frontiers in Bioscience* 7:A791. <https://doi.org/10.2741/A791>
12. Hartmann K, Hofmann-Lehmann R (2020) What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 50:1013–1036. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.05.006>
13. Jarrett O, Hardy WD, Golder MC, Hay D (1978) The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. *International Journal of Cancer* 21:334–337. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910210314>
14. Overbaugh J, Riedel N, Hoover EA, Mullins JI (1988) Transduction of endogenous envelope genes by feline leukaemia virus in vitro. *Nature* 332:731–734. <https://doi.org/10.1038/332731a0>
15. Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, *et al* (1986) Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *Journal of Virology* 58:825–834. <https://doi.org/10.1128/jvi.58.3.825-834.1986>
16. Bolin LL, Levy LS (2011) Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort. *Viruses* 3:1681–1698. <https://doi.org/10.3390/v3091681>
17. Quigley JG, Burns CC, Anderson MM, *et al* (2000) Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell

- aplasia. *Blood* 95:1093–1099.  
[https://doi.org/10.1182/blood.V95.3.1093.003k01\\_1093\\_1099](https://doi.org/10.1182/blood.V95.3.1093.003k01_1093_1099)
18. Kawasaki J, Nishigaki K (2018) Tracking the Continuous Evolutionary Processes of an Endogenous Retrovirus of the Domestic Cat: ERV-DC. *Viruses* 10:179.  
<https://doi.org/10.3390/v10040179>
  19. Cheng HH, Anderson MM, Overbaugh J (2007) Feline leukemia virus T entry is dependent on both expression levels and specific interactions between cofactor and receptor. *Virology* 359:170–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.004>
  20. Overbaugh J, Donahue P, Quackenbush S, *et al* (1988) Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science* 239:906–910. <https://doi.org/10.1126/science.2893454>
  21. Gleich S, Hartmann K (2009) Hematology and Serum Biochemistry of Feline Immunodeficiency Virus-Infected and Feline Leukemia Virus-Infected Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:552–558.  
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0303.x>
  22. Perharić M, Bidin M, Starešina V, *et al* (2016) Phylogenetic characterisation of feline immunodeficiency virus in naturally infected cats in Croatia indicates additional heterogeneity of subtype B in Europe. *Archives of Virology* 161:2567–2573. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2928-2>
  23. Sykes JE (2014) Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier, pp 209–223
  24. Ortega-Pacheco A, Aguilar-Caballero AJ, Colin-Flores RF, *et al* (2014) Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:460–464.  
<https://doi.org/10.1177/1098612X13509995>
  25. Ramírez H, Autran M, García MM, *et al* (2016) Genotyping of feline leukemia virus

- in Mexican housecats. *Archives of Virology* 161:1039–1045.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-015-2740-4>
26. Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (2020) The Etiology of Cancer. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Elsevier, pp 1–35
  27. Miyake A, Watanabe S, Hiratsuka T, *et al* (2016) Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the env Gene. *Journal of Virology* 90:4832–4837.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.03229-15>
  28. Stewart H, Jarrett O, Hosie MJ, Willett BJ (2013) Complete Genome Sequences of Two Feline Leukemia Virus Subgroup B Isolates with Novel Recombination Sites. *Genome Announcements* 1:1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00036-12>
  29. Tzavaras T, Stewart M, McDougall A, *et al* (1990) Molecular cloning and characterization of a defective recombinant feline leukaemia virus associated with myeloid leukaemia. *Journal of General Virology* 71:343–354.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-2-343>
  30. Ahmad S, Levy LS (2010) The frequency of occurrence and nature of recombinant feline leukemia viruses in the induction of multicentric lymphoma by infection of the domestic cat with FeLV-945. *Virology* 403:103–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.04.011>
  31. Boomer S, Gasper P, Whalen LR, Overbaugh J (1994) Isolation of a Novel Subgroup B Feline Leukemia Virus from a Cat Infected with FeLV-A. *Virology* 204:805–810. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1597>
  32. Polani S, Roca AL, Rosensteel BB, *et al* (2010) Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology* 405:397–407. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.010>
  33. Roca AL, Nash WG, Menninger JC, *et al* (2005) Insertional Polymorphisms of Endogenous Feline Leukemia Viruses. *Journal of Virology* 79:3979–3986.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.3979-3986.2005>



