



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE
INMUNODEFICIENCIA FELINA (FIV) EN
GATOS DOMÉSTICOS, MEDIANTE EL USO
DE UNA ELISA INDIRECTA BASADA EN
PÉPTIDOS SINTÉTICOS**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

MELISA ALEJANDRA ESCALANTE AVIÑA

ASESOR:

Dr. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

COASESOR:

Dr. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2016.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA (FIV) EN GATOS DOMÉSTICOS, MEDIANTE EL USO DE UNA ELISA INDIRECTA BASADA EN PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Que presenta la pasante: **MELISA ALEJANDRA ESCALANTE AVIÑA**
Con número de cuenta: **30653365-5** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de abril de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Gerardo Garza Malacara	
1er SUPLENTE	M.V.Z. Melitón Lara Rocha	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemí Montes de Oca Chávez	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

DEDICATORIA

A mis gatitos, primero a Retacito (Pachona) quien me acompañó desde antes de mi examen de selección a la licenciatura y me acompañó desvelándose mientras hacía tareas y estudiaba.

Ajonjolí, mi gatita Carey con la que también aprendí mucho y el gato Ryan que llegó poco antes de terminar la carrera.

A todos los gatos del mundo, en especial a aquellos que están infectados de Leucemia Viral Felina y sobre todo por el Virus de Inmunodeficiencia Felina, gracias por los datos que puedan aportar declaro mi dedicación a lograr hacerles la vida más llevadera.

A Sombra mi primer gato, quien sembró en mi corazón un pelito que germinó resultando en lo que soy ahora.



AGRADECIMIENTOS

A todos en el laboratorio de virología, genética y biología molecular:

Dr. Hugo Ramírez Álvarez, Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez, M. en C. María Martha García Flores, M. en C. Marcela Autrán Martínez, MVZ. Víctor David González Fernández, MVZ. EPOC. Yesica Virginia Torres Duran, M en C. EPOC. Carmen Águilar Tapia, eMVZ. Carlos Morales González, MVZ. Rodolfo Córdova Ponce, MVZ. Alma Noemí Montes de Oca Chávez, MVZ. María de Lourdes Jara Ramírez.

M. en C. María de la Luz Streber Jiménez, por las muestras que nos proporcionó. Un placer conocerla en Yucatán.

MVZ. Esp. Tamara Libertad Iturbe Cossío que nos proporcionó muestras de suero de gato muy valiosas.

MVZ. María de la Luz Ochoa Tovar de la Clínica Cihuacoatl y MVZ. Dafne Hernández de la Clínica Bastet, por lo datos sobre diagnóstico en las clínicas privadas que aportaron.

A mi amigo, pareja durante 6 años y ahora mi prometido por todo su apoyo durante la carrera y en todo mi proceso de titulación eMVZ. Angel Eduardo Cabrera Serrano, me ha apoyado siempre en todos los aspectos y porque gracias a él tenemos un negocio que nos permite salir adelante.

A mi amigo de facultad pMVZ. Aldo Pineda Machuca.

A mi madre Verence Avíña Estrada y mi hermana plng. Ruth Angelica Escalante Avíña.

A mis perritas Condesa Shortshot y Hyun Na Min, las extrañare siempre que no las tenga cerca, desafortunadamente no sé si nos volveremos a ver o que tan seguido. A mis gatitos Ajonjolí y Ryan, los que viven conmigo Loki, Anita y en especial mi gathija favorita Lady Pachona (Retacito) que siempre estuvo a mi lado.

ÍNDICE

Abreviaturas	* * * * *	1
Resumen	* * * * *	4
Abstract	* * * * *	5
1. INTRODUCCIÓN	* * * * *	6
1.2 Agente etiológico	* * * * *	6
1.3 Epidemiología	* * * * *	7
1.4 Patogenia	* * * * *	10
1.5 Presentaciones clínicas	* * * * *	11
1.5.1 Fase aguda (de viremia)	* * * * *	11
1.5.2 Fase asintomática	* * * * *	12
1.5.3 Fase de latencia	* * * * *	13
1.5.4 Fase terminal (inmunodeficiencia)	* * * * *	13
1.6 Signos y hallazgos clínicos	* * * * *	14
1.6.1 Glomerulonefritis inmunomediada	* * * * *	15
1.6.2 Infecciones secundarias	* * * * *	15
1.6.3 Podo dermatitis plasmocitarias	* * * * *	16
1.6.4 Semiología neurológica central o periférica	* * * * *	16
1.6.5 Enteritis crónica y adelgazamiento progresivo	* * * * *	17
1.6.6 Neoplasias	* * * * *	17
1.6.7 Alteraciones oftalmológicas	* * * * *	17
1.6.8 Alteraciones bioquímicas	* * * * *	18

1.7 Respuesta inmune a FIV	19
1.8 Técnicas de diagnóstico	25
1.9 Diagnóstico por métodos directos	25
1.9.1.1 Cultivo y aislamiento viral	25
1.9.1.2 PCR	26
1.9.2 Diagnóstico por métodos indirectos	27
1.9.3.1 Pruebas comerciales	29
1.9.3.2 WITNESS® FIV de Zoetis™	29
1.9.3.3 SNAP® Combo Plus de IDEXX	30
1.9.2.4 Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit	30
1.9.4 ELISA	31
1.9.5 ELISA indirecta	31
1.10 Péptidos sintéticos	32
1.11 Unión de los péptidos	36
1.12 Prevención y control	37
1.12.1 Pruebas de salud frecuentes	37
1.12.2 Precauciones perioperatorias	38
1.12.3 Vacunación	38
2. OBJETIVOS	41
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. HIPÓTESIS	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1 Muestras	44

5.2 Diseño del péptido	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	44
5.3 Selección del péptido	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	45
5.4 Técnica de ELISAI	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	47
5.5 Diagnóstico con estuches comerciales basados en inmunocromatografía	✻	48
6. RESULTADOS	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	49
6.2 ELISAI con péptido 140M1	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	49
6.3 Determinación del valor de corte de la prueba ELISAI con péptido 140M1	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	50
6.4 Gráficas de los resultados ELISAI	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	52
6.5 Resultados de la prueba rápida de inmunocromatografía	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	54
7. DISCUSIÓN	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	56
8. CONCLUSIONES	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	65
9 Recomendaciones	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	66
10 APÉNDICES	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	67
10.1 Solución 0.05M de buffer carbonatos-bicarbonatos a pH. 9.6	✻ ✻ ✻	67
10.2 Stock de los péptidos FIV y 140M1 4 µg/µl (250µl)	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	67
10.3 Solución de lavado PBS 0.05% Tritón X100	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	67
10.4 Solución de bloqueo (Caseína 2.5%)	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	67
10.5 Solución para diluir anticuerpos 1° y 2°	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	68
10.6 Solución de trabajo 6µg/µl del péptido 140M1	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	68
10.7 Solución de trabajo de la proteína anti IgG de gato hecha en cabra	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	69
11. BIBLIOGRAFÍA	✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻ ✻	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un retrovirus	6
Figura 2. Estructura del retrovirus y posición de los nucleótidos	7
Figura 3. Muestra de sangre completa de gato :	44
Figura 4. Péptido 140 M1 sintetizado	47
Figura 5. Placa de ELISA :	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Citocinas en la infección del FIV :	23
Cuadro 2. Citocinas en felinos domésticos	24
Cuadro 3. Mapeo de epítomos	34
Cuadro 4. Selección del péptido	45
Cuadro 5. Resultado de placa en lector de ELISA	50
Cuadro 6. Tabla de resultados prueba comercial para FIV/FELV y ELISAI	70
Cuadro 7. Resultados de PCR y ELISA para FIV :	71

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curso de la enfermedad del FIV	13
Gráfica 2. Curso de la respuesta inmune del FIV	21
Gráfica 3. Respuesta de anticuerpos a diferentes antígenos del virus de FIV	28
Gráfica 4. Porcentaje del total de gatos seropositivos y seronegativos al virus de inmunodeficiencia felina evaluados con un ELISAI basado en el uso del péptido 140 M1	52

Gráfica 5. Individuos seronegativos y seropositivos al virus de inmunodeficiencia felina por sexo. ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 52

Gráfica 6. Animales seropositivos al virus por sexo: ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 52

Gráfica 7. Rango etario de la población de gatos seropositiva al virus de inmunodeficiencia felina❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 53

Gráfica 8. Procedencia geográfica de los gatos seropositivos al virus de inmunodeficiencia felina ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 53

Gráfica 9. Estado reproductivo de los individuos seropositivos al virus de inmunodeficiencia felina ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 53

Gráfica 10. Número de veces que los individuos seropositivos tienen acceso al exterior en una semana ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 54

Gráfica 11. Número de gatos con los que convive cada individuo seropositivo al virus de inmunodeficiencia felina❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 54

Gráfica 12. Gatos seropositivos y seronegativos al virus de inmunodeficiencia felina en la prueba rápida❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ 55



No interesting reaction!
But what does it mean?
Jack Skellington

18-12-2015.

T

Mad:

ABREVIATURAS

°C • Grados Celsius.

µl • Microlitros.

Ab • Anticuerpo.

ABTS • 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico).

Ag • Antígeno.

BioEdit • Programa bioinformático para edición de secuencias.

CA • Proteína de cápside del virus.

CDMX • Ciudad de México

cDNA • Ácido Desoxirribonucleico complementario.

CrFK • Células Crandell de riñón de gato.

DNA • Ácido Desoxirribonucleico.

dNTP's • Los cuatro desoxirribonucleotidos trifosfato en presentación comercial.

Edo. Méx. • Estado de México

ELISA • Ensayo de inmuno absorbancia ligada a enzimas.

ELISAI • Técnica indirecta, Ensayo de inmuno absorbancia ligada a enzimas.

Env • Proteína de la envoltura del virus.

FeLV • Leucemia Viral Felina.

FIV • Virus de inmunodeficiencia felina.

Fmoc • Fluorenil-metiloxycarbonil.

