



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

DETECCIÓN EN MÉXICO DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA  
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**VÍCTOR DAVID GONZÁLEZ FERNÁNDEZ**

**ASESOR:** DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

**COASESOR:** DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

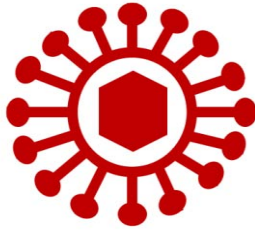
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**A Francisco y Alejandra, mis padres**

**Es suyo**



**Laboratorio de Virología**  
**Genética y Biología Molecular**

## Agradecimientos

¿Realmente usted viene a leer el trabajo? Si sólo pretende leer a detalle esta página espero no se lleve una decepción y a la vez espero que, si bien puede que yo no sea un bien nacido, al menos sea agradecido (y así me lo he propuesto), por lo que a continuación trataré de mencionar a las personas que han contribuido en lo que a fin de cuentas este documento pretende desembocar: mi consolidación como médico veterinario zootecnista.

En la primera escala reincido en mi dedicatoria, agradezco a Francisco González y a Alejandra Fernández, mis padres, por apostar por la educación.

Agradezco a mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México, entidad abstracta con tanto peso en mi vida que provoca que le destine estas palabras; he tenido la fortuna de llevar con orgullo la representación de la universidad ante otras instituciones, y la seguiré llevando. Lo mejor de mi vida a día de hoy ha estado relacionado de alguna u otra forma con la UNAM. En julio de 2004 fui aceptado por la Universidad Nacional, decidí que no me iba a alejar de ella. Por mi raza hablará el espíritu.

Agradezco a Hugo Ramírez por aceptarme como su joven aprendiz, ¡qué fortuna estar con el mejor Maestro! Confío en su diseño, su entrenamiento lo llevo y lo llevaré con orgullo sea cual sea mi futuro.

Agradezco a Humberto Alejandro Martínez por su apoyo en mi formación y por su álgida y por lo tanto precisa y concisa dirección de este trabajo.

Agradezco a Martha García del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su entrañable apoyo en la disposición de los cimientos de mi vida académica.

Agradezco a Wolfgang (sic), mi mejor amigo a día de hoy y colega correligionario, quizás algún día será posible abolir la insolencia; de igual manera otro mejor amigo de una línea cronológica preliminar. Al ser hijo único he hecho de mis amigos mis hermanos, más allá del bien y del mal.

Al escuadrón omega: Omar, Alejandra y Samyasa. Nadie subyuga al *dream team* de la veterinaria.

*To The Cuye's Company, The Pink and The Blonde: I get high with a little help from my friends.*

Tengo la fortuna de tener familia de amparo en diversos lugares del mundo a los cuales quiero agradecer por su apoyo en mi formación ocurrida en sus países, en sus ciudades: a la familia López Brizuela por adoptarme como un hijo durante el tiempo que viví en el Paraguay: *che aguijevete ndéve nde maitei*; a la familia Iranzo Meza por tratarme de igual manera como un miembro más de la familia, algún día he de regresar a Buenos Aires. También gracias a Norlan y Maydelis de La Habana, Cuba por recibirme en su casa. Incidiendo en el reconocimiento cosmopolita reitero mi agradecimiento al Gobierno del Estado de México por su apoyo al ampliar mi formación en la Universidad Complutense de Madrid.

A Selene por apoyarme en mi inadvertencia de la sociedad, a Montserrat por apoyarme en la advertencia de la sociedad. A Jessica, del Río de la Plata, hemos de encontrarnos. A Eduardo, Josué, Ricardo y Juan por su valiosa amistad: *Wer wartet mit Besonnenheit, der wird belohnt zur rechten Zeit.*

Al colegio de profesores de patología, donde he aprendido mucho, en especial de Cynthia González y de Alejandro Vargas, quienes me han enseñado cómo enseñar, igualmente al colegio de profesores de virología, en donde he encontrado una extensión de mi hogar.

A Kary Mullis, al ácido lisérgico y otros psicotrópicos.

A la memoria de Iván Pérez Luna, de Pablo Gil-Loyzaga y de Sonia González Rojo.

A dios, por el muy útil espacio libre que dejó en mi lóbulo temporal, ¿sí es ése?

*Absence of evidence is not evidence of absence*

**Carl Sagan**

## ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas</b>	9
<b>Resumen</b>	10
<b>Abstract</b>	11
<b>I Introducción</b>	
1. Inmunodeficiencia felina (SIDA felino)	12
1.1 Antecedentes	13
1.2 Etiología	13
1.3 Patogenia	13
1.4 Respuesta inmune	15
1.5 Cuadro clínico	15
1.6 Diagnóstico	17
1.6.1 Pruebas serológicas	17
1.6.2 Técnicas moleculares	18
1.6.3 Aislamiento viral	19
1.7 Profilaxis	19
1.7.1 Vacunación	20
1.8 Tratamiento	21
1.8.1 Antivirales	21
2. Virus de Inmunodeficiencia Felina	23
2.1 Genoma	23
2.2 Epidemiología	27
<b>II Justificación</b>	<b>30</b>
<b>III Hipótesis</b>	<b>31</b>



<b>IV Objetivos</b>	<b>32</b>
<b>V Metodología</b>	<b>33</b>
1. Población de estudio	33
2. Procesamiento de las muestras	34
3. Reacción en cadena de la polimerasa	34
4. Análisis e interpretación de datos	34
<b>VI Resultados</b>	<b>35</b>
1. Características de los iniciadores	36
2. Reacción en Cadena de la Polimerasa	36
3. Frecuencia y prevalencia	38
4. Potenciales factores de riesgo	39
<b>VII Discusión</b>	<b>42</b>
<b>VIII Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>IX Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>X Referencias</b>	<b>50</b>
APÉNDICE	60

## Lista de abreviaturas

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
AZT	Azidotimidina
CA	Cápside
CD4+	Molécula presente en una subpoblación de linfocitos T
CD8+	Molécula presente en una subpoblación de linfocitos T
CXCR4	Receptor específico de entrada del virus de inmunodeficiencia felina
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
dUTPasa	Trifosfatasa Deoxiuridina
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
EUA	Estados Unidos de América
FeLV	Virus de la Leucemia Felina
FIV	Virus de Inmunodeficiencia Felina
gADN	Ácido Desoxirribonucleico genómico
gp41	Glicoproteína 41
gp120	Glicoproteína 120
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
IN	Integrasa
MA	Matriz
NC	Nucleocápside
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PR	Proteasa
RT	Transcriptasa Reversa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido

## Resumen

El virus de inmunodeficiencia felina (FIV) es un lentivirus causante de una enfermedad inmunosupresora similar al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) humano, por lo que es un modelo de estudio para el HIV. Basado en el hecho de que no existen estudios previos que determinen la frecuencia de la infección por el FIV en México utilizando métodos moleculares, el objetivo del presente trabajo fue detectar mediante la reacción en cadena de la polimerasa una porción de la región codificante de cápside del gen *gag* en gatos domésticos del área metropolitana de la Ciudad de México. Se realizó la exploración clínica y se tomó muestras de sangre completa de cien gatos domésticos. Mediante el uso de un cuestionario se recaudaron datos demográficos, conductuales y de historia clínica con el fin de determinar factores potenciales de riesgo inherentes a la infección por el FIV. De la sangre se separaron las células mononucleares y se extrajo el ADN total para detectar ADN proviral por PCR; la pareja de iniciadores utilizados en la PCR se diseñó incluyéndolo bases degeneradas para amplificar un mayor número de variantes virales para lo cual se consideraron secuencias nucleotídicas disponibles en el GenBank. Los resultados mostraron una alta frecuencia del provirus del FIV, encontrándose 24/100 gatos infectados, lo que indica una prevalencia del 24% en la región estudiada. Factores relacionados con el género, edad, comportamiento, cohabitación intraespecífica demuestran ser factores de alto riesgo para la infección. La alta prevalencia del FIV observada en el presente trabajo es un dato a considerar dado el potencial inmunodepresor del patógeno y a la vez indica la necesidad de establecer y promover medidas de control y prevención con el fin de controlar la infección por el FIV en la población felina del área metropolitana de la Ciudad de México. Este es el primer estudio transversal realizado en México que describe la infección por el FIV en gatos domésticos y que propone la PCR como una potencial herramienta diagnóstica.

## **Abstract**

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a lentivirus associated with AIDS-like illnesses in cats and has been used as a model for the study of human immunodeficiency virus (HIV). A feature of HIV and FIV infection is the continually increasing divergence among viral isolates between different individuals, as well as within the same individuals. There were no previous FIV infection occurrence studies in Mexico. The aim of this study was to describe a *gag* gene polymerase chain reaction (PCR) assay to investigate the occurrence of the Feline Immunodeficiency Virus in domestic cats in Mexico City Metropolitan Area. One hundred cats were surveyed and blood samples were collected; genomic DNA from peripheral blood mononuclear cells was used to detect proviral DNA by PCR; Primer set was designed to amplify *gag* protein region, thus previously published FIV genome sequences available in GenBank were considered; additionally, data on cat demographics and health were collected using a structured questionnaire and were evaluated as potential risk factors for FIV status. Data indicate a high occurrence of FIV provirus, showing 24/100 cats to be infected, indicating 24% prevalence in the studied region. High risk associations were established with the roaming lifestyle of the cat, sex, age, behavior, neuter status and living in a multi-cat household. High prevalence of FIV observed in our study is of concern, in view of the immunosuppressive potentials of the pathogen. Specific measures for control and prevention are needed to ensure that FIV are controlled in the cat population of Mexico City Metropolitan Area.

This is the first known cross-sectional study set in Mexico showing FIV infected cats and presenting PCR as a potential assay for diagnosis.

## **I Introducción**

El Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV, abreviatura según su nomenclatura referente a la taxonomía establecida por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus) perteneciente al género *lentivirus* y a la familia *Retroviridae* es causante de una enfermedad que se presenta en gatos domésticos con cuadro clínico similar al que se presenta en el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida Humana (SIDA), además de poseer similitudes bioquímicas y genéticas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV) por lo cual ha sido utilizado como modelo de estudio (Coats, 2005; Teixeira, 2010; Weaver, 2010).

El FIV ha sido aislado en todos los países donde ha sido estudiada la infección, como sucede con la mayoría de los lentivirus, se ha encontrado una alta variabilidad en sus secuencias nucleotídicas; el análisis de las secuencias de ciertas regiones genéticas han permitido clasificar a este retrovirus en 6 subtipos, identificados con letras de la A a la F (Weaver *et al.*, 2004; Hayward *et al.*, 2010). En México se han descrito casos sospechosos mediante semiología clínica y pruebas de diagnóstico rápido en el consultorio, sin embargo no hay respaldo científico que mediante la detección de material genético corrobore la presencia del virus en el país.

### **1. Inmunodeficiencia Felina (SIDA felino)**

La inmunodeficiencia felina, también conocida como SIDA felino es una enfermedad de gran importancia en la medicina veterinaria de pequeñas especies, ya que implica una inmunodeficiencia secundaria ocasionada por el tropismo celular que tiene el FIV hacia linfocitos y monocitos; resalta también como un factor importante la fácil diseminación del agente causal, debido a la liberación del mismo en fluidos, (principalmente saliva) lo que conjugado a la promiscuidad y a las peleas territoriales inherentes a la conducta característica de la especie potencializa el riesgo de infección. Junto con la leucemia viral felina conforma una pareja de enfermedades retrovirales de felinos, enfermedades de alta incidencia e importancia en la medicina felina (Hosie *et al.*, 2009).

## 1.1 Antecedentes

El FIV se aisló por primera vez de un gato que presentaba un marcado síndrome de inmunodeficiencia (Pedersen *et al.*, 1987). Este aislado proveniente de Petaluma, California, ha sido una de las cepas de laboratorio más frecuentemente utilizadas en investigación biomédica en materia de patogénesis lentiviral, diseño y evaluación de quimioterapia antiviral, así como en el desarrollo de estrategias de vacunación contra el HIV (Mergia *et al.*, 1997; Kashiwase *et al.*, 2000; Hosie *et al.*, 2000). Es importante resaltar que a pesar de ser dos lentivirus muy parecidos, el FIV no infecta al ser humano, así como el HIV no infecta a felinos; el FIV es un virus muy antiguo del cual surgen diversos grupos que infectan a felinos silvestres como pumas, leones y leopardos (Yamamoto *et al.*, 2007; Teixeira, 2010).

En México se han reportado tres estudios, si bien ninguno de ellos fue en base a pruebas moleculares sino en base a pruebas comerciales de inmunocromatografía (Morales-Ramírez, 1993; Marín *et al.*, 2005; Ortega-Pacheco *et al.*, 2013).