34. Tandon R, Cattori V, Willi B, *et al* (2007) Copy number polymorphism of endogenous feline leukemia virus-like sequences. *Molecular and Cellular Probes* 21:257–266. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.01.003>
35. Chiu ES, Kraberger S, Cunningham M, *et al* (2019) Multiple Introductions of Domestic Cat Feline Leukemia Virus in Endangered Florida Panthers. *Emerging Infectious Diseases* 25:92–101. <https://doi.org/10.3201/eid2501.181347>
36. Donahue PR, Hoover EA, Beltz GA, *et al* (1988) Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *Journal of Virology* 62:722–731. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.3.722-731.1988>
37. Soe LH, Shimizu RW, Landolph JR, Roy-Burman P (1985) Molecular analysis of several classes of endogenous feline leukemia virus elements. *Journal of Virology* 56:701–710. <https://doi.org/10.1128/jvi.56.3.701-710.1985>
38. Kumar D V, Berry BT, Roy-Burman P (1989) Nucleotide sequence and distinctive characteristics of the env gene of endogenous feline leukemia provirus. *Journal of Virology* 63:2379–2384. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.5.2379-2384.1989>
39. Stewart H, Jarrett O, Hosie MJ, Willett BJ (2011) Are endogenous feline leukemia viruses really endogenous? *Veterinary Immunology and Immunopathology* 143:325–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.011>
40. Hartmann K (2011) Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 143:190–201. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.003>
41. Lee D Bin, Verstraete FJM, Arzi B (2020) An Update on Feline Chronic Gingivostomatitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 50:973–982. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.04.002>
42. Thengchaisri N, Steiner JM, Suchodolski JS, Sattasathuchana P (2017) Association of gingivitis with dental calculus thickness or dental calculus coverage and subgingival bacteria in feline leukemia virus- and feline immunodeficiency virus-negative cats. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de*

recherche veterinaire 81:46–52

43. Little S, Levy J, Hartmann K, *et al* (2020) 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 22:5–30. <https://doi.org/10.1177/1098612X19895940>
44. Hofmann-Lehmann R, Hartmann K (2020) Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 22:831–846. <https://doi.org/10.1177/1098612X20941785>
45. Meichner K, Kruse DB, Hirschberger J, Hartmann K (2012) Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *Veterinary Record* 171:348–348. <https://doi.org/10.1136/vr.100813>
46. Sykes JE, Hartmann K (2014) Feline Leukemia Virus Infection. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier, pp 224–238
47. Beall MJ, Buch J, Clark G, *et al* (2021) Feline Leukemia Virus p27 Antigen Concentration and Proviral DNA Load Are Associated with Survival in Naturally Infected Cats. *Viruses* 13:302. <https://doi.org/10.3390/v13020302>
48. Tandon R, Cattori V, Willi B, *et al* (2008) Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123:129–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.027>
49. Costa FVA da, Valle S de F, Machado G, *et al* (2017) Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37:1531–1536. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001200028>
50. Lacerda LC, Silva AN da, Cruz RDS, *et al* (2020) Hematological and biochemical aspects of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and feline leukemia. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 42:1–7. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm110020>

51. Collado VM, Domenech A, Miró G, *et al* (2012) Epidemiological Aspects and Clinicopathological Findings in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus (FeLV) and/or Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Open Journal of Veterinary Medicine* 02:13–20. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2012.21003>
52. Huguet M, Novo SG, Bratanich A (2019) Detection of feline immunodeficiency virus subtypes A and B circulating in the city of Buenos Aires. *Archives of Virology* 164:2769–2774. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04363-1>
53. Kakinuma S, Motokawa K, Hohdatsu T, *et al* (1995) Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. *Journal of virology* 69:3639–3646. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.6.3639-3646.1995>
54. Steinrigl A, Klein D (2003) Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *Journal of General Virology* 84:1301–1307. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18736-0>
55. Teixeira BM, Taniwaki SA, Menezes PMM, *et al* (2019) Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports* 5:205511691985911. <https://doi.org/10.1177/2055116919859112>
56. Weaver EA (2010) A Detailed Phylogenetic Analysis of FIV in the United States. *PLoS ONE* 5:e12004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012004>
57. Older CE, Gomes MDOS, Hoffmann AR, *et al* (2020) Influence of the FIV Status and Chronic Gingivitis on Feline Oral Microbiota. *Pathogens* 9:383. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050383>
58. Magden E, Quackenbush SL, VandeWoude S (2011) FIV associated neoplasms— A mini-review. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 143:227–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.016>

## Figure captions

**Figure 1.** Clinical signs and hematological findings found in domestic cats that tested positive for feline retroviruses.

**Figure 2.** Phylogenetic tree constructed with partial enFeLV LTR region sequences, using Neighbor-Joining in Geneious 11.1.4. The sequences obtained in this study are shown in blue.

**Figure 3.** Phylogenetic tree constructed with partial exFeLV LTR region sequences, using Neighbor-Joining in Geneious 11.1.4. The sequences obtained in this study are shown in red.

**Figure 4.** Phylogenetic tree constructed with partial FIV *gag* gene sequences, using Neighbor-Joining in Geneious 11.1.4. We included sequences from different viral subtypes. Subtype A: GQ422125.1, KM880117.1, KM880121.1, M25381.1 and M36968.1. Subtype B: M59418.1, MW142027.1, MW142038.1, MW142043.1, MW142046.1, MW142047.1, U11820.1 and Y13867.1. Subtype C: AF474246.1 and AY600517.1. Subtype D: AY679785.1, D37818.1 and D37822.1. Subtype E: EU117992.1. The sequences obtained in this study are shown in green.