Gp • Glicoproteína.

IFN- γ • Interferón gamma.

IgG • Inmunoglobulina G

IL-10 • Interleucina 10.

IL-12 • Interleucina 12.

IL-2 • Interleucina 2.

IL-2 • Interleucina 2.

L Th1 • Linfocito relacionado con inmunidad celular.

L Th2 • Linfocito relacionado con inmunidad humoral.

LT CD4+ • Linfocito T CD4+.

LT CD8+ • Linfocito T CD8+.

LTR's • Repeticiones terminales largas.

MBM • Línea celular de linfocitos T de gato.

ng • Nanogramos.

NK • Células naturales asesinas.

nm • Nanómetros.

p27 • Proteína 27 del FIV.

PCR • Reacción en cadena de la polimerasa.

PCRq • Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

pH • Potencial de hidrógeno.

RIMTM • Inmunomigración rápida.

RNA • Ácido Ribonucleico.

RT • Transcriptasa reversa.

RT-PCR • Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción.

SIDA • Síndrome de inmunodeficiencia humana.

SPF • Animales libres de patógenos específicos

SU • Proteína de superficie del virus.

Taq • Enzima (polimerasa) termoestable de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.

TFN α • Factor de necrosis tumoral alfa.

TM • Proteína de transmembrana del virus.

VIH • Virus de inmunodeficiencia humana.

WB • Western blot.

RESUMEN

El virus de inmunodeficiencia felina (FIV) es un retrovirus del género *Lentivirus*, ocasiona un síndrome de inmunodeficiencia similar al del HIV, afecta a felinos domésticos y silvestres, con distribución mundial y prevalencia variable. En México no hay estudios que determinen la eficacia de pruebas diagnósticas para el FIV, lo que hace necesario generar información y alternativas locales que puedan ser más adecuadas para el diagnóstico de la población felina del país.

El ELISAI es una técnica de amplio uso para la identificación de enfermedades, con alto valor de confianza. El objetivo del presente estudio fue estandarizar y evaluar una prueba de ELISAI basada en péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos generados por la infección del FIV. Mediante el uso de softwares especializados, se realizaron análisis *in silico* para el diseño de dos péptidos sintéticos de 21 aminoácidos péptido 1 (FIV) ubicado en la proteína de superficie y el péptido 2 (140M1) ubicado en la proteína de transmembrana del virus. A partir de una población heterogénea de gatos provenientes del área metropolitana del valle de México, se conformó un grupo de 205 muestras de plasma.

Se estandarizó el ELISAI con los péptidos sintéticos. El péptido 1 no fue reactivo, mientras que con el péptido 2 fue posible realizar la detección de anticuerpos identificando un 10.24% de gatos seropositivos a el FIV y 89.76% de seronegativos. En un grupo de 70 muestras, 10 muestras fueron positivas a ELISAI, 8 también lo fueron a PCR y 0 positivas con prueba comercial.

ABSTRACT

The feline immunodeficiency virus (FIV) it's a retrovirus from the *Lentivirus* genus, which causes an immunodeficiency syndrome like HIV, It affects domestic and wild cats, with global distribution with variable prevalence. In México there are no studies focused to determine the efficiency of the diagnostic tests for the FIV, which makes necessary generate information and local options that may be more adequate for the diagnosis in the country's feline population.

ELISAI it's a widely used technique for the identification of maladies, with a high confidence value. The objective of the present study was to standardize and evaluate an ELISAI test based on synthetic peptides for the detection of antibodies produced by the FIV infection. Through the use of specialized software *in silico* analysis where performed to design two synthetic peptides conformed by 21 aminoacids Peptide 1 (FIV) from the surface protein and peptide 2 (140M1) located in the transmembrane protein from the virus. From a heterogenic cat population from the Mexico's valley metropolitan area, a group was established by 205 plasma samples.

The ELISAI was standardized with the synthetic peptides. Peptide 1 presented no reaction, meanwhile with the peptide 2 was possible to detect the antibodies identifying 10.24% of seropositive cats to FIV and 89.76% of seronegative results.

In a group of 70 samples, 10 samples were positives to the ELISAI, 8 were also positive to PCR test and 0 were positive with a commercial test.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

El virus de inmunodeficiencia felina, FIV, es un retrovirus clasificado en el género lentivirus y causa en los gatos un síndrome similar al del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) en humanos (Figura 1). El FIV afecta a los felinos domésticos y silvestres mundialmente. Los análisis de secuencias genómicas de lentivirus aislados de gatos domésticos, pumas y leones han demostrado que son virus dist

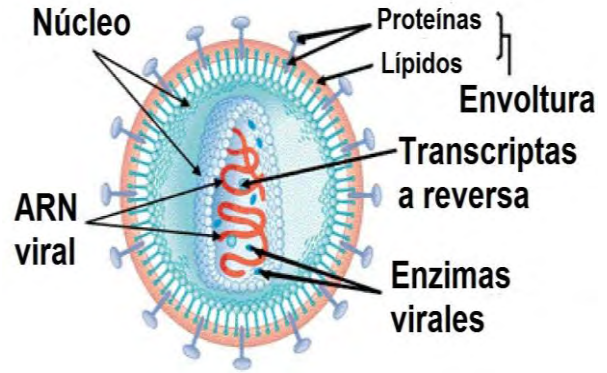


Figura 1. Estructura de un retrovirus ¹

Aproximadamente un 11 % de los gatos del mundo están infectados con el FIV ⁶.

Los lentivirus como el FIV y HIV causan infecciones crónicas de por vida y están asociadas con degeneración progresiva, desordenes inmunes y encefalopatía ⁷.

La infección por el FIV en felinos ocurre mundialmente con prevalencias variables. Además de su importancia como modelo para entender la patogénesis en el caso de SIDA en humanos, el FIV es un patógeno de importancia mayor en los gatos domésticos y en la práctica veterinaria ⁸⁻¹⁰.

Se han realizado diversos estudios relacionados con la seroprevalencia, los cuales demuestran que un mismo gato puede estar infectado con diferentes subtipos virales, por lo tanto, no existe una protección cruzada entre ellos y puede ocurrir un intercambio de segmentos genéticos que expresen la proteína Env de

diferentes subtipos en un mismo gato¹¹ (Figura 2).

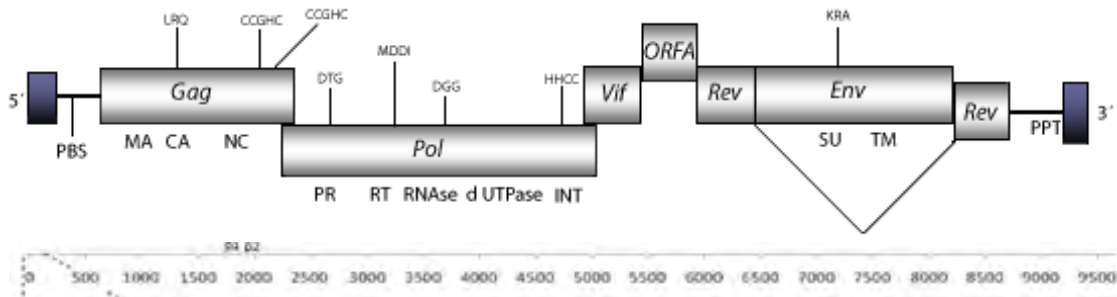


Figura 2. Estructura genética del virus de inmunodeficiencia felina y productos generados por cada región²

Los LTR's se presentan en color azul.

- | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| MA =Matriz | PR =Proteasa | DU o DUT =dUTPasa | TM =Transmembrana |
| CA =Cápside | RT =Transcriptasa reversa | INT =Integrasa | |
| NC =Núcleo cápside | RH =RNasaH | SU =Superficie | |
| PPT =Tracto de polipurinas | PBS =Sitio de unión del primer | | |

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia es un parámetro epidemiológico que permite cuantificar la proporción de gatos en una población que tienen una enfermedad en un determinado momento, y ofrece una estimación del riesgo de que un gato de esa población tenga la enfermedad en ese momento.

La prevalencia de la infección por el FIV es muy variable dependiendo de la región geográfica en la que se haya realizado el estudio. Se estima que entre 1 a 4% de los gatos clínicamente sanos y un 44% de los gatos enfermos son positivos al virus^{8,11,12}.

En poblaciones donde existe una alta población de gatos callejeros, como en Italia o Japón, tienen tasas de prevalencia cercanas al 30%^{8,11}.

Los reportes de prevalencia en todos los estudios realizados hasta ahora han

descrito a los gatos machos adultos y enteros mayormente infectados que a las hembras, gatitos y gatos adolescentes, esto se explica debido al comportamiento agresivo territorial en los machos. La edad, el tamaño y el peso corporal influyen en el comportamiento territorial de los gatos callejeros, cuanto mayor tamaño y peso, más alta es la probabilidad de transmitir y/o adquirir enfermedades por peleas³.

La infección por el FIV está estrechamente ligada a la densidad poblacional felina y al modo de vida de los animales. Cuando la convivencia entre los gatos de una población es pacífica, el riesgo de transmisión es muy bajo. El comportamiento reproductivo participa de forma interesante en la transmisión del FIV, ya que en el transcurso de la monta el macho puede infectar a la hembra por mordeduras en la región dorsal del cuello, a parte del riesgo por transmisión venérea. Además, en poblaciones abiertas de gatos vagabundos, el territorio de los machos enteros es siempre superior al de las hembras, que suelen vivir en zonas más restringidas. Esto supone la producción de múltiples camadas infectadas procedentes de un mismo macho^{8,10}.

La capacidad del FIV para contaminar el ambiente es baja, ya que el virus sobrevive sólo durante unos minutos fuera del hospedador, es altamente sensible a la luz ultravioleta, al calor, y es susceptible a todos los desinfectantes, incluyendo el jabón común. Por lo tanto, es necesario un contacto muy estrecho entre los gatos para que se produzca la transmisión. El virus se transmite principalmente mediante la inoculación parenteral del virus presente en la saliva o la sangre a través de mordeduras o heridas producidas en peleas^{8,10-12}.