## 1.2 Etiología

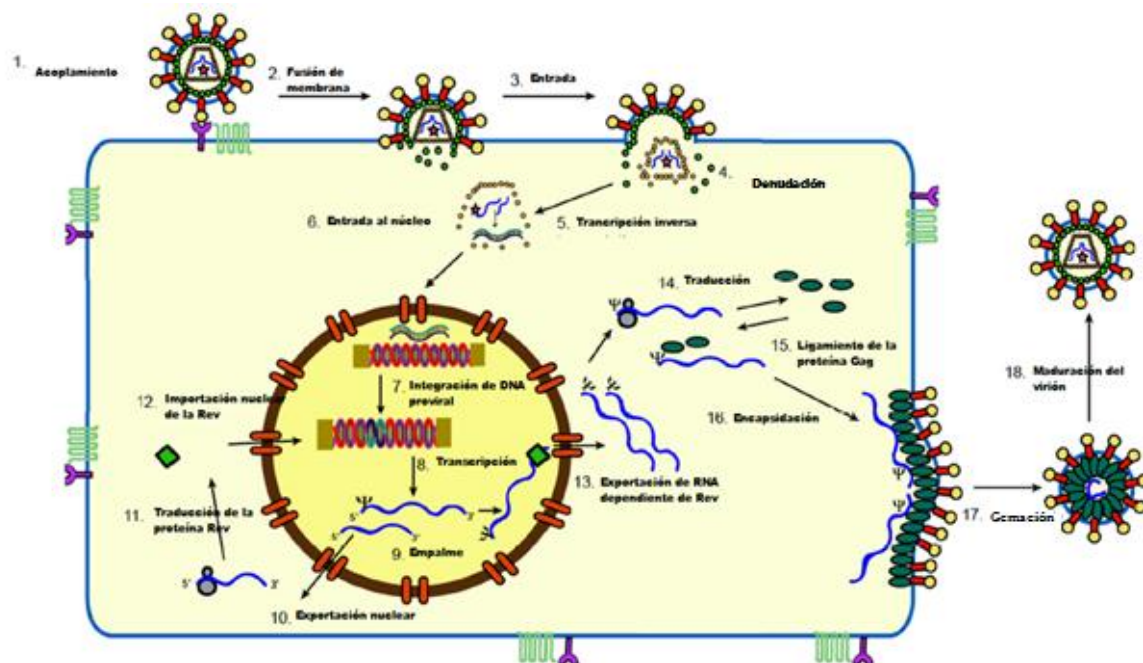
La inmunodeficiencia felina es causada por el virus de inmunodeficiencia felina, respecto al cual se habla más adelante sobre características biológicas particulares de gran importancia en el presente estudio.

## 1.3 Patogenia

Los gatos infectados con el FIV desarrollan una disfunción inmunológica progresiva caracterizada por una depleción de células T CD4+; también se pueden presentar signos de caquexia, gingivitis-estomatitis y de alteraciones neuropatológicas (Kenyon y Lever, 2011; Ackley *et al.*, 1990; Shimojima *et al.*, 2004; (Willet y Hosie, 2008). La replicación viral se esquematiza en la **Figura 1**.

El FIV infecta también a linfocitos T CD8+, macrófagos, linfocitos B, astrocitos y células de la microglía (Hein *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2005). La infección latente se mantiene cuando las células tienen el provirus integrado en el ADN celular, sin embargo no hay producción de partículas virales (McMichael, 2006).

En la fase aguda de la enfermedad, difícilmente identificada a nivel clínico, se observa un síndrome similar al del HIV: episodios de fiebre y linfadenopatía generalizada. En los primeros días de la infección el virus se replica en linfocitos T CD4+, células dendríticas y macrófagos; el pico de carga viral ocurre entre las semanas 8 a 12 después del inicio de la infección. La disminución de la carga viral implica el inicio de la fase asintomática característica de los lentivirus, que dura de meses a años, durante la cual la proporción de linfocitos T CD4/CD8 disminuye gradualmente. En esta fase la replicación viral es controlada por la respuesta inmune del hospedero y la presentación clínica pocas veces es reportada (Barlough *et al.*, 1991; Inoshima *et al.*, 1996; Hosie *et al.*, 2009).



**Figura 1** Ciclo de replicación del Virus de Inmunodeficiencia Felina. 1. La adhesión ocurre cuando el ligando viral encuentra el receptor CD134 y el correceptor CXCR4. 2. Sucede la penetración y la pérdida de la envoltura 3. El virus ingresa a la célula. 4. Desnudación (el virus pierde la cápside). 5. A partir del material genético del virus la polimerasa dependiente de ARN genera ADN de doble cadena. 6. Formación del complejo de integración viral nuclear. 7. El DNA viral se integra al DNA genómico (provirus). 8. Síntesis de ARN de progenie y generación de mARN. 9. Maduración de ARN (empalme). 10. Salida del RNA del núcleo. 11. Traducción de la proteína Rev. 12. Ingreso de la proteína Rev al núcleo. 13. La proteína Rev exporta el material genético del virus al citoplasma 14. Traducción de otras proteínas virales (enzimas, cápside, matriz, etc). 15 y 16 Ensamblaje y encapsidación. 17. Salida del virus tomando una porción de la membrana plasmática. 18. Para la infectividad el virión necesita madurar. Modificado de Kenyon y Lever, 2011.

El curso y pronóstico de la enfermedad son variables, dependiendo de las condiciones ambientales, presencia de infecciones oportunistas, edad del gato, carga viral y del subtipo involucrado. La etapa asintomática puede evolucionar a un estado asociado al síndrome de inmunodeficiencia que puede resultar en la muerte de los animales (Hosie y Beatty, 2007).

#### 1.4 Respuesta inmune

Los gatos persisten infectados a pesar de la gran producción de anticuerpos y de la respuesta inmune celular contra el virus. Las células T CD8+ específicas contra el FIV pueden ser detectadas en la sangre del hospedero después de la primera semana de infección (Beatty *et al.*, 1996). Los anticuerpos contra el FIV, incluyendo los neutralizantes, son encontrados en plasma en presencia de altas tasas de carga viral en sangre periférica (Feverieiro *et al.*, 1991). Los anticuerpos que reconocen las glicoproteínas de la envoltura viral son producidos de manera precoz comparados con los anticuerpos anti-p24 (Rimmelzwaan *et al.*, 1994; Matteucci *et al.*, 1993).

Hay evidencia de algunos factores específicos de restricción por parte del hospedero, tales como la proteína APOBEC3, que induce hipermutación del provirus del FIV (Zhang *et al.*, 2003). Si bien esto podría incrementar potencialmente la diversidad genética viral, al menos en el virus de inmunodeficiencia humana las hipermutaciones son casi letales para el virus, por lo cual no implica un beneficio para la evolución viral (Armitage *et al.*, 2012).

#### 1.5 Cuadro clínico

La mayoría de las manifestaciones clínicas no son causadas directamente por la infección retroviral, sino por infecciones secundarias, que deben ser identificadas y tratadas oportunamente. Las alteraciones clínicas observadas en los animales infectados persistentemente son numerosas y extremadamente variables, de carácter esporádico o persistente, a medida que la infección progresa (Barlough *et al.*, 1991; Teixeira, 2010).



Dado que la infección por el FIV está asociada a inmunodeficiencia, los animales se tornan más susceptibles a otras infecciones o al desarrollo de neoplasias; este virus también puede ser responsable de una respuesta inmune exacerbada, lo que resulta en enfermedades inmunomediadas (Hosie *et al.*, 2009).

En la fase inicial de la infección por el FIV, se puede observar manifestaciones como fiebre, linfadenopatía y signos sistémicos como anorexia y depresión, persistiendo por algunas semanas y desapareciendo durante una larga infección de fase crónica. La linfadenopatía puede persistir durante el tiempo que perdure la infección, presentándose hiperplasia linfoide como respuesta (Del Fierro *et al.*, 1995).

En general, después de la fase aguda los animales infectados permanecen clínicamente sanos, esto perdura años (en promedio 6) en la mayoría de los casos, sin embargo algunos gatos pueden no presentar manifestaciones clínicas relacionadas a la infección viral durante toda la vida (Addie *et al.*, 2000).

La inmunodeficiencia y/o la exacerbada respuesta inmune se manifiestan frecuentemente de forma crónica por gingivitis-estomatitis, linfadenopatía, pérdida de peso y glomerulonefritis inmunomediada. Las infecciones concomitantes que involucran protozoarios, virus y bacterias son frecuentemente relacionadas con esta infección (Flynn *et al.*, 1994; Callanan *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 1999).

En algunos casos, el virus puede causar desórdenes neurológicos (Hosie *et al.*, 2009). Se ha comprobado la actividad neurotóxica de la glicoproteína 120 (gp120) (Prospero-García *et al.*, 1994). Las manifestaciones neurológicas descritas incluyen alteraciones de comportamiento, alteraciones en patrones de sueño, dificultad de aprendizaje, convulsiones, alteraciones electroencefalográficas y paresias (Prospero-García *et al.*, 1994; Bendinelli *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1996).

En la fase final de la infección son frecuentes las alteraciones renales, tales como lesiones glomerulares y tubulointersticiales asociadas con una severa proteinuria. Estas lesiones pueden ser ocasionadas por el propio virus o por la deposición de complejos inmunes en las estructuras glomerulares (Matsumoto *et al.*, 1997).

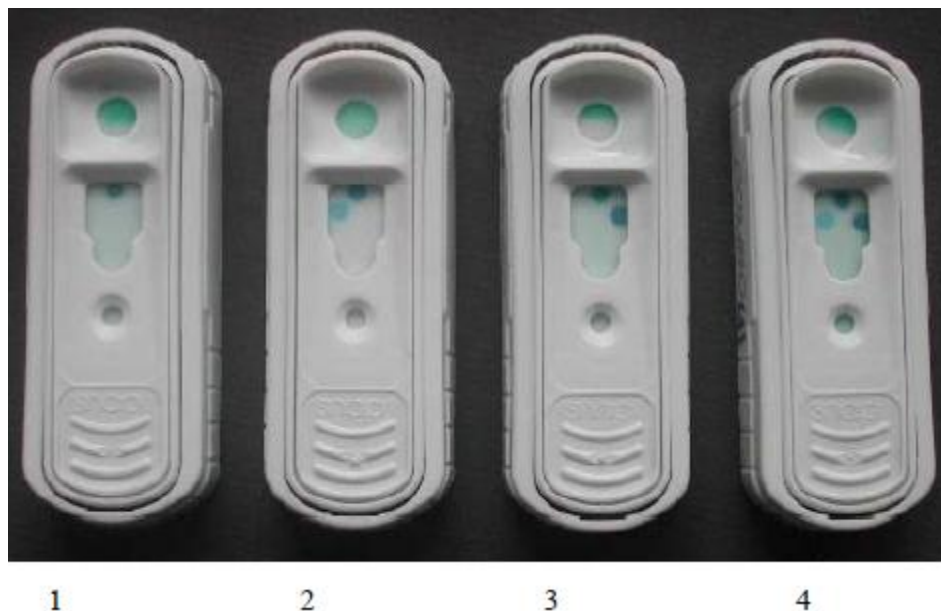
## 1.6 Diagnóstico

Los procedimientos actuales para la detección de la infección por el FIV incluyen métodos de detección directa, como el aislamiento viral y pruebas moleculares como la PCR, y métodos de detección indirecta, como las pruebas inmunológicas para detección de anticuerpos específicos como ELISA, inmunocromatografía y Western Blot (Hosie *et al.*, 2009). El diagnóstico no puede ser establecido sólo por la presencia de ciertas manifestaciones clínicas, sin embargo es importante identificar a los animales infectados para tomar medidas de control con el fin de proteger en cierta medida a otros animales susceptibles (Bendinelli *et al.*, 1995).

### 1.6.1 Técnicas serológicas

Las pruebas de rutina para identificar la infección del FIV se basan en la detección de anticuerpos que reconocen proteínas estructurales del virus (como la p24 y la p15) y una de las glicoproteínas de la envoltura viral (gp41). Estas pruebas son en forma de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) e inmunocromatografía. Una de las pruebas más utilizadas como diagnóstico rutinario es un kit comercial basado en inmunocromatografía (SNAP COMBO® anticuerpo-FIV/antígeno-FeLV Laboratorio IDEXX) que puede ser utilizado en la práctica clínica. La principal ventaja del diagnóstico de la infección basada en la detección de anticuerpos mediante inmunocromatografía es su rapidez, acceso relativamente fácil y su costo accesible (O'Connor *et al.*, 1989; Crawford y Levy, 2007), sin embargo su interpretación debe ser cuidadosamente analizada por la posible aparición de falsos resultados, por ejemplo los títulos bajos de anticuerpos pueden ser encontrados en presencia de una viremia severa, dado que se forman complejos inmunes y por ende el secuestro de anticuerpos (Crawford y Levy, 2007). La presencia de anticuerpos maternos en cachorros nacidos de madres positivas puede generar resultados positivos en estas pruebas, es por ello que es mejor realizarlas después de las 16 semanas de edad, tiempo suficiente para la eliminación completa de anticuerpos maternos. En algunos casos atípicos, los anticuerpos maternos pueden persistir por más de 16 meses, por lo que es recomendable hacer una prueba dos meses después de la primera (Levy *et al.*, 2003). En estos casos, la reacción en cadena

de la polimerasa constituye una excelente herramienta, teniendo en consideración también evaluar a la madre y en caso de ser posible identificar el tipo genético involucrado (Crawford y Levy, 2007).



**Figura 2.** Pruebas comerciales de inmunocromatografía para el diagnóstico de inmunodeficiencia felina. El kit detecta antígenos del FeLV y anticuerpos contra el FIV. 1- Muestra negativa para el FIV y el FeLV; 2- Muestra positiva para el FIV; 3- Muestra positiva para el FeLV; 4- Muestra positiva para el FIV y el FeLV. Tomado de Teixeira et al., 2010

### 1.6.2 Técnicas moleculares

Las pruebas moleculares (PCR) que detectan ADN proviral del FIV constituyen una importante herramienta diagnóstica (Bienzle *et al.*, 2004) de la cual se puede hacer uso en caso de que haya algún laboratorio universitario o de la iniciativa privada que ofrezca este servicio. Tanto las pruebas moleculares como las serológicas poseen sensibilidades y especificidades diferentes, de modo que en algunas ocasiones no hay concordancia entre los resultados (Crawford y Levy, 2007).

Recientemente el diagnóstico molecular ha sido ligeramente modificado por la amplia diversidad genética, por lo que suele complementarse con la secuenciación de los productos obtenidos mediante la PCR (Bastien *et al.*, 2003; Lara *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009). En las fases iniciales y crónicas de la

enfermedad los títulos de anticuerpos son bajos y por tanto es mejor el empleo de técnicas moleculares (Levy *et al.*, 2004).

Los resultados falsos negativos en la PCR pueden presentarse por el procesamiento inadecuado de las muestras, por una hibridación errónea de los iniciadores, una insuficiente cantidad de virus en la muestra o la inadecuada preparación de los reactivos de la PCR (Borst *et al.*, 2004).

En un estudio realizado en Canadá por *Ammersbach et al.*, 2013 se realizó una evaluación preliminar de una prueba diagnóstica para detectar la infección por el FIV mediante PCR cuantitativa, en la cual se reportaron ventajas como la lectura más rápida, precisa y objetiva de los productos de PCR comparados con los métodos de la PCR convencional (visualización mediante electroforesis de los productos), además de la oportunidad de determinar carga viral; sin embargo el desarrollo de estas técnicas requiere material y equipo costoso, sumándose la necesidad de personal especializado.

### 1.6.3 Aislamiento viral

El aislamiento viral en un cocultivo de linfocitos de sangre periférica de gatos sospechosos con células T primarias de felinos puede permitir la identificación de la infección, sin embargo el trabajo de laboratorio es muy exigente, por lo que no es usado como técnica de diagnóstico en la rutina clínica (Hosie *et al.*, 2009).

### 1.7 Profilaxis

Dado que en México no existen vacunas disponibles, las medidas de protección se reducen a limitar el acceso del gato a la calle, así mismo se recomienda la esterilización de tal manera que los cambios de conducta involucrados reduzcan el riesgo de adquirir la infección. Es así que la importancia de la protección contra este virus radica en el control de los animales ya infectados (Hosie y Beatty, 2007).

Muchos animales infectados por el FIV permanecen sin ninguna manifestación clínica durante años. En estas condiciones, se deben procurar algunas precauciones. Una de las medidas más importantes es proteger a los animales

infectados por el FIV de otras infecciones o de que representen un foco de infección para otros animales.

Es importante evitar el acceso a la calle a animales infectados y mantenerlos separados de animales no infectados o de animales con otras enfermedades infecciosas, así mismo la castración modifica la conducta minimizando la agresividad en el caso de machos, lo que a la vez disminuye la posibilidad de infectar a otros gatos así como de contraer alguna otra enfermedad infecciosa. Los gatos infectados deben ser sometidos a un examen clínico general por lo menos cada 6 meses y siempre deben ser monitoreados en cuanto a su peso y alteraciones hematológicas y/o bioquímicas (Hosie y Beatty, 2007).

En otros países como Estados Unidos y Japón existe de manera comercial la vacuna; se debe evitar la vacunación de los gatos positivos, dado que la inmunoestimulación causada por la vacuna puede promover una progresión acelerada de la enfermedad, además de que una estimulación de linfocitos positivos al virus promueve una mayor producción de partículas virales (Hosie *et al.*, 2009). Los linfocitos activos expresan un mayor número de receptores favoreciendo así la infección viral (por el mismo o por un virus de otro subtipo) (De Parseval *et al.*, 2005; Reggeti *et al.*, 2008).

#### 1.7.1 Vacunación

La rápida mutación de los lentivirus en la región de la envoltura viral con la generación de nuevas variantes o la superposición de infecciones con diferentes subtipos representan importantes limitantes para el desarrollo de una vacuna eficaz contra el FIV. Las vacunas desarrolladas con un subtipo único protegen contra la infección homóloga, pero pueden omitir la protección contra cepas divergentes que representen más del 20% de diferencia en las secuencias del gen *env* (Elyar *et al.*, 1997).

De manera comercial, en Estados Unidos, Japón, Australia y Nueva Zelanda ya se ofrece una vacuna con virus inactivado de los subtipos A (Petaluma) y D (Shizuoka) de Fort Dodge Animal Health (Uhl *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2007), la cual ha

reportado buenos resultados en Estados Unidos, donde ningún caso de infección ha sido descrito en animales vacunados (Yamamoto *et al.*, 2007).

La *European Advisory Board on Cat Diseases* (ABCD) no recomienda el uso de la vacuna en la Unión Europea debido a la imposibilidad de diferenciar mediante pruebas serológicas a los animales vacunados de los animales infectados, además de que no hay una protección completa para los tipos genéticos descubiertos hasta ahora (Hosie *et al.*, 2009).

En México no hay vacuna disponible comercialmente para evitar la infección por el virus de inmunodeficiencia felina.

## 1.8 Tratamiento

El tratamiento en la mayoría de las ocasiones es de soporte y dirigido contra las condiciones mórbidas concomitantes. La gingivitis/estomatitis crónica puede requerir el uso de antiinflamatorios esteroideos o de otros fármacos inmunosupresores con el fin de permitir la deglución, sin embargo este tipo de terapia puede conllevar otros efectos colaterales (Barr *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2003; Phillipis *et al.*, 2005). Respecto a los cambios hematológicos, en casos de neutropenia se ha reportado el uso de filgrastim, un fármaco estimulante de las colonias de granulocitos (Phillipis *et al.*, 2005).

### 1.8.1 Antivirales

Algunos fármacos antivirales utilizados para el tratamiento del HIV han sido probados contra la infección del FIV, sin embargo se ha reportado casos de toxicidad en gatos domésticos (Hosie *et al.*, 2009).

La azidotimidina (AZT) es un análogo nucleósido que bloquea la retrotranscriptasa, de tal manera que inhibe la replicación *in vitro* e *in vivo* del FIV. Su uso puede reducir la carga viral, mejorando la calidad de vida de los animales positivos. La evaluación hematológica semanal debe realizarse en los primeros meses de tratamiento, debido a la anemia no regenerativa que se observa en dosis elevadas;

por ello el uso de la AZT no está recomendado para los gatos con supresión medular. Por otro lado, como en el caso del HIV, posterior al uso de este fármaco pueden aparecer mutaciones del virus que impliquen resistencia. Sin embargo no existe una forma farmacéutica disponible de la AZT para uso veterinario (Kuritzkes, 2007, Martins *et al.*, 2008). Otro medicamento que si bien hoy día no está autorizado como antiviral, pero ha demostrado ser prometedor es el AMD3100. Esta molécula actúa como un agonista selectivo del receptor de citocina CXCR4, que cuando es bloqueado inhibe la entrada del virus. Esta molécula disminuye las manifestaciones clínicas de los animales y reduce la carga viral en los hospederos (Hosie *et al.*, 2009)

Los interferones son citocinas con actividad antiviral, inmunomoduladora y antineoplásica. El interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ) recombinante humano administrado por vía oral induce un estado antiviral en las células, además de estimular un efecto inmunomodulador en el hospedero (Tompkins, 1999). El uso de IFN- $\alpha$  humano ha sido utilizado en gatos infectados y se han descrito efectos positivos, prolongando la vida de los animales infectados (De Mari *et al.*, 2004).

Un interferón-omega felino ya se utiliza como producto veterinario en Europa y Japón. Este se puede utilizar durante toda la vida del felino sin inducir producción de anticuerpos, como puede ocurrir con el uso de interferón humano (Hosie *et al.*, 2009), se ha reportado buena actividad *in vitro*.

## 2. Virus de Inmunodeficiencia Felina

El FIV es un virus ARN con amplia distribución geográfica. La morfología de las partículas virales, las características bioquímicas de la enzima transcriptasa reversa y la secuencia nucleotídica de su genoma han permitido clasificar al FIV dentro del género *Lentivirus*, de la familia *Retroviridae*. Los lentivirus se caracterizan por ocasionar enfermedades con un largo período de incubación entre el momento de la infección y la aparición de la semiología clínica (Gabor 2001; Chang-Fung-Martel, 2013). El virión mide de 105-125nm de diámetro, de morfología icosaédrica y con envoltura. La partícula viral está constituida por una única cadena diploide de ARN, de polaridad positiva (Shimojima *et al.*, 2004).

### 2.1 Genoma

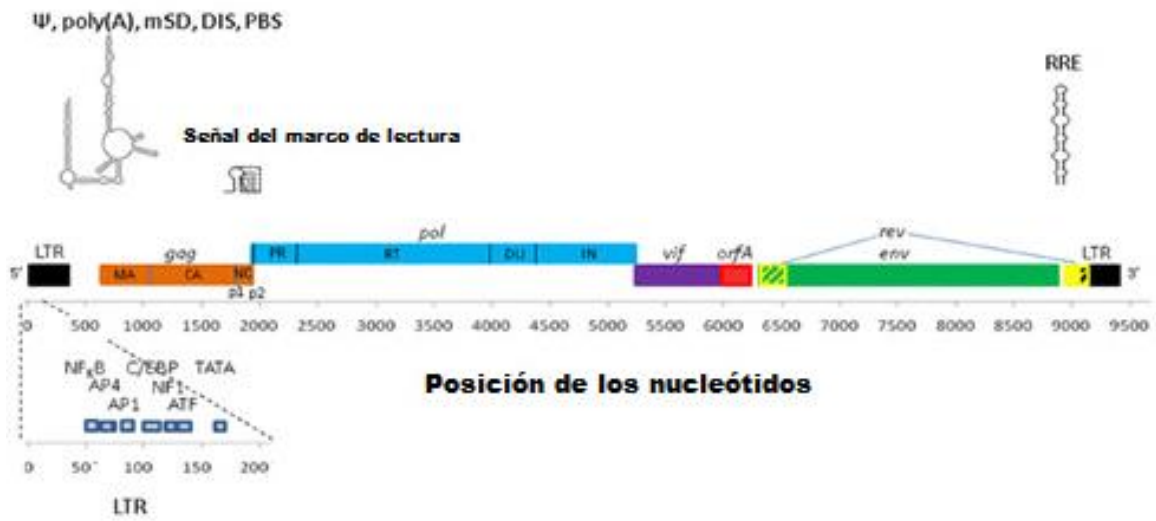
El genoma del FIV tiene una longitud de aproximadamente 9500 bases, en el que están presentes los tres principales genes característicos de los retrovirus: *gag*, *pol* y *env* (Stickney *et al.*, 2013). El gen *pol* codifica las enzimas virales necesarias para la replicación y ensamblaje viral: transcriptasa reversa (RT), proteasa, integrasa y la fosfatasa deoxiuridina (dUTPasa) (Elder y Philips, 1993). El gen *gag* codifica una proteína precursora (Pr) de gran tamaño, la cual posteriormente es dividida por la proteasa viral para producir la proteína de matriz, cápside y nucleocápside. (Luttge y Freed, 2009). El gen *env* codifica la glicoproteína de la envoltura, expresada en la superficie de células infectadas y viriones; la constituyen dos subunidades: la unidad de superficie (gp120) y la unidad de transmembrana (gp41) (Pancino *et al.*, 1993; Shimojima *et al.*, 2004). Además, el FIV posee al menos tres genes accesorios (*Vif*, *ORF-A* y *Rev*) que desempeñan su función en la expresión génica viral, infectividad y replicación viral (Miyazawa *et al.*, 1994). En el **Cuadro 1** y **Figura 3** se puede observar la organización del genoma del FIV, así como la descripción de las principales funciones de sus productos proteicos.

La alta variabilidad nucleotídica es resultado de las mutaciones que ocurren durante la transcripción viral, así como de la susceptibilidad de la transcriptasa reversa a errar, ya que no cuenta con una función de corrección, como sucede con otras polimerasas. Las mutaciones son más frecuentes en el gen *env*, donde se



han identificado nueve regiones variables (V1-V9) (Pancino *et al.*, 1993). Se ha demostrado que los genes *pol* y *gag* son más conservados que el *env* (Greene *et al.*, 1993). La glicoproteína de envoltura contiene importantes epítomos y las mutaciones pueden originar una evasión inmunológica más eficaz, lo que implica una ventaja evolutiva (Stickney 2013). En contraste, las mutaciones en el gen *gag* y *pol* alteran la función de enzimas esenciales y proteínas estructurales, lo que resulta ser letal para el virus y representa una desventaja evolutiva importante. Por otro lado, la variabilidad de la secuencia genómica también se incrementa por los frecuentes eventos recombinantes debido a altas densidades poblacionales, así como por la presencia de coinfecciones (Reggeti y Bienzle, 2004; Hayward y Rodrigo, 2008; Teixeira, 2010). Para que la recombinación suceda, una célula debe ser coinfectada con dos virus diferentes, además deben ser producidos viriones híbridos que posean una cadena de ARN de cada virus (Kann *et al.*, 2007). La recombinación intergénica sucede de manera menos frecuente, pero han sido reportados genomas que poseen el gen *env* y *pol* de diferentes subtipos (Hayward y Rodrigo, 2008).

Esta variabilidad genética permite al virus el desarrollo de mecanismos de evasión inmunológico, tales como la variabilidad de proteínas de superficie, así como de mecanismos de adaptación frente a antivirales o a condiciones ambientales desfavorables (Teixeira *et al.*, 2009). Sin embargo se ha demostrado que el virus resiste apenas algunos minutos fuera del hospedero y es susceptible a la mayoría de los desinfectantes (Hosie *et al.*, 2009).



**Figura 3** Organización del genoma del FIV. Los genes y LTRs se muestran a escala. El gen *pol* es traducido de ARN como una proteína de fusión Gag/Pol a través de un marco de lectura. LTR: Long Terminal Repeat, MA: Matriz, CA: Cápside, NC: Nucleocápside, PR: Proteasa; RT: Transcriptasa reversa; DU: dUTPasa; IN: integrasa. Modificado de Kenyon y Lever, 2011.

**Cuadro 1. Principales funciones de las proteínas del FIV**

<b>Gen</b>	<b>Productos funcionales</b>	<b>Principales funciones.</b>
<i>Gag</i>	Matriz	Proteína estructural del virión
	Cápside	Proteína estructural del virión
	Nucleocápside	Recubrimiento del ácido nucleico.
<i>Pol</i>	Proteasa	Ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas precursoras Gag y Gag-Pol, para la posterior maduración del virión.
	Transcriptasa Reversa	Transcripción inversa del ARN genómico en ADN proviral.
	Trifosfatasa Deoxiuridina (dUTPasa)	Limitación de la incorporación errónea de uracilo durante la transcripción inversa.
	Integrasa	Integración del ADN proviral en el genoma del hospedero.
<i>Vif</i>	Factor de infectividad viral.	Bloqueo de las citidina desaminasas de la célula infectada.
<i>orfA</i>	Marco abierto de lectura.	Activación transcripcional, en el control del empalme y en la diseminación de los viriones.
<i>Rev</i>	Proteína reguladora de la expresión del ARN viral.	Exportación nuclear parcial de transcritos de ARN.
<i>Env</i>	Transmembrana y proteínas de superficie (SU).	Unión del virión, así como la entrada en células blanco.