En infecciones experimentales se ha confirmado la transmisión del FIV de madres infectadas, tanto de forma aguda como crónica a sus fetos y neonatos en más de un 50%, a través del útero y mediante la leche. También es posible que en una misma camada algunas crías adquieran la infección en el útero y otras no. Cuando se produce la transmisión de la madre a las crías, solo una parte de la camada se infectará de forma persistente. La proporción de gatitos infectados dependerá de la carga viral de la madre durante la gestación y el parto. Si la madre está infectada en forma aguda, hasta un 70% de los gatitos estarán infectados, pero si la madre es asintomática y está infectada de forma crónica, es poco probable que algún gatito de la camada se infecte¹².

Resulta difícil establecer el grado de importancia de la transmisión congénita en condiciones naturales, ya que los gatitos nacidos de hembras infectadas con el FIV pueden tener provirus detectables en los tejidos, pero no necesariamente en la sangre, por ejemplo, el virus puede estar presente en forma de provirus en células de la médula ósea cuando el paciente no se encuentra en fase de viremia¹³.

Las vías de transmisión oronasal y la venérea son fuentes importantes de infección, ya que se ha demostrado experimentalmente que los gatos pueden infectarse por la nariz, boca, vagina y recto. El periodo de incubación del FIV tiene una duración de entre 2 y 4 semanas^{8,14}.

1.3 PATOGENIA

La glicoproteína (gp120) de la envoltura del virus se une al receptor CD134

ubicado en la superficie celular, lo cual genera un cambio en la conformación de la gp120 que permite una segunda interacción con el correceptor CXCR4. Tras ello, se fusiona la envoltura del virus con la membrana celular y se produce la entrada del virus a la célula^{8,11,12}.

No está claro si es que todos los tipos celulares son susceptibles a la infección por el FIV dada la expresión del receptor o si es posible que el establecimiento de la infección productiva requiera de otras moléculas receptoras o formas de entrada a la célula¹¹.

Tras el ingreso del virus a la célula, el ARN vírico mediante la transcriptasa inversa (RT) se transcribe al principio en una cadena de ADN, formándose un híbrido de ARN y ADN. Una región de la RT (RNAsa H) está relacionada con la degradación de la molécula de ARN casi simultáneamente a la formación de ADN. Posteriormente, se polimeriza otra hebra de ADN utilizando como molde la que se había formado previamente, originando una cadena doble de ADN.

En esta fase se añaden las repeticiones terminales largas (LTR's), que van a flanquear el genoma, muy importantes en el resto del ciclo de replicación, ya que poseen sitios de unión a factores de transcripción. La cadena doble de ADN es transportada al núcleo de manera que se incorpora al genoma celular por acción de una integrasa, formando el provirus. La enzima RT al carecer de una función correctora, permite al FIV mutar rápidamente y producir múltiples subtipos. Siendo la diversidad genética una de las causas de la dificultad que tiene el sistema

inmune del hospedador para la inactivación viral^{8,10,12}.

El FIV posee tropismo mayoritariamente hacia células de defensa, replicándose en linfocitos T CD4+ y T CD8+, linfocitos B, monocitos, macrófagos, y adicionalmente en astrocitos y células de la microglía⁸.

La patogenicidad del FIV reside en el hecho de que es un lentivirus muy citopático, que causa la muerte por apoptosis de sus principales células diana, los linfocitos CD4+, disminuyen la población por la infección del timo y médula, además de la destrucción de las células por la infección^{8,10,11}.

1.4 PRESENTACIONES CLÍNICAS

1.4.1 FASE AGUDA (Viremia)

Posterior a la inoculación del virus este se replica en los linfocitos T y B, en los macrófagos de los linfonodos regionales y otros órganos linfoides (timo y bazo). Más adelante, causa una viremia aguda que llega a su nivel máximo a las 8-12 semanas postinfección. Esta viremia se acompaña de signos clínicos inespecíficos, como anorexia, letargia, linfadenopatía y leucopenia transitoria¹⁰.

A causa de la viremia, el virus se disemina por el resto del organismo infectando linfocitos, monocitos, macrófagos de la médula ósea, tracto intestinal, pulmón, riñón y cerebro (células endoteliales de la microglía, astrocitos y neuronas).

Esta viremia decrece después de varias semanas, lo que coincide con la disminución de la inmunidad de tipo celular y humoral, y no es capaz de eliminarse la infección^{8,11}.

1.4.2 FASE ASINTOMÁTICA

Cuando disminuye la carga viral en el plasma, indica el inicio de la fase asintomática que puede durar meses, años o incluso toda la vida. En esta fase, los animales pueden estar aparentemente sanos se produce un debilitamiento paulatino del sistema inmune por una disminución progresiva de la proporción de linfocitos T CD4+/CD8+, debida a la disminución de linfocitos T CD4+ cooperadores, fundamentales en la inmunidad¹².

No sólo hay un marcado declive de los linfocitos T CD4+, además, su funcionalidad se encuentra alterada, en especial con respecto a su capacidad de reaccionar frente a los antígenos (Ag) y en la síntesis de Interleucina 2 (IL-2)¹².

En la infección por el FIV no existe un periodo de latencia real, tal y como sucede en la infección por el FeLV, puesto que la infección viral progresa y el gato se muestra asintomático^{10,12}.

1.4.3 FASE DE LATENCIA

Una de las principales características de las infecciones por retrovirus es que una vez que estas se establecen son persistentes a lo largo de toda la vida del animal.

La persistencia es producto del fenómeno de latencia, que corresponde a la integración del provirus en el genoma de las células del hospedador, allí permanece sin expresarse, oculto del sistema inmune durante largos periodos. Sin embargo, esta fase de latencia se puede revertir, generalmente en una inmunosupresión debida a la administración de fármacos como corticosteroides, lo que da paso a la expresión vírica y así a la progresión de la infección hasta acabar con la muerte del animal. En el caso del FIV los gatos infectados con el virus no

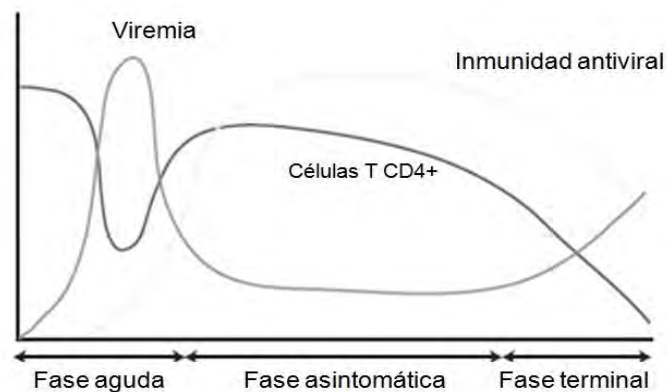
presentan signos clínicos comúnmente, sin embargo, el ARN o las proteínas virales pueden detectarse en los fluidos como el suero, plasma (especialmente en los linfocitos sanguíneos), líquido cefalorraquídeo, tejidos linfoides y semen, puesto que existe una continua replicación vírica pero a niveles muy bajos¹⁰.

1.4.4 FASE TERMINAL (Inmunodeficiencia)

La muerte de los linfocitos T CD4+ es la causa de la fase de inmunodeficiencia, provocando la disminución de la proporción de LT CD4+/ CD8+.

En esta fase de SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) se presentan frecuentemente las infecciones oportunistas, al ser incapaz el gato de desarrollar una respuesta inmune adecuada. Finalmente, los gatos suelen morir por un síndrome crónico presentando pérdida de peso, deterioro físico, enfermedad neurológica, neoplasias o infecciones oportunistas sistémicas^{8,11,12}. En la siguiente gráfica (Gráfica 1). Se muestra el comportamiento de diferentes factores de la inmunidad del gato en el curso de la infección

Gráfica 1. Curso de la infección del FIV.



Modificado de Levy, 2008.¹⁵

1.5 SIGNOS Y HALLAZGOS CLÍNICOS

El FIV tiene la capacidad de producir signos clínicos transitorios, cuya duración puede ser de semanas a meses tras la infección. Normalmente tras esta fase ocurre la presentación de un periodo asintomático, de una duración de meses o años en la mayoría de los casos, hasta llegar a la fase de SIDA, que generalmente se presenta hacia los 4 o 6 años de edad e incluso más tarde. Algunos gatos nunca desarrollan signos clínicos relacionados con la inmunodeficiencia. En la fase de SIDA, el propio virus, la inmunosupresión, así como las infecciones secundarias acabarán produciendo la muerte del animal¹⁰.

Los signos y hallazgos clínicos que pueden desarrollarse progresivamente son los siguientes: fiebre, apatía, anorexia, linfadenopatía, cambios de comportamiento, trastornos neurológicos, tumores, glomerulonefritis. Infecciones secundarias oportunistas, gingivoestomatitis, conjuntivitis, rinitis, otitis, diarrea, abscesos cutáneos, leucopenia, neutropenia y anemias inmunomediadas, ectoparasitosis, micosis y artritis. La gingivoestomatitis crónica generalmente es uno de los signos clínicos más evidentes para el propietario, ya que puede llegar a producir tal dolor que el gato presente completa anorexia, la inflamación puede afectar la mucosa gingival, tejido periodontal, carrillos, fauces y la lengua. Esta inflamación puede ser purulenta necrotizante o proliferativa con infiltrado linfoplasmocítico. Pueden también presentarse coinfecciones con otros microorganismos, con mayor frecuencia asociadas con el calicivirus, lo que agrava el cuadro de gingivoestomatitis⁹⁻¹².

1.5.1 GLOMERULONEFRITIS INMUNOMEDIADA

Al activarse los linfocitos B policlonales provoca hiperglobulinemia y aumento del nivel de complejos inmunes circulantes, generando lesiones glomerulares (glomeruloesclerosis, glomerulonefritis y depósito de sustancia amiloide a nivel glomerular) y tubulointersticiales, que provocan insuficiencia renal con severa proteinuria y disminución de la tasa de filtración glomerular¹⁶.