El FIV, como todos los Retrovirus, presenta los tres genes característicos (*env*, *gag* y *pol*), además de algunos genes accesorios (*Vif*, *Orf A*, *Rev*) los cuales codifican proteínas importantes con funciones necesarias en la replicación del virus. Tomado de Kenyon y Lever, 2011.

## 2.2 Epidemiología

Se ha descubierto que el FIV tiene un amplio rango de hospederos dentro de la familia *Felidae*; la prevalencia de la infección depende del país, edad, género y riesgo de exposición (Olmsted *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 1999).

El VIF se encuentra ampliamente distribuido en el mundo (Beatty, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007). En todos los países donde se ha buscado la infección ésta ha sido confirmada. En la **Figura 4** se muestran los países donde ha sido confirmada la infección así como el subtipo correspondiente.

Los datos de prevalencia en gatos expuestos al FIV en diferentes regiones geográficas son variables, sin embargo se reporta un intervalo del 1 al 22% (Spada *et al.*, 2012; Sukura *et al.*, 1992; Dorny *et al.*, 2002; Rypula *et al.*, 2014; Tiao *et al.*, 2012; Chang-Fung-Martel *et al.*, 2013).

En México sólo existen tres estudios que describen la enfermedad: el primero a cargo de Morales-Ramírez, 1993, donde a partir de pruebas comerciales de inmunocromatografía que detectan anticuerpos no se encontró ningún caso positivo al FIV; el segundo estudio fue realizado en Yucatán donde Ortega-Pacheco *et al.*, 2013, igualmente con pruebas de inmunocromatografía encontraron una prevalencia de 2.5%, mientras que el tercer estudio (Marín *et al.*, 2005) abarcó diferentes estados de la República obteniendo una prevalencia del 7.4%. Cabe resaltar que ninguno de estos estudios detectó de manera directa al virus, sino la presencia de anticuerpos contra el mismo.

En cuanto a la distribución geográfica, dependiendo del tipo genético se ha demostrado que el subtipo A se encuentra altamente distribuido alrededor del mundo (Weaver, 2010). El subtipo B ha sido reportado en EUA, Canadá, Argentina, Japón, Italia, Australia y Alemania (Reggeti y Bienzle, 2004; Weaver, 2010). El subtipo C ha sido identificado en Canadá, Nueva Zelanda, Alemania, Japón, Taiwán, Vietnam, EUA y Sudáfrica (Nakamura *et al.*, 2003; Reggeti y Bienzle, 2004). Los subtipos D y E son menos comunes; se ha descrito el subtipo D en Asia, específicamente en Japón, Vietnam y Tailandia (Nakamura *et al.*, 2003;

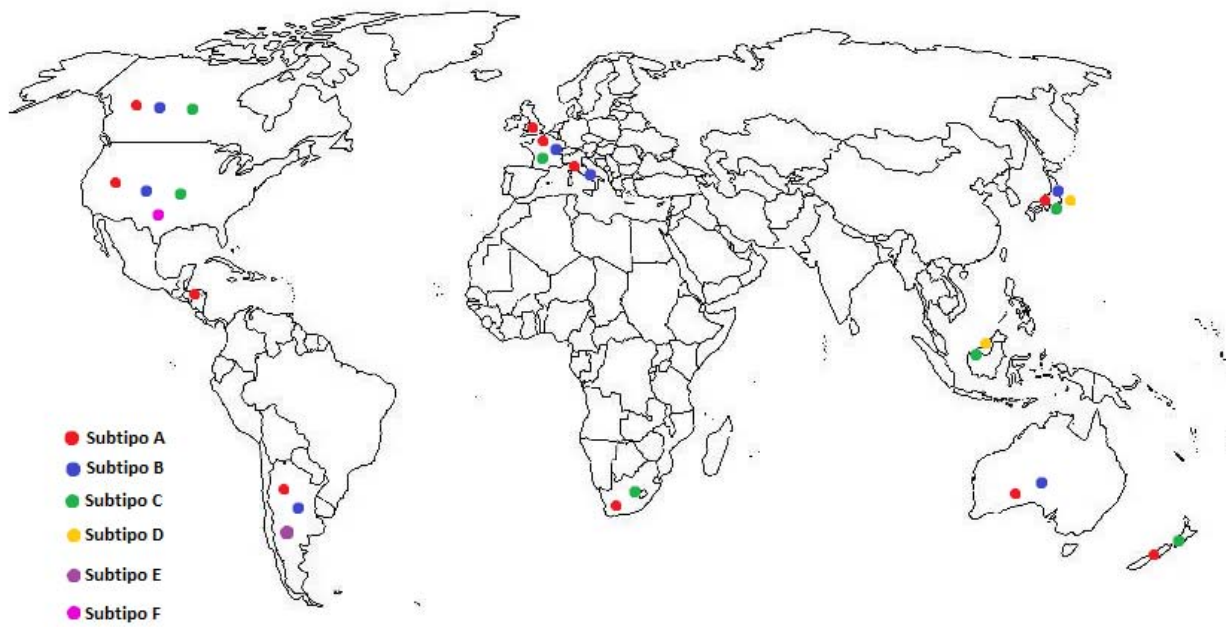
Keawcharoen *et al.*, 2006) y para el subtipo E sólo ha sido reportado en Argentina (Pecorato *et al.*, 1996). Finalmente, el subtipo F ha sido identificado sólo en los Estados Unidos de América (Weaver 2010).

Los estudios epidemiológicos evidencian que la población con mayor riesgo de infectarse son los gatos machos callejeros con edades comprendidas entre los 5 y 10 años; además, los gatos de raza indefinida demuestran un mayor riesgo de infección respecto a los de raza pura (Gentile *et al.*, 1996). Una importante vía de transmisión es la inoculación por mordedura de gatos infectados (eliminación del virus a través de la saliva) a gatos susceptibles, esto principalmente por las luchas territoriales frecuentes entre gatos machos (Pedersen *et al.*, 1999; Hosie y Beatty, 2007). La transmisión vertical ocurre en el útero, durante el parto o a través del calostro y la leche (O'neil *et al.*, 1995; Hoover, 2003). Por otro lado, la transmisión oronasal y venérea no ha sido demostrada de manera natural, pero sí de manera experimental (Teixeira, 2010).

**Cuadro 2. Prevalencia del FIV reportada en gatos domésticos de diferentes países.**

País	Características de la población	n	FIV (+)	Referencia
EUA	Mixta	2254	14%	Yamamoto <i>et al.</i> , 1989
EUA	Feral	553	5.2%	Luria <i>et al.</i> , 2007
Reino Unido	Clínicamente sanos	1007	6%	Hosie <i>et al.</i> , 2007
Finlandia	Callejeros	196	6.6%	Sukura <i>et al.</i> , 1992
Alemania	En necropsia	255	6%	Holznagel <i>et al.</i> , 1997
Italia	Clínicamente sanos	203	11.3%	Bandecchi <i>et al.</i> , 2006
España	Clínicamente sanos	180	8.3%	Arjona <i>et al.</i> , 2000
Turquía	Muestreo aleatorio	103	22.3%	Yilmaz <i>et al.</i> , 2000
Israel	Enfermos	37	22%	Harrus <i>et al.</i> , 2002
Vietnam	Gatos callejeros	54	22%	Nakamura <i>et al.</i> , 2000
Taiwán	Gatos esterilizados	75	4%	Lin <i>et al.</i> , 1995
Australia	Clínicamente sanos	200	7.5%	Malik <i>et al.</i> , 1997
Australia	Ferales	66	9%	Winkler <i>et al.</i> , 1999
Australia	Enfermos	101	50%	Gabor <i>et al.</i> , 2001
México	En necropsia	45	0%	Morales-Ramírez, 1993
México	Muestreo aleatorio	100	2.5%	Ortega-Pacheco, 2013
México	Muestreo aleatorio	500	7.4%	Marín <i>et al.</i> , 2005

n = número de gatos considerados en el estudio: FIV (+)= porcentaje de gatos infectados por el FIV



**Figura 4.** Distribución geográfica del FIV según sus tipos genéticos. Se describen seis subtipos del Virus de Inmunodeficiencia Felina (A-F), de los cuales el A y B están ampliamente distribuidos en el mundo, mientras que el C, D han sido reportados en pocos países; el E sólo se ha reportado en Argentina y el F en el estado de Texas en Estados Unidos (Stickney et al., 2013).

## **II Justificación**

En México existe escasa información sobre el FIV, donde se incluyen algunos trabajos de identificación serológica por inmunocromatografía, no obstante, no se tiene respaldo sobre la presencia a nivel molecular del Virus de Inmunodeficiencia Felina. La inmunodeficiencia felina es una enfermedad que tiene presentaciones clínicas inespecíficas, comúnmente relacionadas a inmunosupresión, por lo que se vuelve importante detectar la causa primaria de ésta. Por otro lado, en la actualidad la única forma de diagnosticar la infección del FIV es por medio de pruebas comerciales que sólo detectan anticuerpos contra algunas proteínas virales. Debido a esto es importante generar información sobre la presencia del virus en México, así como estudiar y sentar las bases para una mejora en las técnicas de diagnóstico locales. El presente trabajo pretende implementar una prueba de detección a nivel molecular para identificar el FIV, determinar los factores de riesgo inherentes a la enfermedad y complementar el conocimiento que se tiene de esta infección en el país.

### **III Hipótesis**

En los gatos que habitan el área metropolitana de la Ciudad de México está presente el Virus de Inmunodeficiencia Felina y mediante el uso de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa es posible detectarlo de manera directa en gatos clínicamente sanos lo que a la vez generará información para analizar posibles factores de riesgo de la infección.



## IV Objetivos

- General
  - Identificar la presencia de la infección por el FIV en gatos de la zona metropolitana del Valle de México utilizando PCR.
  
- Particulares
  - Diseñar iniciadores para la técnica de PCR con la finalidad de identificar ADN proviral en células mononucleares de sangre periférica.
  - Estandarizar las condiciones de la PCR para la detección del FIV.
  - Establecer la prevalencia del FIV en una población de gatos de la zona metropolitana del Valle de México.
  - Determinar algunos factores de riesgo implicados en la prevalencia del FIV en este estudio.

## V Metodología

### 1. Población de estudio

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular (L-504) de la Facultad de Estudios Superiores, ubicada en la Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

El grupo de estudio se conformó por una población de 100 gatos con características heterogéneas. Las muestras fueron obtenidas en colaboración con el Hospital de Pequeñas Especies de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (HPE-FES-C) a partir de gatos clínicamente sanos que acudieron a vacunación y por otra parte de gatos remitidos al laboratorio donde los propietarios de manera voluntaria accedieron a colaborar con el estudio. Los gatos al momento del muestreo no presentaron signos clínicos sugestivos de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Felina, además se generó un expediente clínico de forma individual.

### 2. Procesamiento de las muestras

De cada gato se obtuvo una muestra de sangre completa (2ml) en tubos con EDTA por punción en la vena cefálica. Las muestras se centrifugaron para obtener dos fracciones; de la fracción líquida se obtuvo el plasma y de la celular se separó mediante gradientes de densidad las células mononucleares de sangre periférica siguiendo el protocolo de Gorodezky *et al.*, 2009.

De las células mononucleares se extrajo el ADN total siguiendo las indicaciones del kit comercial FavorGen®. El ADN fue cuantificado y almacenado a -20°C hasta su uso.

### 3. Reacción en cadena de la polimerasa

Para el diseño de los iniciadores a utilizar en la PCR, se consideraron secuencias del gen *gag* en la región de cápside, tomando en cuenta lo descrito en la literatura y las secuencias nucleotídicas de genomas completos del FIV disponibles en la base

de datos del GenBank. Para el diseño se utilizaron los programas bioinformáticos BioEdit y Primer3 Input, donde además se incluyeron bases degeneradas con el fin de ampliar el espectro de detección considerando 6 subtipos reportados del FIV y que los iniciadores se ubicaran en regiones conservadas. Por último se emitió la petición comercial de síntesis al laboratorio Eurofins®, ubicado en Alabama, Estados Unidos de América.

La mezcla de reacción utilizada para la PCR fue: buffer 1X, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 225µM de cada dNTP, 600nM de cada iniciador, 0.08 U/µl de Taq ADN polimerasa y 500ng de DNA por reacción en un volumen final de 30µl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94°C, seguido por 45 ciclos a 94°C por 50 segundos; una hibridación de 50°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 40 segundos y un paso final de extensión a 72°C por 7 minutos en un termociclador Bio-Rad Gene Cyclyer™. Al finalizar la PCR el producto fue analizado y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% conteniendo bromuro de etidio, el cual fue visualizado en un transiluminador con luz UV (UVP® USA).

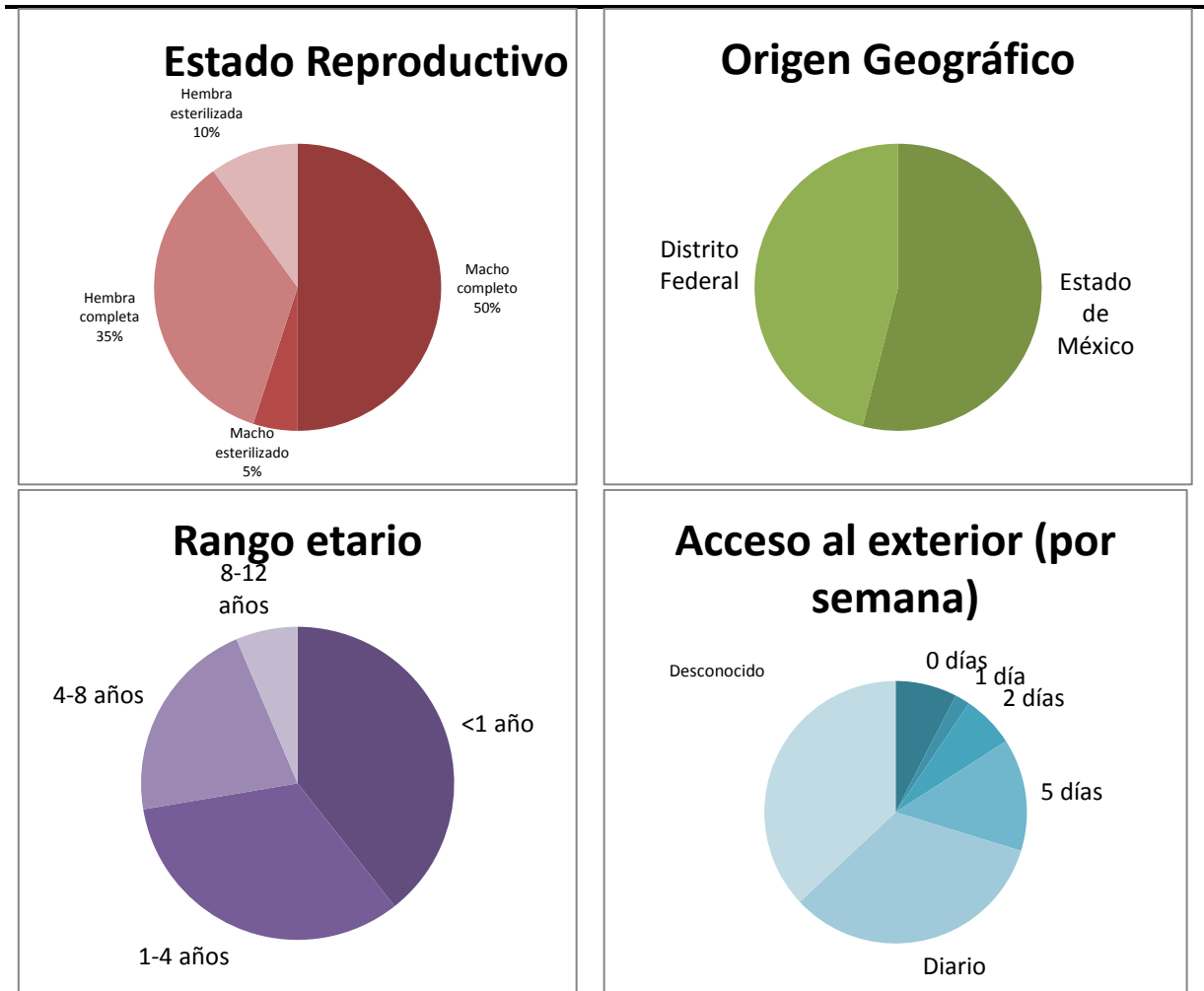
Las amplificaciones que comparadas con el marcador de pares de bases, correspondieran a la altura de 511 pares de bases fueron consideradas positivas.

#### 4. Análisis e interpretación de los resultados

En base a los resultados obtenidos mediante PCR se clasificó a la población estudiada en relación a su resultado positivo o negativo a la prueba y a la vez se dividió considerando características demográficas como edad, raza, ubicación geográfica, cohabitación intraespecífica y acceso al exterior de la vivienda; datos que mediante se sometieron a un estudio de hipótesis y análisis de varianza de dos factores para cada característica estudiada. Además se utilizó la información referente al número y proporción de positivos y negativos para estimar la frecuencia de la infección y la prevalencia del virus en el área estudiada.

## VI Resultados

Las características de la población de estudio analizadas se estructuraron de la siguiente forma: el 55% fueron machos y el 45% hembras; el intervalo etario fue: 37% de los gatos menores de un año, 41% entre 1-4 años, 10% entre 4-8 años, 6% entre 8-12 años y 6% de gatos mayores de 12 años. Respecto a la ubicación geográfica, el 54% de las muestras provenían de gatos que habitan en el Distrito Federal, mientras que el 46% fueron de gatos provenientes del Estado de México. Estas características, así como los datos referentes al acceso al exterior se muestran esquematizados en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Características de la población estudiada. Se muestra la distribución de los gatos evaluados en el estudio considerando el estado reproductivo, el lugar de origen, el rango etario y el acceso al exterior en días a la semana. La información se obtuvo mediante un cuestionario respondido por los propietarios de los gatos.

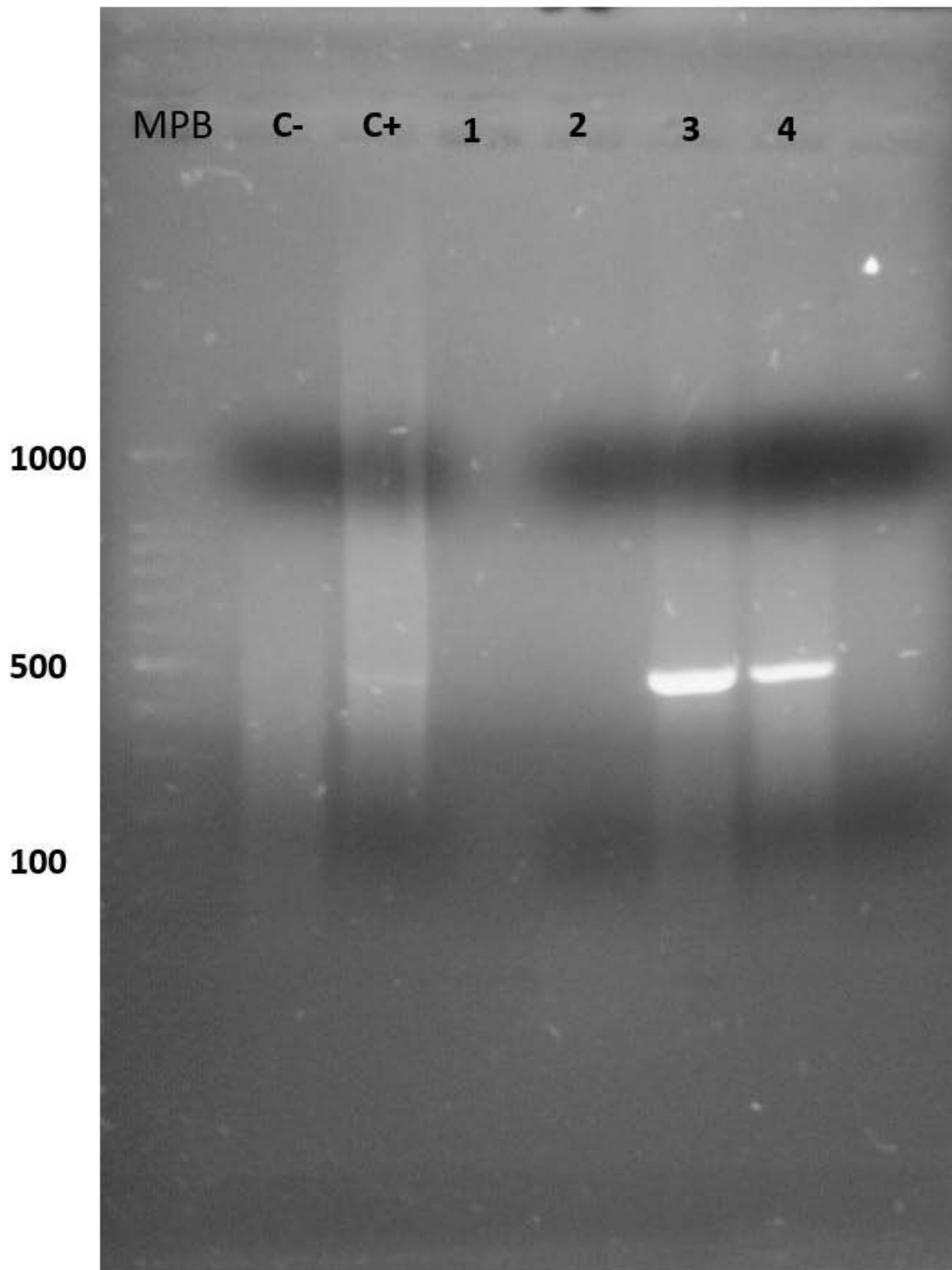
## 1. Características de los iniciadores

Las características de los iniciadores y la secuencia se muestran en el **Cuadro 3**.

<b>Cuadro 3. Características de los iniciadores diseñados para hibridarse al gen <i>gag</i> del FIV.</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Longitud (bases)</b>	<b>Producto esperado</b>	<b>TM</b>
TG1 <i>gag</i> FIV	TAGGAGGTGTCGAAGTTCAACTAT	24	511 pares de bases.	59.3
Rut <i>gag</i> Rv FIV	GTA CTCTCTTG YTTAAGRTG	20		61.2

## 2. Reacción en cadena de la polimerasa

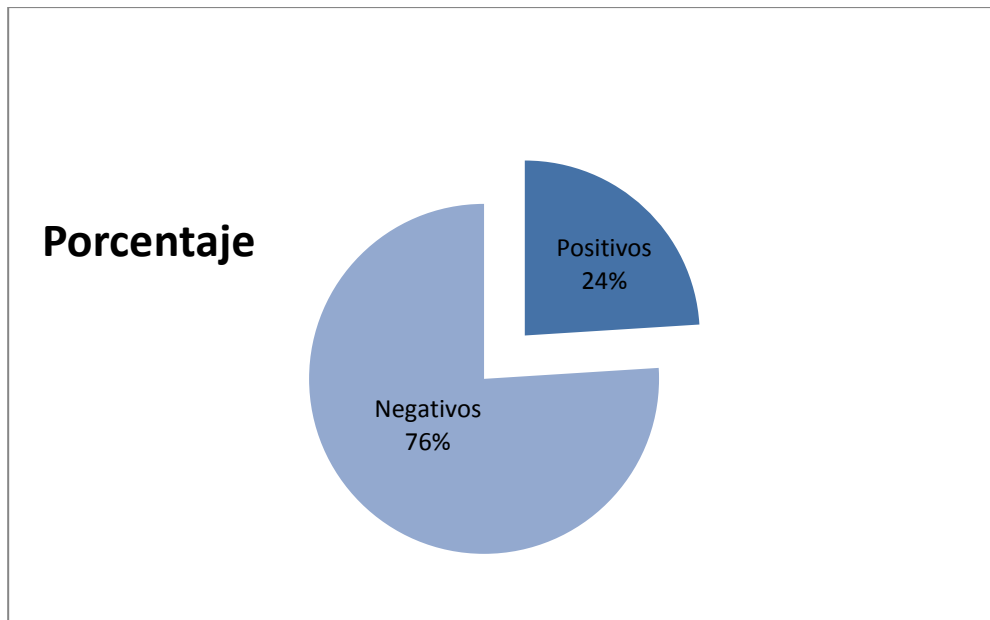
Se estandarizó la técnica de PCR utilizando como molde ADN proviral derivado de células mononucleares de sangre periférica de gatos domésticos infectados por el FIV. Los productos positivos amplificaron bandas de un tamaño de 511 pares de bases nucleotídicas. Del total de las 100 muestras de ADN evaluadas por PCR se obtuvo en un 24% de ellas resultados positivos. En la **Figura 6** se observa un gel de agarosa donde se puede apreciar una amplificación positiva mientras que en la **Figura 7** se aprecian en porcentajes los resultados obtenidos en la PCR para detectar ADN proviral del FIV .



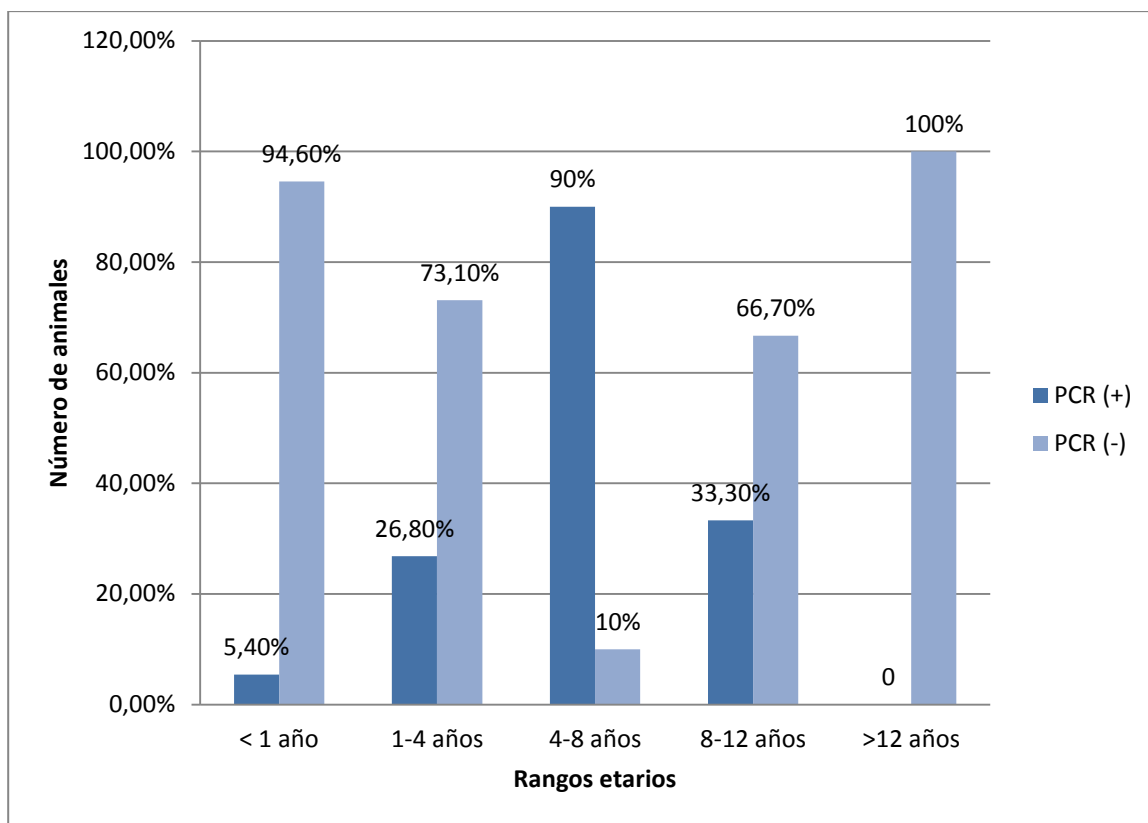
**Figura 6.** Gel de agarosa donde se muestra un ejemplo de resultados positivos a la PCR del gen *gag* del FIV. Detección de ADN proviral en células mononucleares de gatos por PCR, mostrando los productos de amplificación obtenidos para la región genética *gag* del FIV. Mpb: marcador de pares de bases; C-: control negativo; C+: control positivo; 1 y 2: muestras de gatos no infectados; 3 y 4: muestras de animales positivos.