1.5.2 INFECCIONES SECUNDARIAS

En esta etapa pueden participar bacterias, virus, hongos o parásitos. Las infecciones secundarias más frecuentes están asociadas a los virus respiratorios (herpesvirus y calicivirus), que provocan cuadros respiratorios más graves y persistentes que en gatos no infectados con el FIV. Hasta en un 25% de los gatos infectados presentan enfermedades respiratorias crónicas: conjuntivitis, rinitis, bronquitis, neumonía y pulmonía¹⁶.

Las coinfecciones con *Demodex gatoi* provocan cuadros generalizados asociados con inmunosupresión. Los cuadros de sarna notoédrica (*Notoedres cati*) también se asocian a la infección viral. Las infecciones bacterianas pueden producir neumonía, gingivoestomatitis, infecciones digestivas, cistitis crónica, pioderma generalizada, otitis purulenta y abscesos. Hasta un 15% de los gatos infectados sufren otitis y piodermas¹⁷.

1.5.3 PODODERMATITIS PLASMOCITARIAS

La etiología de estos padecimientos no se conoce con exactitud, pero se considera que tienen un origen inmunomediado. Su frecuencia de presentación es baja y en un 50% de los casos han sido asociados a una infección por el FIV¹⁰. Suele iniciar con un fuerte dolor en una o varias almohadillas metacarpianas o metatarsianas. Las almohadillas se inflaman y presentan una zona central reblandecida muy dolorosa, que es la responsable de la claudicación. Progresivamente aparece una tumefacción ulcerada que sangra con mucha facilidad. Estas lesiones pueden ir acompañadas por hiperemia, apatía, anorexia, anemia, gingivostomatitis linfoplasmocitaria, adenopatías periféricas, amiloidosis renal y glomerulonefritis inmunomediada.

En el análisis histopatológico se encuentra una infiltración de células plasmáticas con cuerpos de Russel. Estas infiltraciones plasmocitarias se consideran una forma crónica reactiva frente a diversos antígenos, como bacterias y virus¹⁷.

1.5.4 SEMIOLOGÍA NEUROLÓGICA CENTRAL O PERIFÉRICA

Estudios recientes han correlacionado la carga viral, la inflamación y la pérdida de neuronas con el deterioro de las habilidades motoras y neurocognitivas de los gatos infectados por el FIV. Las alteraciones neurológicas centrales o periféricas ocasionadas por el FIV ocurren en un 5% de los gatos infectados. Se presentan cambios de comportamiento, demencia, crispación facial, nistagmo, marcha compulsiva, deterioro del aprendizaje, alteraciones del sueño, convulsiones, temblores, paresia y ataxia. Estos signos neurológicos pueden observarse también

en casos de coinfección con *Toxoplasma gondii* o *Criptococcus sp.* Sin embargo, algunos gatos nunca desarrollan cuadros neurológicos a pesar de que en la histopatología se encuentren lesiones en el sistema nervioso central¹⁸.

1.5.5 ENTERITIS CRÓNICA Y ADELGAZAMIENTO PROGRESIVO

Puede manifestarse de forma primaria (10%) o asociada a otros signos. El cuadro puede agravarse si se produce una vasculitis intestinal¹⁸.

1.5.6 NEOPLASIAS

Los gatos infectados por el FIV tienen una mayor predisposición a desarrollar neoplasias, en estos casos el riesgo de sufrir linfoma aumenta 6 veces, aumenta 60 veces si el gato está infectado con el FeLV y aumenta 80 veces el riesgo de linfoma si está infectado por ambos virus. Las neoplasias asociadas más frecuentemente al virus son: carcinomas mamarios, carcinomas de células escamosas, epitelomas espinocelulares *in situ* multicéntricos (Enfermedad de Bowen), mastocitomas, fibrosarcomas, linfoma de linfocitos B y leucemia¹⁰.

1.5.7 ALTERACIONES OFTALMOLÓGICAS

Uveítis, glaucoma, coriorretinitis, degeneración retiniana focal, hemorragias retinianas y *pars planitis* (infiltración de leucocitos en el humor vítreo)¹⁶.

1.5.8 HEMATOLOGÍA

El FIV no causa alteraciones patognomónicas, pero si se han observado alteraciones similares a las observadas con el VIH. Estas se producen debido a la

replicación del FIV en células mononucleares, y por lo tanto, son consecuencia directa del virus. Algunas de estas alteraciones son: anemia (no tan frecuente como con el FeLV) generalmente no regenerativa, linfopenia, linfocitosis por estimulación antigénica crónica, neutropenia, trombocitopenia y eosinopenia¹⁹.

En la fase inicial de la infección suele observarse leucopenia debida principalmente a una neutropenia absoluta, que puede tener una presentación intermitente⁴.

La neutropenia puede estar producida por una destrucción inmunomediada de neutrófilos en la médula ósea, una menor producción, secuestro extramedular o una movilización aumentada^{9,19}.

En los cuadros inmunomediados suele observarse linfocitosis debida a un estímulo antigénico crónico. En estudios recientes se ha observado que la infección por el virus del FIV de la médula ósea puede provocar citopenia y mielodisplasia incluso en gatos asintomáticos²⁰.

1.5.9 ALTERACIONES BIOQUÍMICAS

En general, las alteraciones bioquímicas observadas son muy inespecíficas, en gatos infectados experimentalmente se han observado niveles elevados de urea, creatinina y fósforo debido a una disminución en la tasa de filtración glomerular.

También se puede observar un aumento en el nivel de sodio y triglicéridos, y niveles reducidos de colesterol. Estas alteraciones se han atribuido a cambios en el metabolismo energético, además también se ha observado una hipercortisolemia subclínica, como reflejo de un estado hipermetabólico y la

liberación de citoquinas en los gatos infectados¹⁶.

Frecuentemente se observa una marcada o moderada hiperproteinemia. Este hallazgo se explica fácilmente por los altos niveles de gammaglobulinas que se observan al realizar un proteinograma. Se trata de una hipergammaglobulinemia policlonal debida a la naturaleza sistémica de la enfermedad⁴.

Las hipergammaglobulinemias policlonales se asocian a estados de fuerte estimulación antigénica debido a procesos inflamatorios, neoplásicos o trastornos inmunomediados⁵.

El coeficiente albúmina/globulinas se considera un dato clínico relevante en el diagnóstico del FIV, ya que está considerablemente disminuido en los animales infectados. Un gato puede transmitir la enfermedad desde que inicia la viremia en todas las fases de la enfermedad, incluida la fase de latencia clínica, ya que son capaces de eliminar virus aún que en dosis reducidas^{9,10,19}.

1.6 RESPUESTA INMUNE A FIV

En relación con la respuesta humoral el virus provoca que los anticuerpos aparezcan entre las 2 y las 4 semanas postinfección, justo después del pico de viremia inicial, aunque si la carga viral inicial del FIV es muy baja, no aparecerán hasta meses o incluso años después de la entrada del virus. Desde esta perspectiva, los anticuerpos más importantes que participan en la respuesta inmunológica son aquellos dirigidos a las glicoproteínas de la envoltura, ya que son neutralizantes, por lo que son capaces de bloquear la entrada del virus a las células, impidiendo la unión de cada glicoproteína vírica a su receptor celular.

Estos anticuerpos son transmitidos de forma pasiva mediante el calostro, lo que permite la protección de los gatitos de la infección por un período de 1-2 meses¹⁰.

En la infecciones por el FIV los anticuerpos se mantienen relativamente constantes durante largos periodos de tiempo, incluso años. Cuando estos aumentan se presentan cambios cuantitativos en los linfocitos, como es la reducción crónica de linfocitos T CD4+ y la disminución marcada del coeficiente CD4+/ CD8+, a la par ocurre un nuevo incremento de la viremia sanguínea y la aparición del síndrome de inmunodeficiencia^{8,11,21}.

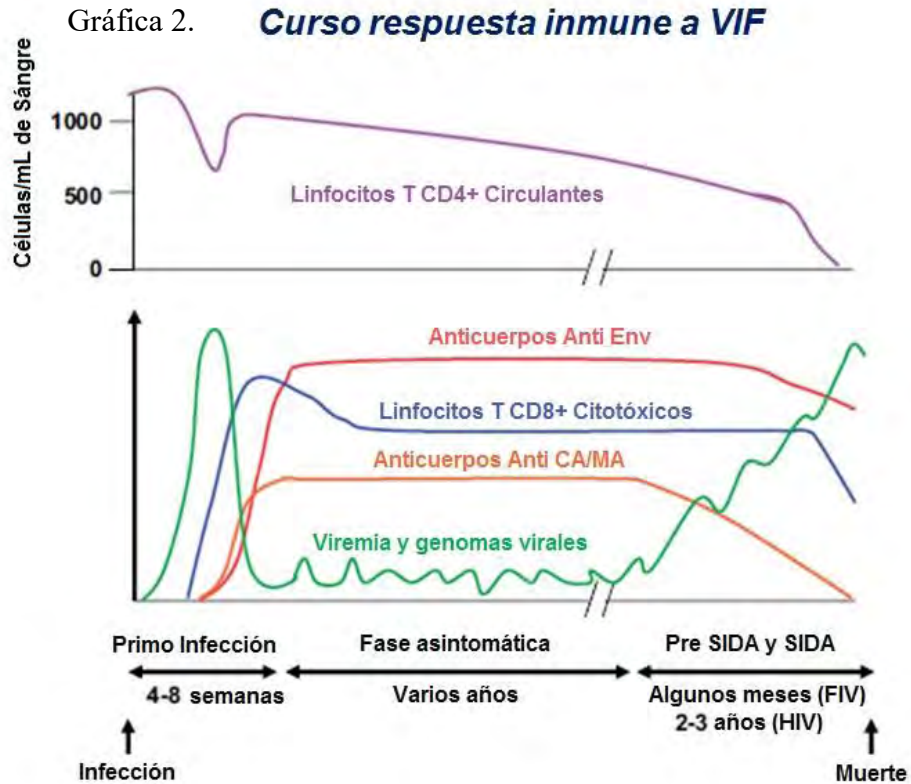
El FIV tiene la capacidad de reinvertir los coeficientes de LT CD4+ y CD8+²²⁻²⁷.