### 3. Frecuencia y prevalencia

Por la relación de los resultados obtenidos en la PCR (**Figura 7**) se reporta una frecuencia de 24/100 para la infección por el FIV, por lo que la prevalencia del FIV en el área metropolitana de la Ciudad de México es de 24%



**Figura 7.** Relación de resultados de la PCR basada en la región genética *gag* del FIV en una población heterogénea de 100 gatos. Se encontraron resultados positivos en 24% de la población.



**Figura 8** Relación de los resultados obtenidos en la PCR con los rangos etarios. Se determinó el rango etario como potencial factor de riesgo para la infección por el FIV. Es de destacarse la proporción mayor de gatos infectados en las edades de 1 a 4 (26.8%) y de 4 a 8 años (90%).

#### 4. Potenciales factores de riesgo

Mediante una prueba de hipótesis y un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo realizada en la característica de la población referente al rango etario se encontró una significancia estadística comparando los positivos contra los negativos a la prueba. Además destaca que en los rangos la clase donde se ubicó el mayor porcentaje de gatos infectados fueron entre 1-4 años con 26.8% de los gatos con resultado positivo, mientras que de 4-8 años el 90% de los gatos resultaron infectados (**Figura 8**).

En cuanto al género, los machos presentaron mayor proporción de casos positivos (31%) comparados con las hembras (15.5%) (**Cuadro 4**) y se observó una alta influencia en los resultados respecto a la cohabitación con otros felinos (**Cuadro 5**).

El análisis estadístico de varianza demostró una diferencia significativa en los factores de riesgo asociados al acceso al exterior, cohabitación con otros gatos y género (**Cuadro 6**).



**Cuadro 4. Relación entre el rango etario, género, acceso al exterior, región geográfica y raza con los resultados obtenidos mediante PCR para detectar ADN proviral del FIV.**

<b>Edad</b>	<b>Total de gatos</b>	<b>Provirus (+)</b>
<1 año	37	2
1-4 años	31	11
4-8 años	20	9
8-12 años	6	2
>12 años	6	0
<b>Género</b>		
Macho (completo)	50	15
Macho (castrado)	5	2
Hembra (completa)	35	5
Hembra (esterilizada)	10	2
<b>Acceso al exterior (por semana)</b>	n= 76*	
1 día	2	0
2 días	7	4
5 días	15	5
Diario	36	13
Sin acceso	40	2
<b>Estado de México</b>	54	12
<b>Distrito Federal</b>	46	12
<b>Raza Pura</b>	4	1
<b>Sin raza</b>	96	23

Resultados obtenidos en la población de gatos de estudio y su correlación con la detección de provirus del FIV.

\*De los 100 gatos del estudio, solo 76 estuvieron expuestos al exterior.

**Cuadro 5. Relación entre gatos positivos a provirus del FIV y su convivencia con otros gatos.**

Número de gatos	Número de gatos con los que convive	Detección de provirus
18	0	1
20	1	1
9	3	3
16	5	4
37	Más de 5	15

Número de gatos en convivencia en un mismo hábitat de la población total de estudio en correlación con la detección de ADN proviral del FIV. Los datos de convivencia se obtuvieron de un cuestionario realizado a los propietarios de los animales.

**Cuadro 6. Resultados del análisis de varianza de dos vías de los factores de riesgo estudiados.**

	Prevalencia del FIV	FIV (+)	FIV (-)	P
Raza pura	1%	1/24 (4%)	3/76 (4%)	0.78
Raza indefinida	23%	23/24 (96%)	73/76 (96%)	
Sin acceso al exterior	2%	2/24 (8%)	36/76 (47%)	< 0.05 *
Con acceso al exterior	22%	22/24 (92%)	40/76 (53%)	
Sin cohabitación con otros gatos	1%	1/24 (4%)	18/76 (24%)	< 0.05 *
En cohabitación con otros gatos	23%	23/24 (96%)	58/76 (76%)	
Estado de México	12%	12/24 (50%)	42/76 (55%)	0.28
Distrito Federal	12%	12/24 (50%)	34/76 (45%)	
Macho	17%	17/24 (70%)	38/76 (50%)	< 0.05 *
Hembra	5%	7/24 (29%)	38/76 (50%)	

\* Estadísticamente significativo

## VII Discusión

La población de estudio analizada en el presente trabajo fue conformada por cien gatos domésticos muestreados aleatoriamente y ubicados en dos regiones geográficas bien definidas (Distrito Federal y Estado de México). Se evaluó la frecuencia de infección mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y se analizaron los factores de riesgo asociados a la infección del FIV.

Sólo se han realizado tres estudios realizados en México, sin embargo fueron desarrollados utilizando pruebas comerciales de inmunocromatografía que detectan anticuerpos. El primer estudio (Morales-Ramírez, 1993) se desarrolló en el Distrito Federal y Estado de México donde no se encontró positividad al FIV; el segundo estudio (Ortega-Pacheco *et al.*, 2013) reporta una prevalencia del 2.5% y el tercer estudio (Marín *et al.*, 2005) de 7.4%. Los resultados de las pruebas de inmunocromatografía no son concluyentes debido a que en etapas tempranas de la infección no se ha montado la respuesta inmunológica, o bien en la etapa final el sistema inmune se encuentra deprimido por lo que la producción de anticuerpos puede ser nula (Hosie y Beatty, 2007; Hayward y Rodrigo, 2010; Ammersbach y Bienzle, 2011; Chang-Fung-Martel, 2013).

La PCR diseñada en este trabajo detectó la presencia del virus en gatos del centro del país, además identificó un porcentaje de positividad ligeramente superior a los trabajos realizados en otros países, con la excepción de Materazzi (2011), quien detectó un 35% de prevalencia en Argentina. Por otro lado se registran en otras investigaciones que los valores de detección de ADN proviral son altamente variables, por ejemplo en Italia se reporta una prevalencia del 7% (Spada *et al.*, 2012), en Finlandia del 6.6% (Sukura *et al.*, 1992), en Bélgica de 11.3% (Dorny *et al.*, 2002), en Polonia de 4.2% (Rypula *et al.*, 2014), 5% en los Estados Unidos y en Australia del 10.4% (Chang-Fung-Martel *et al.*, 2013); es importante mencionar que en estos estudios la región genética estudiada se encontraba dentro del gen *env*.

En el estudio realizado por Teixeira, 2010 en un grupo heterogéneo de gatos y en el cual se diseñó una PCR para detectar provirus del FIV, se encontró un 23% de gatos positivos en la PCR, lo cual fue altamente concordante con la prevalencia encontrada en el presente trabajo (24%), sin embargo de igual forma el estudio

citado fue desarrollado basándose en amplificaciones de productos dentro del gen *env*.

En los trabajos descritos por Dorny *et al.* (2002) y Rypula *et al.* (2014) fueron utilizados iniciadores diseñados en el gen *env*, mientras que Spada *et al.*, 2012 y Tiao *et al.*, 2012 lo hicieron con iniciadores diseñados en el gen *gag*.

En el presente estudio se diseñaron iniciadores para detectar la región de cápside en el gen *gag*, encontrándose una diferencia superior del 7% en la detección de ADN proviral en esta región genética comparado con lo reportado por Spada *et al.*, 2012 y del 5% en comparación por lo descrito por Tiao *et al.*, 2012; esto puede ser explicado debido a que en la PCR descrita en el presente estudio el diseño fue complementado con el empleo de bases degeneradas con el fin de ampliar el espectro de detección del provirus, considerando que existen 6 subtipos diferentes del FIV. El establecimiento de la PCR en el gen *gag* se justifica dado que es uno de los genes de los retrovirus que presenta un menor número de mutaciones y se considera conservado.

Con excepción de Ammersbach *et al.*, 2013 que utilizó una PCR cuantitativa encontrando una frecuencia de 23/29 gatos positivos al FIV, los demás estudios consultados utilizan una técnica de PCR convencional, también conocida como PCR punto final.

En las técnicas descritas por Stickney *et al.*, 2013 y Weaver, 2010 se emplearon 1000ng como molde de gADN para el desarrollo de la PCR, sin embargo en el presente trabajo se encontró que el uso excesivo de molde de gADN limitaba la concentración del producto en los amplificadores finales, por lo que se determinó que la cantidad adecuada para esta técnica molecular debería de ser de 500ng de ADN total, de tal manera que si esto se toma en cuenta para futuras investigaciones se puede conseguir un mejor rendimiento en las muestras de ADN.

Otra diferencia encontrada en la detección de ADN proviral entre el presente estudio y otros trabajos realizados en diferentes países pudiera radicar en que en la región geográfica estudiada posee una alta presencia de la infección por el FIV,

dado que la detección del provirus fue más elevada que lo reportado en la mayoría de los países que han estudiado al lentivirus de gato.

Existen diversos factores involucrados en la eficacia de la técnica de PCR como son la especificidad de los iniciadores, la calidad y pureza del ADN, la etapa de la infección en la que se encuentren los animales y además la fuente de ADN proviral. En el presente trabajo, al igual que en otros estudios reportados, se realizó la obtención de ADN total a partir de células mononucleares de sangre periférica debido a que en este grupo celular se puede encontrar una alta cantidad de linfocitos, una de las principales células blanco específicas que infecta el FIV (Weaver *et al.*, 2010). Tal como se ha demostrado en estudios en los que se ha determinado la carga viral de ADN/ARN y se ha encontrado que los linfocitos son infectados predominantemente, no así los monocitos y granulocitos (Spada *et al.*, 2012; Tiao *et al.*, 2012). Las células mononucleares de gatos infectados no siempre se encuentran con una alta carga viral disponible para el diagnóstico, esto depende de la fase patogénica de la enfermedad (Teixeira, 2010).

El grupo de gatos del estudio fue una población totalmente heterogénea, las características del grupo dividieron a los animales respecto a: a) región geográfica b) género c) edad d) acceso al exterior f) cohabitación con otros gatos. Todas estas variables han sido evaluadas en otros estudios similares (Ammersbach y Bienzle D, 2011; Weaver *et al.*, 2010; Tiao *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2010) en los cuales determinan que son factores de riesgo para la infección por el FIV. Considerando la región geográfica, se encontró que el número de gatos infectados en el Estado de México (60%) fue mayor que en el Distrito Federal (40%), esta diferencia puede radicar en el número de animales muestreados procedentes de ambas regiones 54% y 46% respectivamente, por otro lado, el tipo de vivienda y el estilo de vida de la población felina del Distrito Federal puede ser determinante en la densidad de población de gatos, sin embargo no es posible corroborar esta información dado que no existen censos disponibles de la población de gatos en ambas entidades.

El análisis estadístico generado a partir del registro de datos de la población felina de estudio y su correlación con los factores de riesgo muestra que los machos (27% infectados) tienen un mayor porcentaje de infección con el FIV respecto a las

hembras (13%), lo cual concuerda con otros estudios similares (Teixeira, 2010; Stickney *et al.*, 2013). En el análisis estadístico realizado por intervalo etario no se encontró una diferencia significativa, aunque fue evidente que la población con una mayor cantidad de animales infectados se ubicó en gatos mayores a 3 años, posiblemente esto radique en la convivencia entre animales de esta edad, además de que estos resultados provienen de animales que comúnmente tienen acceso a la calle. La transmisión de la enfermedad es facilitada por la convivencia con otros gatos, el acicalamiento mutuo, las peleas territoriales y la promiscuidad característica de la especie (Nakamura *et al.*, 2003; Keawcharoen *et al.*, 2006).

El análisis hecho respecto al número de gatos que conviven entre sí en grupos sociales definidos demostró que la infección por el FIV fue mayor en gatos que conviven en grupos que involucran a más de cinco individuos, demostrando significancia estadística; este factor no se encontró en otros ensayos hechos en Iberoamérica (Teixeira, 2010). Respecto a la detección de provirus del FIV, fue relevante que en la población de estudio, tanto en las hembras como en los machos con una mayor frecuencia de acceso al exterior por semana, se incrementó la frecuencia de detección de individuos infectados con el FIV. Además del acceso al exterior y la convivencia entre poblaciones de gatos, es importante también considerar la densidad de población y el hacinamiento, lo cual resulta en estrés, mala higiene y un mayor contacto directo entre los gatos (Hosie *et al.*, 2009).

El presente estudio pretende mostrar que una evaluación inicial con la técnica de PCR como método de diagnóstico para detectar la infección por el FIV en México es adecuada, ya que por ahora el único método de diagnóstico utilizado en el ejercicio clínico es la inmunocromatografía en sus presentaciones comerciales, lo que implica la dependencia hacia estas pruebas de origen extranjero; por otro lado la interpretación de los resultados de estos kits debe ser cuidadosamente analizada. Cuando se encuentra un resultado positivo en un animal con bajo riesgo de infección, por ejemplo, un gato sin acceso a la calle, el resultado debe ser confirmado con otras pruebas, como el Western blot. El resultado positivo en un gato perteneciente a un grupo de alto riesgo (gato macho, adulto, con acceso a la calle) tiene un alto valor predictivo positivo. Los resultados falsos negativos pueden

ser encontrados en la fase terminal de la enfermedad en animales con títulos bajos de anticuerpos, esto como consecuencia de la inmunodeficiencia o en casos de infecciones recientes, donde no haya ocurrido la seroconversión. Muchas veces existe un lapso de tiempo de varios meses después de la infección para poder obtener un resultado positivo en las pruebas serológicas.