Al igual que en el VIH la infección subsecuente de los gatos con el FIV, causa que se presente mecanismos inmunes que pueden o no ser citolíticos, los cuales se sugiere que pudieran participar en una forma de control de la replicación del virus *in vivo*^{24,28-34}.

El virus estimula una marcada hipergammaglobulinemia, principalmente por el aumento de inmunoglobulinas G (IgG). Esto se debe a una estimulación policlonal de IgG inespecíficas. También se han detectado inmunocomplejos circulantes en los gatos infectados por el FIV que podrán contribuir a las lesiones y signos que se observan en las enfermedades inmunomediadas asociadas a esta infección^{8,11}.

En el organismo la respuesta celular es esencial para eliminar las infecciones víricas y también para regular las respuestas humorales. La respuesta celular de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (implicada en la eliminación de células infectadas) se produce 1 o 2 semanas después de la infección por el FIV y previo a la aparición de anticuerpos neutralizantes. Esta respuesta celular persiste durante

todo el periodo asintomático de la enfermedad, no es capaz de eliminar la infección y los gatos se mantienen infectados de por vida²² (Gráfica 2).



Curso de las enfermedades causadas por los FIV y HIV. Las infecciones por los FIV y HIV están caracterizadas por un detrimento progresivo de las células T CD4+ causado por fuertes respuestas inmunes humoral y celular que pueden contener la replicación viral y viremia durante la fase asintomática pero se van agotando en fases posteriores de la infección (Modificado de Lecollinet, 2008)⁴.

La infección por el FIV de los linfocitos T CD4+ causa una modificación en la producción de citoquinas (mediadores esenciales en la homeostasis del sistema inmune) lo que puede predisponer a los gatos infectados a otras infecciones secundarias al prevalecer una respuesta inmune de tipo humoral (Th2) en lugar de la celular (Th1). Además, se piensa que también podría estar alterada la expresión de citoquinas por parte de macrófagos y linfocitos T CD8+, contribuyendo así al profundo desequilibrio de la red de citoquinas²².

Por lo general, en gatos infectados en las fases iniciales o asintomáticas se han

detectado niveles elevados de interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TFN α) e interleucina 10 (IL-10) de los linfocitos T del timo y linfonodos. Sin embargo, según avanza la infección disminuyen los niveles de interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e IFN- γ , incrementándose marcadamente la IL-10. Los altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12 podrían tener un papel central en la patogenia del FIV, ya que son responsables de que se dé el cambio de la respuesta de tipo celular al tipo humoral (Cuadro 1).

Cuadro 1. Alteración de algunas CITOCINAS EN LA INFECCIÓN DEL FIV

CITOCINAS	ESTATUS	EFEECTO
IL-2	DISMINUIDO	Activación, crecimiento de linfocitos: T, B, K, Macrófagos
IL-12	DISMINUIDO	Diferenciación de linfocitos TH1 Activación de linfocitos NK y Tc
IL-10	AUMENTADO	Inhibición de Macrófagos y citocina Inhibición de citocinas por linfocito T Activación y diferenciación de Linfocito. B

Modificado de Martínez, 2015³⁵.

Además, este incremento del coeficiente IL-10/IL-12 parece ser responsable de la menor respuesta celular frente a patógenos secundarios como *Toxoplasma gondii* en gatos infectados por el FIV¹⁰ (Cuadro 2).

Cuadro 2. CITOCINAS IDENTIFICADAS EN FELINOS DOMÉSTICOS

Producto del gen	No. de acceso	Longitud (pb)	Última actualización	Referencia
IL-1 β	M92060	804	9/93	Daniel <i>et al.</i> (unpublished data)
IL-2	L25408	462 (parcial)	11/94	
	L19402	779	10/93	Cozzi <i>et al.</i> (1993)
IL-4	U39634	561	2/97	Lerner and Elder (unpublished data)
	U82193	284 (parcial)	1/97	
	X87408	521	10/95	Schijns <i>et al.</i> (1995a)
IL-6	D 13227			Ohashi <i>et al.</i> (1989)
	L16914	724	3/94	Bradley <i>et al.</i> (1993)
IL-10	U39569	737	11/95	Scott and O'Reilly (unpublished data)
IL-12 (p35)	U83184		12/96	Fehr <i>et al.</i> (1997)
	Y07761			Schijns <i>et al.</i> (1997)
IL-12 (p40)	U83185		12/96	Fehr <i>et al.</i> (1997)
	Y07762			Schijns <i>et al.</i> (1997)
IL-16	AF003701	390		Leutenegger <i>et al.</i> (1998)
IFN- β	U81267	561	2/97	Lyons <i>et al.</i> (1997)
IFN- γ	X86972	543	3/96	Schijns <i>et al.</i> (1995b)
	D30619	567	6/96	Argyle <i>et al.</i> (1995)
TNF- α	M92061	705	9/93	Daniel <i>et al.</i> (1993)
	U82193	284 (parcial)	1/97	Lyons <i>et al.</i> (1997)
	X5400	1722	3/93	McGraw <i>et al.</i> (1990)
TNF-R (p80)	U51429	247 (parcial)	6/96	Duthie <i>et al.</i> (1996)
TNF-R (p60)	U72344	542 (parcial)	10/96	Duthie <i>et al.</i> (1996)
SCF (factor de células troncales)	D50833	953	2/97	Dunham and Onions (1996b)
MGF (factor de crecimiento de mastocitos)	U82188	430	1/97	Lyons <i>et al.</i> (1997)
NGF- β (factor de crecimiento nervioso β)	U82190	136	1/97	Lyons <i>et al.</i> (1997)

*En amarillo se marcan las citocinas involucradas en la inmunidad innata.
Modificado de Sprague, 2015³.

Esta inmunosupresión se produce por la destrucción de linfocitos T CD4+, la activación de cierta población de linfocitos T CD8+ citotóxicos (la inversión del coeficiente CD4+/CD8 que provoca linfopenia) y alteraciones en la funcionalidad de monocitos, macrófagos, neutrófilos, células naturales asesinas (NK) y linfocitos CD4+ y CD8+²².

En los gatos las infecciones por el FIV también desencadenan alteraciones funcionales como son: disminución de la respuesta proliferativa de los linfocitos B

y T, así como la disminución de la producción de IL-2, contrario a la hipergammaglobulinemia²¹.

La presencia de neoplasias en algunos casos se considera que son el resultado de una menor vigilancia de la repuesta celular citotóxica o por la hiperplasia crónica de linfocitos B. Sin embargo, no se ha descartado totalmente un posible papel directo del virus en la oncogénesis⁸.

Durante la fase de viremia, frecuentemente los virus consiguen atravesar la barrera hematoencefálica, infectando células endoteliales, células de la microglía, astrocitos y neuronas, dando lugar a alteraciones neurológicas y del comportamiento¹¹.

El FIV puede infectar las células de la microglía de forma muy rápida tras la fase de viremia a pesar de la respuesta inflamatoria que se produce. Posteriormente, el virus ya no podrá ser eliminado de las células y por lo tanto, el cerebro quedará como un reservorio del virus, pudiendo reactivarse la replicación vírica en cualquier momento⁸.

En la patogenia nerviosa de los retrovirus felinos podrían estar implicadas las nuevas variantes víricas neurotrópicas que se producen cada vez más adaptadas al cerebro. La proteína de envoltura viral gp120 posee importantes cualidades neurotóxicas, al aumentar las concentraciones de calcio intracelular en las neuronas que han sido infectadas, de la misma forma que ocurre con el VIH. En un estudio se observó que la gp120 del virus purificada provocó anomalías neurológicas cuando fue inoculada en ratas. Además de la capacidad de provocar la liberación de neurotóxicas por los macrófagos (óxido nítrico) que destruyen las

células nerviosas, también la inmunidad desarrollada en los animales infectados podría estar coadyuvando indirectamente en la patogenia de los retrovirus^{8,11}.

1.7 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del FIV se puede realizar por diferentes métodos: demostrando la presencia del virus en sangre periférica, la presencia de anticuerpos específicos contra el FIV y detectando el genoma viral^{16,36}.

Estos métodos pueden dividirse en dos tipos: directos e indirectos, siendo ejemplo de los primeros el aislamiento viral y la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), y en el caso de los métodos indirectos la identificación de anticuerpos. Los anticuerpos contra el FIV pueden ser detectados por ensayos de inmunofluorescencia utilizando linfocitos infectados, ELISA, Western blot y ensayos de radioinmunoprecipitación³⁷⁻⁴⁰.

1.8 DIAGNÓSTICO DEL FIV POR MÉTODOS DIRECTOS

1.8.1.1 AISLAMIENTO VIRAL

Se ha demostrado la capacidad del FIV de replicarse *in vitro* en diferentes células de origen felino, entre estas, las células mononucleares de sangre periférica que pueden ser preestimuladas con mitógenos para producir células primarias progenitoras, líneas linfoblastoídes de células T, macrófagos y neuronas. Algunos aislamientos se han logrado y propagado en células Crandell de Riñón de Gatos (CrFK)²³.

En la mayoría de los laboratorios los aislamientos de rutina del FIV se realizan utilizando como substrato a las células primarias progenitoras, obtenidas de mononucleares de sangre periférica de gatos SPF (libres de patógenos específicos) con mitógenos policlonales, como la concanavalina A. Este procedimiento es susceptible a tener una cantidad importante de inconvenientes, como el requerir frecuentemente de gatos SPF para la obtención de sangre, posibles variaciones de sensibilidad en las diferentes placas de células primarias. También se ha utilizado de forma experimental una línea de linfocitos T felinos (línea MBM) que posee alta sensibilidad para el FIV y los investigadores que la han desarrollado la emplean como una línea de rutina para el aislamiento y cuantificación de células libres y células asociadas al FIV^{23,40-49}.

1.8.1.2 PCR

Esta técnica tiene como ventaja que posee una elevada sensibilidad para detectar ADN proviral al amplificar en grandes cantidades secuencias de una región del virus a partir de una cantidad muy reducida de moléculas^{50,51}.

La detección permite evidenciar la presencia de genoma viral.

Para poder obtener estas copias se deben diseñar un par de cebadores u oligonucleótidos (primers) complementarios a la región a replicar. Debido a la alta capacidad mutágena de los retrovirus, las secuencias que se van a replicar pueden llegarse a modificar en poco tiempo y causar una falta de hibridación de los cebadores. Por lo que para su diseño es importante identificar regiones muy conservadas del genoma viral. La amplificación ocurre al accionarse la ADN

polimerasa derivada de una bacteria termófila *Thermus acuaticus* (Taq), que tiene la capacidad de resistir las altas temperaturas a las que es sometida para el desdoblamiento de las hebras⁵².

Existen variantes de esta técnica como la PCR anidada, que mejora la sensibilidad de la PCR convencional realizando una segunda PCR utilizando el producto de amplificación de una PCR previa. Otra variante es la RT-PCR que hace uso de la transcriptasa reversa para generar cadenas de ADN (cADN) a partir de moléculas de ARN. Por lo que este se debe de extraer previamente y transcribir, para posteriormente amplificar por la técnica convencional de PCR^{53,54}.

La qPCR es una forma de detectar cuantitativamente el ADN proviral de una muestra, puesto que en cada amplificación se intercala una señal fluorescente que puede detectarse y contabilizarse en un espectrofotómetro especial⁵⁴.

1.8.2 DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS INDIRECTOS

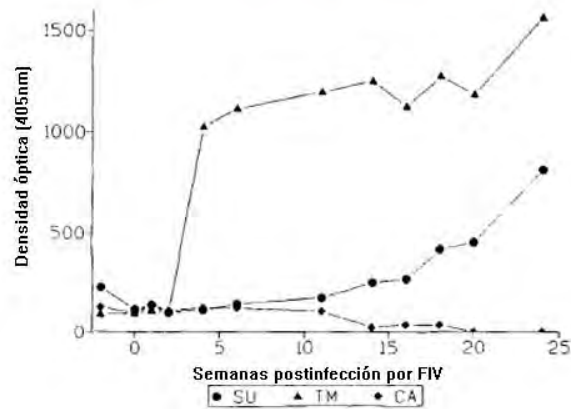
De este tipo de ensayos las pruebas de ELISA son las que han sido más ampliamente utilizadas en este campo, por su facilidad para realizarse. Los ensayos de inmunofluorescencia, Western blot y la radioinmunoprecipitación proveen resultados altamente específicos, sin embargo, usualmente no están disponibles en la práctica veterinaria cotidiana. Mientras que los ELISAs por varias razones tienden a producir resultados falsos positivos, este hecho es de gran importancia en países con bajas prevalencias del FIV como Holanda, Alemania, Austria y Suiza^{38,55}.

El diagnóstico serológico del FIV está basado en la presencia de anticuerpos en

contra de los antígenos de TM, SU y CA principalmente ⁵⁶ (Gráfica 3).

Gráfica 3.

Respuesta de Anticuerpos a diferentes antígenos del Virus de inmunodeficiencia felina



Calzolari et al, 1995.

A pesar de que el ensayo de inmunoblots usa una técnica aceptada y estándar para la detección de anticuerpos reactivos contra el FIV, es costosa y requiere de equipo especial y experiencia. Los inmunoensayos comerciales son fáciles de utilizar, pero independientemente de no estar ampliamente validados, la eficacia de los ensayos se ha vuelto exponencialmente costosa ⁵⁷.

Se han desarrollado alternativas para el diagnóstico del FIV ⁵⁷, se trata de ELISAs que hacen uso de péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína de envoltura de diversas cepas del FIV ^{58,59}.

Algunas de las potenciales ventajas de estas pruebas incluyen un costo menor y capacidad de mantener altos valores de sensibilidad y especificidad. Adicionalmente, el formato de la prueba de ELISA ofrece la oportunidad de

determinar títulos de anticuerpos de isotipos específicos. Se han identificado lentivirus similares al FIV en felinos no domésticos^{5,60-63}.

Los estudios epidemiológicos de lentivirus en felinos domésticos y silvestres con pruebas de Western blot y ensayos comerciales, no son capaces de distinguir anticuerpos (Ab) generados por las diferentes cepas^{5,63}.

1.8.3 PRUEBAS COMERCIALES

Para diagnosticar la infección por el FIV de gatos domésticos, en algunas clínicas de la Ciudad de México se hace uso de kits rápidos, los cuales son en su totalidad productos de importación^{64,65}.

1.8.3.1 WITNESS®FIV de Zoetis™

Es una prueba que detecta Ab anti-gp40 basada en una técnica de inmunomigración rápida (Rapid Immuno Migration, RIM™) la cual utiliza un péptido que reproduce un epítipo de la región transmembranal (gp40) del virus. Se pone en contacto la muestra (sangre total, suero o plasma de no más de 4 horas de obtenida) con el área sensibilizada con partículas de oro coloidal con el péptido. El complejo formado migra por una membrana hasta ser capturado en una zona reactiva, si la muestra presenta Ab anti-gp40 da lugar a una banda de color rosa claramente visible. Una banda de control situada en el extremo de la membrana confirma que el test se ha realizado correctamente⁶⁶.

1.8.3.2 SNAP®Combo Plus de IDEXX Laboratories

Es un inmunoensayo rápido basado en la detección de antígeno de cápside (p27) del FeLV y de Ab contra el FIV, similar al kit de WITNESS®FIV los Ab reactivos son contra la gp40, y adicionalmente contra la p15 y p24. Se utiliza suero, plasma o sangre total fresca o de una semana de almacenamiento como máximo. Una vez temperado el kit durante 30 minutos se colocan 3 gotas de muestra y 4 de conjugado en un tubo de ensayo nuevo, se tapa y se mezcla. Se coloca el dispositivo en una superficie horizontal y se vierte el contenido del tubo, la muestra fluirá por la ventana de resultados en unos 30-60 segundos y posteriormente en un lapso de 10 minutos se puede observar el resultado cromatográfico positivo o negativo⁵⁶.

1.8.3.3 Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit

Es un inmunoensayo cromatográfico que ofrece la detección simultánea y cualitativa del Virus de Inmunodeficiencia Felina mediante anticuerpos contra la gp40 y del Virus de Leucemia Felina detectando el antígeno p27. Para la realización de la prueba se requiere de una muestra de sangre completa (menor a 4 h posteriores a la toma y con un máximo de 24 h en refrigeración), suero o plasma (pueden conservarse en refrigeración y usarse en no más de dos semanas o congelarse y utilizarse posteriormente sin restricción). El kit tiene un tiempo de anaquel de 24 meses, pudiendo almacenarse a temperatura ambiente (de 2 a 30°C).

La sensibilidad calculada de la prueba es de 96% para la detección de Ab contra el

FIV y de 94% para la detección de Ag del FeLV y una especificidad de 98% para el FIV y de 99% para el FeLV, con respecto a la prueba de Western blot y aislamiento viral⁶⁷.

1.8.4 ELISA

El inmunoensayo enzimático utiliza enzimas ligadas a anticuerpos o antígenos, lo cual permite la cuantificación mediante la coloración posterior a la adición de un cromógeno. Los inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA) involucran la adición de agentes reactivos a una sustancia absorbida en una fase sólida. El uso de una enzima reactiva ya caracterizada es utilizada para producir color y poder cuantificar la reacción⁶⁸.

1.8.5 ELISA INDIRECTA

El sistema indirecto y directo son similares en el aspecto de que el antígeno se une directamente a la fase sólida, posteriormente en el sistema indirecto los anticuerpos agregados son detectados por anticuerpos marcados con enzimas, dichos anticuerpos son producidos contra las inmunoglobulinas de diferentes especies, denominados como conjugados antiglobulinas de especie. Lo que permite gran flexibilidad en el uso de conjugados antiespecie, por lo que hay literalmente cientos de conjugados comerciales disponibles⁶⁹.

Estos sistemas han sido utilizados ampliamente en aplicaciones diagnósticas, particularmente cuando se examinan grandes cantidades de muestras. Una desventaja de dichos sistemas es el grado de variabilidad de uniones inespecíficas

en sueros individuales. Esto tiende a ampliar la dispersión (variabilidad) de los resultados del ensayo y por consiguiente aumentan la necesidad de procesar muchos sueros para valorar la confianza⁶⁸.

Las proteínas naturales son probablemente los antígenos ideales, ya que proveen secuencias específicas (epítopes), no obstante, las proteínas naturales difícilmente se encuentran de forma pura, lo que puede favorecer que los anticuerpos se generen para polipéptidos contaminantes⁶⁹.

Las proteínas recombinantes producidas en bacterias son utilizadas exitosamente para la producción de anticuerpos, algunos sugieren que los anticuerpos recombinantes son los que reflejan con mayor fidelidad la proteína, al formar anticuerpos tridimensionales contra los determinantes antigénicos de una secuencia. Estas proteínas se unen a resinas afines que se pueden utilizar para purificar el anticuerpo a partir de suero puro. La desventaja de estas técnicas radica en que estos polipéptidos podrían no haberse plegado correctamente, o bien, podrían haberse unido incorrectamente a los puentes disulfuros. Algunas proteínas como son las de membrana difícilmente se forman en las bacterias o en sistemas de expresión en células eucariotas⁷⁰.