A partir de los resultados del presente estudio, se demuestra que la prevalencia del FIV es elevada entre los gatos del Estado de México y está influenciada significativamente por factores de riesgo relacionados con la demografía, el estado de salud del gato, edad, el género, el comportamiento y tipo de hogar, los cuales son elementos importantes para determinar la condición de salud de los felinos. La presencia del FIV en México sugiere la necesidad de un mayor uso de medidas de control específicas, tales como la detección temprana de la infección y cuando ésta sea positiva, implementar medidas de protección para el gato infectado como para otros gatos. Como la mayoría de los factores de riesgo identificados en el presente estudio son similares a los descritos en otras partes del mundo (Crawford y Levy, 2007; Hosie, 2009; Teixeira, 2010), es posible entonces adoptar e implementar las actuales prácticas recomendadas por otros investigadores, para mejorar las estrategias de control y prevención en los gatos domésticos del país.

La identificación del subtipo del virus predominante en la región y el conocimiento de la diversidad genética de las cepas o variantes circulantes, son fundamentales para la producción y validación de pruebas diagnósticas, principalmente aquellas que se basan en la detección de material genético; es por ello que la tendencia actual en el diagnóstico molecular de los retrovirus tiende a estar relacionada con la diversidad genética de los mismos, por lo que al momento de diseñar y estandarizar una prueba se debe tener en cuenta esta variación, por ejemplo con la utilización de oligonucleótidos que, además de ser ubicados en regiones conservadas, contengan bases degeneradas, esto con la finalidad de ampliar el espectro de detección al momento de la hibridación. La ligera desventaja de utilizar iniciadores con bases degeneradas es el requerimiento de personal con conocimiento de manejo de software especializado en la manipulación de secuencias y análisis *in silico*.

A pesar de que los gatos en la población de estudio fueron aparentemente sanos al momento del muestreo, una cuarta parte de la población resultó estar infectada, si bien esto podría resultar contrastante respecto al hecho de que no mostraban signos clínicos, estos hallazgos fueron también descritos por Teixeira en São Paulo, en 2010.

Es necesario un estudio que involucre la secuenciación de los productos amplificados y la comparación de las secuencias resultantes con las reportadas en el GenBank con el fin de corroborar la infección por el FIV, así mismo esto permitiría realizar un análisis filogenético que otorgaría información sobre los tipos genéticos presentes en gatos del centro de México.

Con la determinación de los subtipos presentes, sería posible evaluar la probable correlación de algunos de estos con presentaciones clínicas o con factores relacionados a la patogenia como se ha realizado con otras enfermedades lentivirales (Stickney, 2013).

De igual manera, es conveniente evaluar los resultados del presente trabajo con resultados obtenidos en estudios serológicos de los mismos animales, con el fin de evaluar especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR, como se ha realizado con otras enfermedades retrovirales de felinos (Autran, 2014).



## VIII Conclusiones

Se detectó el provirus del FIV en células mononucleares de sangre periférica de gatos utilizando la técnica de PCR punto final gracias al diseño de una pareja de iniciadores que hibridan la región de cápside del gen *gag*.

La prevalencia de la infección por el FIV en el área metropolitana de la Ciudad de México fue de 24%

Destacan como potenciales factores de riesgo para la infección por el FIV el género masculino, la cohabitación intraespecífica y el acceso al exterior del domicilio.

Este es el primer estudio orientado a la detección directa del FIV en México.

## **IX Perspectivas**

Basado en los hallazgos de este trabajo es necesario profundizar en la secuenciación nucleotídica de los productos amplificados para determinar los genotipos virales prevalentes en el país.

Diseñar PCRs en base a otras regiones genéticas del virus.

Realizar un estudio epidemiológico más amplio para identificar la prevalencia real de la infección por el FIV en las principales regiones del país.

## X Referencias

1. Ackley CD, Yamamoto JK, Levy N, Pedersen NC y Cooper MD. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1990;64:5652–5655.
2. Addie DD, Dennis JM, Toth S, Callanan JJ. Log-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. *Vet Record* 2000; 146: 419-424.
3. Ammersbach M, Little S, Bienzle D. Preliminary evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *J Fel Med Surg* 2013; 0: 1-5.
4. Ammersbach M y Bienzle D. Method for assessing feline immunodeficiency virus infection, infectivity and purification. *Vet Immunol and immunopathol* 2011; 143: 202-214.
5. Arjona A, Escolar E, Soto I, Barquero N, Martin D, Gomez-Lucia E. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *J Clin Microbiol* 2000;38:3448-3449.
6. Armitage AE, Deforche K, Chang CH, Wee E, Kramer B, Welch JJ, Gerstoff J, Fugger L, Mcmichael A, Rambaut A y Iversen AKN. APOBEC3G-induced hypermutation of human immunodeficiency virus type-1 is typically a discrete 'all or nothing' phenomenon. *Plos Genetics* 2012; 8: 250.
7. Autran Martínez M. Uso de la técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de leucemia viral felina y el análisis filogenético de sus productos amplificados. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
8. Bachmann MH, Mathiason-Dubard C, Learn GH, Rodrigo AG, Sodora DL, Mazzetti P, Hoover EA y Mullins JI. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus, dual infection, recombination, and distinct

- evolutionary rates among envelope sequence clades. *J of Virol* 1997; 71: 4241-4253.
9. Bandecchi P, Dell'Omodarme M, Magi M, Palamidessi A, Prati MC. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. *Vet Rec* 2006; 158: 555-557.
  10. Barr MC. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Seminars in Vet Med Sur* 1996; 11: 144-153.
  11. Barlough JE, Ackley CD, George JW, Cooper MD, Pedersen NC. Acquired immunedysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. *J Acquired Imm Def Syndromes* 1991; 4: 219-227.
  12. Bendinelli M, Pistello M, Lombardi S, Poli A, Tozzini F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 87-112.
  13. Borst A, Box AT, Fluit AC. False positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 2004; 23: 289-299.
  14. Bastien P, Chabbert E, Lachaud L. Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference? *J of Clin Microbiol* 2003; 41: 2272.
  15. Brown EW, Yuhki N, Packer C, O'Brien SJ. A lion lentivirus related to feline immunodeficiency virus: epidemiologic and phylogenetic aspects. *J Virol* 1994; 68: 5953-5968.
  16. Callanan JJ, Jones BA, Irvine J, Willett BJ, McCandlish IA, Jarret O. Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. *Vet Pathol* 1996; 33: 264-272.
  17. Chang-Fung-Martel J, Gummow B, Burgess G, Fenton E y Squires R. A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb. *J Feline Med Surg* 2013; 15:1070-1078.

18. Coats KS. The Feline Immunodeficiency Virus-Infected Cat: A Model for Lentivirus-induced Placental Immunopathology and Reproductive Failure. *Am J Repro Imm* 2005; 54: 169-185.
19. Crawford PC y Levy JK. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Vet Clinics North Am: Small Animal Practice* 2007; 37: 335-350.
20. De Mari K, Maynard L, Sanquer A, Lebreux B, Eun HM. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 477-482.
21. Del Fierro GM, Meers J, Thomas J, Chadwick B, Parks HS, Robinson WF. Quantification of lymphadenopathy in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in domestic cats. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46: 3-12.
22. Dorny P, Speybroeck N, Verstraete S. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *Vet Rec* 2002; 151: 626-629.
23. Elder JH y Philips TR. Molecular properties of feline immunodeficiency virus (FIV). *Infectious Agents and Disease* 1993; 2: 361-374
24. Luttge BG y Freed EO. 2009. FIV gag, virus assembly and host-cell interactions. *Vet Imm Immunopathol* 2009; 134: 3-13
25. Elyar JS, Tellier MC, Soos JM, Yamamoto JK. Perspectives on FIV vaccine development. *Vaccine* 1997; 15: 1437-1444.
26. Fevereiro M, Roneker C, Laufs A, Tavares L, De Noronha F. Characterization of two monoclonal antibodies against feline immunodeficiency virus gag gene products and their application in an assay to evaluate neutralizing antibody activity. *J General Virol* 1991; 72: 617-622.
27. Flynn JN, Cannon CA, Lawrence CE, Jarrett O. Polyclonal B-cell activation in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Immunol* 1994; 81: 626-630.
28. Gabor LJ, Love DN, Malik R y Canfield PJ. Feline immunodeficiency virus status in Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 2001 79: 540-545.

29. Gentile G, Ayala I, Pietra M. Infección por el virus de la inmunodeficiencia felina: estudio seroepidemiológico y clínico en Bologna (Italia). Arch Med Vet 1996; 28: 153-156.
30. Gorodezky, C. Manual de Técnicas XIII. Curso teórico-práctico de genética molecular. Departamento de Inmunogenética del INDRE, Sector Salud. Agosto, 2009, México.
31. Greene WK, Meers K, Chadwick B, Carnegie PR y Robinson WF. Nucleotide sequences of Australian isolates of the feline immunodeficiency virus, comparison with other feline lentiviruses. Archives of Virology 1993; 132: 369-379.
32. Harrus S, Klement E, Aroch I, et al. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. Vet Rec 2002; 151: 82-87.
33. Hayward JJ y Rodrigo AGF. Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. Virol Jour 2008; 5: 76.
34. Hayward JJ, Rodrigo AG. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). Vet Immunol Immunopathol 2010; 134:68–74.
35. Hein A, Martin JP, Koehren F, Bingen A, Dorries R. In vivo infection of ramified microglia from adult cat central nervous system by feline immunodeficiency virus. Virol 2000; 268: 420-429.
36. Hosie MJ, Dunsford T, Klein D, Willett BJ, Cannon C. Vaccination with inactivated virus but not viral DNA reduces virus load following challenge with a heterologous and virulent isolate of feline immunodeficiency virus. J Virol 2000; 74: 9403–9411.
37. Hosie MJ y Beatty JA. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus. Australian Vet J 2007; 85: 302-303.
38. Hosie MJ, Addie D, Belak S, Egberink H y Frymus T. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Sur 2009; 7: 575-584.
39. Hughes MD, Ball NW, Love DN, Canfield PJ. Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a FIV- positive cat. J Fel Med Surg 1999; 1: 23-29.

40. Inoshima Y, Ikeda Y, Kohmoto. Persistence of high virus neutralizing antibody titers in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 925-927.
41. Joshi A, Garg H, Tompkins MB, Tompkins WA. Preferential feline immunodeficiency virus (FIV) infection of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-regulatory cells correlates both with Surface expression of CXCR4 and activation of FIV long terminal repeat binding cellular transcriptional factors. *J Virol* 2005; 79: 4965-4976.
42. Kann R, Seddon J, Kyaw-Tanner M y Meers J. Co-infection with different subtypes of feline immunodeficiency virus can complicate subtype assignment by phylogenetic analysis. *Archives of Virology* 2007; 152: 1187-1193.
43. Kashiwase H, Katsube T, Kimura T, Nishigaki T, Yamashita M. 8-Difluoromethoxy-4-quinolone derivatives as anti-feline immunodeficiency virus (FIV) agents: important structural features for inhibitory activity of FIV replication. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 499–504.
44. Keawchareoen J, Wattanodorin S, Pusoonthronthum R y Oraveerakul K. Phylogenetic analysis of a feline immunodeficiency virus isolated from a Thai cat. *Proceedings of the Annual Conference of the Faculty of Veterinary Science; Bangkok, Thailand: Chulalongkorn University, 2006: 28-77.*
45. Kenyon JC y Lever AML. The molecular biology of the feline immunodeficiency virus (FIV). *Viruses* 2011; 3: 2192-2213.
46. Kuritzkes DR. HIV resistance: frequency, testing, mechanisms. *Topics in HIV Med* 2007; 15: 150-154.
47. Lara VM, Taniwakii SA, Araujo JR. Phylogenetic characterization of feline immunodeficiency virus (FIV) isolates from the state of Sao Paulo. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 2007; 11: 467-470.
48. Levy JK, Crawford PC, Slater MR. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *J Am Vet Med Association* 2003; 225: 1558-1561.

49. Lin JA, Cheng MC, Inoshima Y, et al. Seroepidemiological survey of feline retrovirus infections in cats in Taiwan in 1993 and 1994. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 161-163.
50. Malik R, Kendall K, Cridland J, et al. Prevalences of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in cats in Sydney. *Aust Vet J* 1997; 75:323-327.
51. Marín HJ, McKeeW, Montes de Oca A, Nuñez OL. Determinación de la seroprevalencia de la Leucemia Viral Felina y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido Felino en gatos de la República Mexicana. *Memorias WSAVA – FIAVAC – AMMVEPE. Congreso 2005. Ciudad de México, México.*
52. Martins AN, Medeiros SO, Simonetti JP, Schatzmayr HG, Tanuri A, Brindeiro RM. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. *J Virol* 2008; 82: 7863-7874.
53. Materazzi, JS. Detección del virus de inmunodeficiencia felina en gatos domésticos de la ciudad de Formosa. Tesis de grado. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. 2006.
54. Matsumoto H, Takemura N, Sako T, Koyama H, Motoyoshi S, Inada Y. Serum concentration of circulating immune complexes in cats infected with feline immunodeficiency virus detected by immune adherence hemagglutination method. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 395-396.
55. Matteucci D, Baldinotti F, Mazzetti P, Pistello M, Bandecchi P; Ghilarducci R, Poli A, Tozzini F, Bendinelli M. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 494-501.
56. McMichael AJ. HIV Vaccines. *Annual Rev Immunol* 2006; 24: 227-255.
57. Mergia A, Blackwell J, Chari S. Inhibition of FIV replication by a ribozyme that targets the Rev response element. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13: 1333–1339.