1.9 PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Inicialmente los antígenos empleados en las pruebas diagnósticas se obtenían de sobrenadantes de cultivos celulares infectados por virus. Posteriormente se reemplazaron por péptidos sintéticos obtenidos fundamentalmente por recombinación. Los péptidos sintéticos son compuestos químicamente bien

definidos y, por lo tanto, permiten reducir la variabilidad interensayo e intraensayo. A diferencia de los antígenos que se obtienen por cultivo, los sintéticos permiten realizar estudios con epítopes de difícil acceso o derivados de virus difícilmente cultivables (Cuadro 3). Además, tiene una enorme ventaja ya que permite trabajar con material no infeccioso⁷¹.

Cuadro 3. Mapeo de epítomos⁷²

Evaluación para epítomos				
Aproximación	Lineal ^a	Discontinuo ^b	Disperso ^c	Postraducción ^d
Predicción de una secuencia de aminoácidos ^e	+	±	±	-
Predicción mediante cálculos de estructuras de la proteína	++	+	±	±
Inmunoensayo de fragmentos proteolíticos	+++	+	-	++
Inmunoensayo de clones parciales	+++	+	-	- a ++ ^f
Mapeo por "pepscan" usando péptidos sintéticos	+++	-	-	-
Cristalografía de complejos Ag-Ab	+++	+++	+++	+++

^a Epítomo formado por residuos aminoácidos adyacentes en una cadena peptídica
^b Epítomo formado mediante la localización del plegamiento de una proteína, al que también se refiere como un epítomo conformacional.
^c Epítomo formado de diferentes regiones de una proteína mediante un plegamiento complejo, también conocido como un epítomo conformacional.
^d Epítomo dependiente de modificaciones postraduccionales, tales como la glicosilación o un corte proteolítico.
^e Usualmente disponibles como parte de un software para análisis de proteínas
^f Dependiente del grado de modificación postraduccional en el sistema de expresión utilizado.

Para el diseño de los péptidos el procedimiento generalmente se realiza sometiendo el genoma del virus a un análisis para determinar epítomos mediante una variedad de algoritmos que pueden consultarse con el uso del programa IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/tutorial.jsp>). Para la selección del péptido se realiza un estudio comparativo de los mapas genéticos de distintas variantes del virus a partir de la información de secuencias disponibles en el GenBank, con el uso de herramientas disponibles como el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) con el cual se realizan alineamientos para identificar regiones conservadas del virus y zonas potenciales donde se pueden ubicar epítomos⁷³.

La metodología para la síntesis de péptidos ha mejorado a partir de las décadas de 1980 y 1990, esta tecnología ha logrado ser rápidamente asimilada en estudios dirigidos a la comprensión del plegamiento de los péptidos y proteínas. Es particularmente común la “disección de péptidos” que consiste en un análisis donde a partir de secuencias de péptidos relativamente cortas, reconocidas como proteínas nativas por tener una estructura secundaria definida. Estos análisis han logrado proveer de información valiosa para el diseño, *de novo* o bien innovador de péptidos con un plegamiento deseable. La aproximación al uso de péptidos sintéticos, comparado con la clonación molecular, se ha expandido rápidamente en los campos especializados debido al hecho de que pueden sintetizarse más fácilmente y con alta pureza⁷⁴⁻⁷⁶. Esto es especialmente cierto en los casos de péptidos cortos y lineales^{69,70,77}.

Típicamente, una fase sólida estándar compuesta por fluorenil-metiloxycarbonil

(Fmoc), ha permitido que los oligopéptidos sean sintetizados de manera rutinaria al encontrarse dentro de longitudes entre los 40-50 aminoácidos, sin embargo, hay limitaciones como el de acoplamiento químicos eficientes, además es poco práctico y costoso sintetizar polipéptidos más largos. La unión química y la reacción química selectiva de regiones no protegidas del péptido, conforman una posibilidad innovadora que permite la síntesis completa de polipéptidos (proteínas) inclusive en agua, a un pH de 7^{70,78}.

Para el caso de algunas proteínas la síntesis química es la forma más efectiva para obtener proteínas funcionales directamente de secuencias genómicas. Por otro lado, para realizar un diseño que mejore la estabilidad en su plegamiento en algunos péptidos, es mediante la inserción de algunos residuos de cisteínas en un puente disulfuro constrictor, evitando presentar más de dos cisteínas, ya que sería posible formar más de 16 diferentes combinaciones para puentes disulfuro. Sin embargo hay métodos que permiten resolver estos inconvenientes. Como ejemplo se han establecido procesos enfocados a proteger o no, tioles para permitir su oxidación, otra alternativa descrita es la formación dirigida de múltiples puentes disulfuro asimétricos^{70,79}.

Los péptidos sintéticos en forma pura, con diseño adecuado del antígeno pueden evitar errores que podrían derivar en la generación de reacciones cruzadas y resultados engañosos⁷⁰.

La longitud de un péptido antigénico es un asunto controversial, la mayoría de los péptidos antigénicos que se solicitan para síntesis poseen una longitud de 12 a 16 aminoácidos. Los péptidos compuestos por 9 aminoácidos o menos han resultado

ser antígenos efectivos, pero los péptidos de mayor longitud de entre 12 a 16 aminoácidos pueden contener varios epítomos. Los péptidos constituidos por grupos de 18 a 20 aminoácidos o mayores comienzan a presentar retos y dificultades para su síntesis⁷⁰.

1.10 UNIÓN DE LOS PÉPTIDOS

Entre las fases sólidas que se utilizan para las pruebas de ELISA las superficies más utilizadas son las placas de poliestireno con 96 pozos. Las fuerzas de unión que se dan entre el antígeno y la fase sólida son hidrofóbicas. El poliestireno también puede encontrarse irradiado o tener tratada la superficie, lo cual permite la unión covalente del antígeno a la fase sólida, además de la participación de las uniones por adsorción física. Cuando los péptidos sintéticos se colocan directamente sobre la superficie de una microplaca y reaccionan con los anticuerpos, puede ser difícil verificar si un resultado negativo se debe a la falta de unión inicial entre el péptido y el anticuerpo, o la falta de unión inicial entre el péptido y la superficie de la microplaca. Una manera de determinar si la unión del péptido y la superficie de la microplaca es homogénea, tras la etapa de tapizado se añade un colorante proteico , cuya lectura demostrará la unión del péptido a la superficie⁷³.

1.11 PREVENCIÓN Y CONTROL

Una de las medidas más importantes para el control de la enfermedad causada por el FIV, es la de proteger al gato infectado de otras infecciones. Que podrían no solo causar signología clínica, sino además, derivar en la progresión de la infección por el FIV. Por lo que mantener permanentemente al gato en el interior de la casa habitación minimiza el riesgo de contraer nuevas enfermedades y disminuye la probabilidad de que el FIV sea transmitido a otros gatos. En los habitáculos dónde hay múltiples gatos es muy probable que se encuentren presentes algunas otras enfermedades que infectan a la especie, por lo que los gatos con el FIV deberían mantenerse separados. En las casas dónde hay más de un gato y la convivencia entre ellos es pacífica, el gato positivo sin presentación clínica podría convivir con los otros gatos sin problemas⁸⁰.

Esterilizar a los animales puede también reducir la vagancia y el contacto con los gatos vecinos. Es recomendable que los gatos seropositivos sean esterilizados (ooforosalingohisterectomía en hembras y orquiectomía en machos) ya que esta condición puede reducir las agresiones entre los gatos y así mismo, los riesgos de diseminación del FIV asociados a estos comportamientos.⁸⁰.

1.11.1 PRUEBAS DE SALUD FRECUENTES

Los gatos infectados con el FIV deben ser examinados clínicamente por lo menos cada 6 meses y monitorear su condición corporal en búsqueda de reducciones de peso. Se deben realizar periódicamente pruebas de laboratorio de rutina

(Biometría hemática, química sanguínea y uroanálisis) y ser considerados para monitorear objetivamente el avance de la enfermedad en el gato⁸⁰.

1.11.2 PRECAUCIONES PERIOPERATORIAS

La cirugía es generalmente bien tolerada en gatos asintomáticos infectados con el FIV. La antibioterapia perioperatoria deberá realizarse sin excepción en todas las intervenciones quirúrgicas y dentales. Los gatos infectados con el FIV suelen considerarse como inmunodeficientes y deberán aislarse de otros gatos con otras patologías infecciosas. Si bien los gatos positivos al FIV pueden resguardarse en la misma habitación que otros gatos enfermos, debe considerarse el uso de jaulas individuales y no en un área de enfermedades contagiosas ni con infecciones virales, como las asociadas a problemas respiratorios¹².

1.11.3 VACUNACIÓN

La vacunación de rutina en gatos seropositivos al FIV es un tema controversial. Los gatos asintomáticos infectados con el FIV que se encuentran en etapas tempranas desarrollan una fuerte respuesta inmune postvacunal, tan buena como la esperada en gatos no infectados. Se ha puesto en discusión la seguridad al realizar un protocolo de vacunación rutinario en gatos infectados con el FIV, pues se considera que la estimulación del sistema inmune provocada por la vacunación podría causar la progresión de la enfermedad. Evaluar los riesgos y beneficios de vacunar gatos infectados con el FIV debe ser considerado dependiendo siempre del caso en particular del gato. Por ejemplo, el riesgo de infección en un gato

maduro que vive dentro de casa y que ya ha sido vacunado es muy bajo, por lo que las revacunaciones deben evitarse en este caso, sin embargo, la revacunación en gatos que frecuentan el exterior es altamente recomendable. Se considera que no hay pruebas contundentes de que los gatos positivos al FIV estén en riesgo al aplicárseles vacunas de virus activo modificado, sin embargo las vacunas atenuadas pueden revertir a la patogenicidad y provocar enfermedad en gatos con inmunosupresión. No obstante, es importante mencionar que en México no se encuentra autorizado el uso de vacunas para la prevención de la infección por el FIV⁸⁰.