58. Miyazawa T, Tomonaga K, Kawaguchi Y y Mikami T. The genome of feline immunodeficiency virus. *Archives of Virology* 1994; 134: 221-234.
59. Morales Ramírez G. Diagnóstico del Virus de la Leucemia Felina (FeLV) y del Virus de la Inmunodeficiencia Felina (FIV) a través de la prueba de ELISA y su correlación con la Biometría Hemática y posibles hallazgos a la necropsia en gatos enfermos en la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura 1993; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México.
60. Nakamura K, Miyazawa T, Ikeda Y, et al. Contrastive prevalence of feline retrovirus infections between northern and southern Vietnam. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 921-923.
61. Nakamura K y Suzuki Y. Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus, genetic diversity of subtype C. *Archiv of Virol* 2003; 148: 783-791.
62. O'Neil LL, Burkhard MJ, Diehl LJ, Hoover EA. Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1995; 11: 171-182.
63. Olmsted RA, Langley R, Roelke ME, Goeken RM, Adger-Johnson D. Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. *J Virol* 1992; 66: 6008–6018.
64. Pancino G, Fossati I, Chappey C, Castelot S, Hurrstel B, Moraillon A, Klitzmann D y Sonigo P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 1993; 192: 659-662.
65. Pecoraro MR, Tomonaga K, Miyazawa T, Kawaguchi Y, Sugita S, Tohya Y, Kai C, Etcheverrigaray ME y Mikami T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1996; 77: 2031-2035.
66. Pedersen NC, Ho EW, Brown ML y Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 1987; 235: 790-793.
67. Pedersen NC, Yamamoto JK e Ishida T. Feline immunodeficiency virus infection, *Vet. Immunopathol* 1999; 21:111-129.

68. Phillips K, Arai M, Tanabe T, Raskin R, Volz M. Neurologic dysfunctions caused by a molecular clone of feline immunodeficiency virus, FIV-PPR. *J Neurovirol* 1996; 2: 388-396.
69. Prospero-Garcia O; Herold N, Phillips TR, Elder JH, Bloom FE; Henriksen SJ. Sleep patterns are disturbed in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, December 1994. Estados Unidos de América.
70. Reggeti F, Bienzle D. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. *J Gen Virol*. 2004; 85: 1843-1852.
71. Rimmelzwaan GF, Siebelink KH, Broos H, Drost GA, Weijer K, Van Herwijnen R, Osterhaus AD. Gag- y env- specific serum antibodies in cats after natural and experimental infection with feline immunodeficiency virus. *Vet Microbiol* 1994; 39: 153-165.
72. Rypula K, Bierowiec K, Kumala A y Sapikowsky G. Prevalence of viral infections in cats in southwestern Poland in the years 2006 to 2010. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2014; 127: 3-4.
73. Pancino G, Fossati I, Chappey C, Castelot S, Hurrstel B, Moraillon A, Klatzmann D y Sonigo P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 1993; 192:659-662.
74. Shimojima M, Miyazawa T, Ikeda Y y Willet BJ. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 2004; 303: 1192-1195.
75. Spada E, Proverbio D, Perego R. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data. *J Feline Med and Surg* 2012; 14: 369.
76. Stickney A, Cave NJ, Dunowska M y Pernthaner A. The use of an apoptosis assay to predict differences in pathogenicity between isolates of feline immunodeficiency virus. *Proceedings of the 11th International Feline Retrovirus Research Symposium*; 2012 August 26 to 29; Leipzig, Germany.

77. Stickney AL, Dunowska M y Cave NJ. Sequence variation of the feline immunodeficiency virus genome and its clinical relevance. *Veterinary record* 2013; 172: 607-614.
78. Sukura A, Salminen T y Lindberg LA. A survey of FIV antibodies and FeLV antigens in free-roaming cats in the capital area of Finland. *Acta Vet Scand* 1992; 33: 9–14.
79. Teixeira BM. Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na cidade de São Paulo. Tesis doctoral. Universidad de São Paulo, 2010.
80. Teixeira BM, Logan N, Cruz JCM, Brandao PE y Willet BJ. CD134 and its interaction with Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. *Encuentro Nacional de Virología*; 2009; Brasilia, Brasil.
81. Tiao N, Darrigton C, Molla B, Saville J, Thilahun G y Kwok OC. An investigation into the seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Bartonella spp.*, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukaemia virus (FeLV) in cats in Addis Ababa, Ethiopia. *Epidemiol Infect* 2012; 141: 1029-1033.
82. Tilton GK, O'Connor TP, Seymour CL, Lawrence KL, Cohen ND, Andersen PR y Tonelli QJ. Immunoassay for detection of feline immunodeficiency virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1990; 5: 898-904.
83. Tompkins WA. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. *J Interferon & Cytokine Research* 1999; 19: 817-828.
84. Tsai WP, Conley SR, Kung HF, Garrity RR y Nara PL. Preliminary *in vitro* growth cycle and transmission studies of HIV-1 in an autologous primary cell assay of blood-derived macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 1996; 2: 205-216.
85. Uhl EW, Heaton-Jones TG, Pu R, Yamamoto JK. FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review FIV vaccine 2002 update and review. *Vet Imm Immunopathol* 2002; 90: 113-132.
86. Weaver EA. A detailed phylogenetic analysis of FIV in the United States. *PLoS One* 2010; 5(8).

87. Winkler IG, Lochelt M, Flower RL. Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats: a seroepidemiological study. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2848-2851.
88. Willet BJ y Hosie MJ. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123: 611-618.
89. Yamamoto JK, Pu R, Sato E y Hohdatsu T. Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine. *AIDS* 2007; 21: 547-563.
90. Yilmaz H, Ilgaz A, Harbour DA. Prevalence of FIV and FeLV infections in cats in Istanbul. *J Feline Med Surg* 2000; 2: 69-70.
91. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang CM, Arunachalam SC y Gao L. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 2003; 424: 94-98.

## APÉNDICE

### Ejemplo del documento que se utilizó para la recaudación de datos demográficos.

#### HISTORIA CLÍNICA

NOMBRE \_\_\_\_\_ RAZA: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_

SEXO: \_\_\_\_\_ PESO: \_\_\_\_\_ COLOR: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL PROPIETARIO:

\_\_\_\_\_

DIRECCIÓN:

\_\_\_\_\_

TELÉFONO: \_\_\_\_\_ CORREO ELECTRÓNICO: \_\_\_\_\_

FAVOR DE DESCRIBIR EL NUMERO DE GATOS EN LA VIVIENDA Y EN CONVIVENCIA, SI SALE POR LAS NOCHES FUERA DE CASA, ESPECIFIQUE

ALOJAMIENTO: (# GATOS QUE VIVEN JUNTOS) (#GATOS EN CONVIVENCIA) \_\_\_\_\_

SALE AL EXTERIOR DE SU VIVIENDA \_\_\_\_\_ CUÁNTAS VECES POR SEMANA \_\_\_\_\_

ALIMENTACIÓN: \_\_\_\_\_

VACUNACIÓN (CONTRA QUÉ), FECHA APROXIMADA: \_\_\_\_\_

DESPARASITACIÓN: \_\_\_\_\_ ESTERILIZADO Y/O CASTRADO: \_\_\_\_\_

SIGNOLOGÍA:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

TRATAMIENTOS:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dx PRESUNTIVO:

\_\_\_\_\_

DxLABORATORIO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

SUERO	PLASMA	PMN	SALIVA	L.VAGINAL	L.PREPUCIO

## Protocolo de extracción de células mononucleares (Lisis y obtención de núcleos)

---

Método de Gorodezky *et al*, 2009.

1. Centrifugar el tubo con anticoagulante a 3000rpm durante 15 minutos para la separación de plasma.
2. Transferir con una pipeta el plasma y la capa blanca transferirla cuidadosamente con una pipeta *Pasteur* a un tubo *Falcon* de 14ml.
3. Agregar solución de lisis hasta llenar el tubo, agitar con el *Vórtex* suavemente por un minuto.
4. Centrifugar a 3000rpm durante quince minutos, desechar cuidadosamente el sobrenadante mediante decantación.
5. Repetir los pasos 3 y 4 hasta que queden las células blancas o libres de eritrocitos; generalmente con dos repeticiones es suficiente.
6. Si es necesario al paquete de células blancas se le puede agregar agua bidestilada para lisar los glóbulos rojos restantes..
7. Se homogeniza y centrifuga a 3000rpm durante quince minutos.
8. Se decanta y se agrega la mitad de PBS, se vuelve a homogenizar y se centrifuga por 15 minutos.
9. Se decanta y se recupera entre 200 y 300  $\mu$ l de la pastilla del fondo y se coloca en un tubo *Eppendorf* estéril a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se etiqueta y se almacena hasta su uso.

## **Protocolo de extracción de ADN genómico**

---

### Minikit para extracción de ADN genómico en tejidos

#### Introducción

Es un kit comercial que ofrece un método rápido y económico para purificar ADN total de muchos tipos de tejido animal. Algunos protocolos especialmente modificados son desarrollados para otras muestras como bacterias, tejidos fijados y levaduras. Esta tecnología primero lisa las células y degrada la proteína usando sales caotrópicas y proteinasa K, luego se captura el ADN mediante membranas basadas en sílice, se lava con buffer de lavado que contiene etanol y después se eluye con una solución baja en sales o agua bidestilada.

Comparado con otros procedimientos más complejos y que requieren mayor tiempo para realizarlos, dicho kit acorta el tiempo del procedimiento en menos de una hora (el tiempo de lisis varía dependiendo del tipo de tejido procesado). El tamaño del ADN purificado es por arriba de 50KB. La mayor longitud del ADN mejora la eficiencia durante la reacción de PCR.

#### Protocolo general

##### PASO 1

Para células en crecimiento o en suspensión: se transfiere un tubo completo con células a un tubo *Eppendorf* y se centrifuga a 4000rpm por 15 minutos.

Se remueve cuidadosamente el sobrenadante.

1. Se agregan 200µl de buffer FATG1, se homogeniza la muestra de tejido y se procesa con el micropestillo.

## PASO 2: LISIS

2. Se agregan 20µl de Proteinasa K (10mg/ml) a la muestra obtenida. Se mezcla generosamente por agitación.
3. Se incuba a 60°C por quince minutos con la finalidad de que el tejido se lise completamente.
4. Se centrifuga brevemente (*spin*) el tubo para remover los residuos de la tapa.
5. Se agrega 200µl de buffer FATG2 a la muestra y se mezcla a fondo por homogenización e incubar a 70°C por 10 minutos.
6. Se centrifuga brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa; si existe material insoluble presente se centrifuga a máxima velocidad y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo.

## PASO 3: UNIÓN AL ADN

7. Se agrega 200µl de etanol grado biología molecular a la muestra y se homogeniza la mezcla.
8. Se centrifuga brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa.
9. Se coloca una minicolumna de FATG en un tubo colector, se transfiere la mezcla de la muestra (incluyendo cualquier precipitado) cuidadosamente a la columna.
10. Se centrifuga por un minuto y se desecha el fluido que paso a través de ella, después se coloca la columna FATG en un tubo nuevo.

## PASO 4. LAVADO

11. Se lava la columna FATG con 500µl de buffer W1, se centrifuga por un minuto y se desecha el líquido restante. Es importante asegurar que el etanol fue añadido por primera vez al buffer W1.



12. Se lava la columna FATG con 750µl de buffer de lavado y se centrifuga por un minuto; se desecha el restante y se centrifuga la columna adicionalmente por tres minutos para secar la misma.

#### PASO IMPORTANTE.

Este paso evita el líquido residual que inhibe las reacciones enzimáticas subsecuentes.

#### PASO 5. ELUCIÓN DEL ADN (HOMOGENIZACIÓN)

13. Se coloca la columna FATG en un tubo de elución y se añade 25µl de buffer de elución o agua desionizada (pH 7.5-8.5) al centro de la membrana de la columna, se deja reposar por tres minutos.
14. Se centrifuga por dos minutos para eluir el ADN total en un volumen final de 25µl. Para una elución efectiva, asegúrese que la solución de elución sea colocada en el centro de la membrana y se absorba por completo. Si la muestra tiene baja cantidad de células, reduzca el volumen de elución para incrementar la concentración de ADN.

Repetir el paso 14 por tres ocasiones.

15. Se puede conservar el ADN total a 4°C o -20°C.

## Protocolo de la técnica de PCR para detectar una fracción de la región de cápside del gen *gag* del virus de inmunodeficiencia felina.

---

Concentraciones requeridas para la reacción.

Reactivo	Concentración
Buffer*	1x
MgCl <sub>2</sub> *	1.5mM
Iniciador ( <i>Forward</i> )**	600nM
Iniciador ( <i>Reverse</i> )**	600nM
Deoxinucleótidos trifosfato***	225µM
Taq ADN polimerasa*	0.08 U/µl

**Volumen final de reacción: 30µl**  
**ADN molde: 500ng**

\*Laboratorio Kapa Biosystems®  
\*\* Los iniciadores fueron sintetizados en el laboratorio Eurofins®  
\*\*\*Laboratorio MP®

Protocolo establecido por González Fernández, 2015

**Condiciones requeridas para la PCR para detectar una fracción de la región de cápside del gen *gag* del virus de inmunodeficiencia felina**

<b>Desnaturalización inicial</b>	
5 minutos - 94°C	
<b>45 Ciclos</b>	
Desnaturalización	94°C – 50s
Hibridación	50°C – 30s
Extensión	72°C – 40s
<b>Extensión final</b>	
72°C – 7min	

Protocolo establecido por González Fernández, 2015

*Fear leads to anger*

*Anger leads to hate*

*Hate leads to suffering*

Antiguo Proverbio Jedi