La vacunación contra el FIV es un área aún en desarrollo, existen varias vacunas experimentales con cepas como Petaluma, Dixon, entre otras⁸¹. En julio del 2002, se introdujo en estados unidos la primera y actualmente única vacuna contra el FIV, con licencia para comercializarse por el laboratorio Fort Dodge (ahora propiedad de Boehringer). En las clínicas la incidencia del FIV es baja y la mayoría de los médicos clínicos coinciden en que las consecuencias de la infección por el FIV afectan gravemente al gato y constituye una justificación para el desarrollo de nuevas vacunas. Actualmente se comercializa también en Australia y Nueva Zelanda^{82,83}.

Es importante saber que la aplicación de la vacuna genera el desarrollo de anticuerpos contra el FIV en el gato, los cuales logran interferir en las pruebas diagnósticas que se encuentran en el mercado. También se ha demostrado que las hembras pueden transferir anticuerpos a sus crías (aparentemente mediante el calostro) pudiendo provocar que al realizar pruebas a estos gatitos arrojen

resultados falsos positivos. Por lo que se considera necesario el desarrollo de pruebas de diagnóstico alternativas, que detecten las infecciones reales, pues en los países donde se encuentra disponible la vacuna, los clínicos han perdido la capacidad de distinguir entre un gato con anticuerpos por infección o por vacunación⁸⁴.

2. OBJETIVOS

- Diseñar péptidos sintéticos de epítopos lineales de la región transmembranal y de la proteína de superficie del Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV).
- Elegir péptidos diferentes de otros previamente descritos en artículos científicos.
- Estandarizar la técnica de ELISA indirecta (ELISAI) utilizando los péptidos sintéticos diseñados.
- Detectar anticuerpos específicos contra la infección por el FIV en un población de felinos heterogénea.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de péptidos sintéticos es una alternativa viable que permite tener un antígeno homogéneo y puro. Si el péptido es diseñado en sitios conservados de diferentes genotipos del virus de inmunodeficiencia felina y considerando que no se han realizado trabajos en México de genotipificación que permitan establecer el genotipo prevalente en el país, este diseño por lo tanto, puede ser adecuado para ser utilizado en pruebas serológicas de diagnóstico que detecten el FIV. Por otra parte, al no existir en México investigación básica sobre esta enfermedad, la generación de datos al respecto resulta trascendental para orientar las medidas de diagnóstico y profilaxis que favorezcan la salud felina.

De igual forma, al establecer alternativas de diagnóstico específicas y locales diferentes a las ofrecidas en las pruebas comerciales, que estén vinculadas a los genotipos prevalentes del FIV que circulan en la población de gatos domésticos del país; permitirá realizar estudios seroepidemiológicos para establecer la importancia de la infección del FIV en gatos domésticos de México.

4. HIPÓTESIS

Si se eligen péptidos lineales que contengan epítomos conservados de las regiones de la transmembrana y superficie de genotipos del FIV frecuentes o presentes en gatos domésticos de México, entonces, será posible identificar anticuerpos específicos con técnicas de ELISAi y por ende, determinar la infección a partir de muestras de plasma y/o suero de gatos asintomáticos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras

A partir de un banco de muestras de plasma (Figura 3) disponibles en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular colectadas de enero de 2011 a junio de 2015⁵³. Se evaluaron 205 muestras, las cuales provenían de felinos domésticos del Estado de México y el Distrito Federal, de diferentes edades y sexo. Analizando las historias clínicas en la mayoría de los gatos no se encontró asociación con signología clínica relacionada con la infección por el FIV.

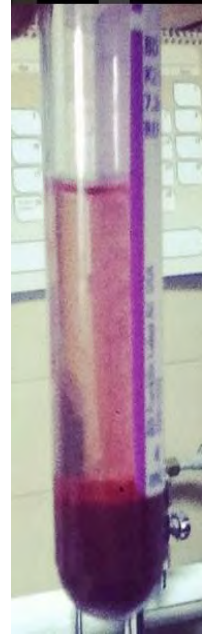


Figura 3. Muestra de sangre completa de un gato, se observan las tres fases de arriba hacia abajo; plasma, células blancas y células rojas.

5.2 Diseño de péptidos

Se estableció un banco de secuencias nucleotídicas del gen *env*, del Virus de Inmunodeficiencia Felina disponibles en el GenBank descritas en diferentes regiones del mundo y de diferentes genotipos del FIV. Estas secuencias fueron deducidas a aminoácidos utilizando el programa bioinformático BioEdit (Sequence Alignment Editor Copyright© 1997-2005 Tom Hall Version 7.0.5.3) para su posterior análisis. Se consultaron péptidos del FIV evaluados en estudios publicados en artículos científicos y que se encontraron disponibles en las bases

de datos. Todos los péptidos fueron analizados utilizando un Algoritmo de Predicción de determinantes antigénicos⁸⁵⁻⁸⁷.

$$A_p = fAg/fs^{88}$$

Donde **A_p**= Valor de propensión de Antigüedad.

fAg= Frecuencia de incidencia de los aminoácidos determinantes de la antigüedad (Hidrofilicidad, accesibilidad y flexibilidad).

fs= Frecuencia de incidencia de aminoácidos en la superficie.

A partir de epítopes lineales identificados con el algoritmo se eligieron las secuencias aminoacídicas que poseían una mayor probabilidad de estar presentes en nuestro país y que fueran diferentes a las ya previamente reportadas⁸⁹.

Cuadro 4. SELECCIÓN DE LOS PÉPTIDOS CONSULTADOS

NÚMERO	PÉPTIDO	REGIÓN LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
1	Péptido 99	Superficie, 339-356	⁸⁹
2	Péptido 100	Superficie, 602-619	⁸⁹
3	Péptido 101	Superficie, 67-92	⁸⁹
4	Péptido 102	Transmembrana, 824-848	⁸⁹
5	Péptido 103	Superficie, 295-321	⁸⁹
6	Péptido 1 TM Gregg	Transmembrana, 645-659	⁹⁰
7	Péptido 2 TM Gregg	Transmembrana, 765-779	⁹⁰
8	Péptido 3 TM Gregg	Transmembrana, 775-789	⁹⁰
9	Péptido 1 SU Gregg	Superficie, 336-350	⁹⁰

10	Péptido 2 SU Gregg	Superficie, 361-375	⁹⁰
11	Péptido 3 SU Gregg	Superficie, 441-455	⁹⁰
12	Péptido 4 SU Gregg	Superficie, 476-490	⁹⁰
13	Péptido 5 SU Gregg	Superficie, 565-579	⁹⁰
14	Péptido 1 Pierre	Transmembrana, 703-711	⁹¹
15	Péptido 2 Pierre	Transmembrana, 699-716	⁹¹
16	Péptido 1	Superficie, 89-111	⁸⁶
17	Péptido 2	Superficie, 94-111	⁸⁶
18	Péptido 3	Superficie, 149-173	⁸⁶
19	Péptido 4	Superficie, 175-192	⁸⁶
20	Péptido FIV	Superficie, 274-294	Este estudio
21	Péptido 6	Superficie, 312-334	⁸⁶
22	Péptido 7	Superficie, 579-605	⁸⁶
23	Péptido 8	Transmembrana, 616-631	⁸⁶
24	Péptido 9	Transmembrana, 640-664	⁸⁶
25	Péptido 140 M1	Transmembrana, 662-682	Este estudio
26	Péptido 11	Transmembrana, 784-832	⁸⁶

Posteriormente se analizaron los alineamientos de las secuencias nucleotídicas para determinar el grado de conservación de las regiones y sus características de antigenicidad, lo cual permitió suponer que favorecería la detección de anticuerpos dirigidos contra diversas variantes antigénicas en la mayoría de la población felina.

Tras haber realizado el análisis *in silico* de 26 péptidos recabados de diferentes referencias y los generados en este estudio se determinó que a partir de los

criterios antes mencionados para su evaluación fueron 2 los que se someterían a evaluación y síntesis por el laboratorio Peptide 2.0 Virginia, USA; los cuales se describen a continuación:

Péptido 140 M1, Región TM 662-682 de 21 aminoácidos
INN LRL VTL EHQ VLV IGL KVE (Figura 4)

Péptido FIV , Región SU 274-294 de 21 aminoácidos
CYN VSV IIP DYQ CYL DRV DTW
(Péptidos susceptibles a patentarse)

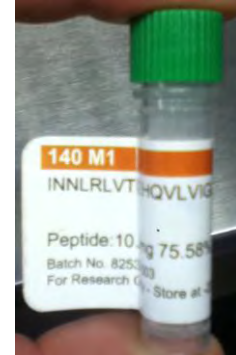


Figura 4. Péptido 140 M1 sintetizado

5.3 Técnica de ELISA indirecta (ELISAI)

Se utilizaron placas de 96 pozos que fueron sensibilizadas con los péptidos diseñados de forma independiente, a diferentes concentraciones (300, 600 y 1200 ng) para establecer la cantidad adecuada de antígeno. Se bloquearon las zonas no cubiertas por el péptido utilizando caseína (Sigma) al 2.5%. Se determinó la dilución adecuada del primer Ab (Se evaluaron las siguientes concentraciones 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40) y del segundo Ab o conjugado “Anti IgG de gato peroxidado” (evaluando las siguientes diluciones 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1250, 1:1500, 1:3000 y 1:5000). Como substrato se utilizó ABTS (millipore) y se realizó la lectura de la densidad óptica de cada muestra en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405nm, a los 20, 30 y 40 minutos de reacción.

5.4 Diagnóstico con estuches comerciales basados en inmunocromatografía

De una población de 205 muestras de plasma se seleccionaron 70 muestras para ser sometidas a la prueba comercial serológica basada en inmunocromatografía (Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit). Este grupo de muestras fueron consideradas basadas en los resultados previamente obtenidos en PCR⁹² o por su posible asociación con la infección del FIV tomando en cuenta su historia clínica.

La prueba se realizó según lo indicado por el fabricante. Brevemente, utilizando uno de los tubos capilares incluidos se tomó una muestra de 10 µl de plasma y se colocó en el orificio absorbente del estuche, luego se colocaron dos gotas (aproximadamente 60 µl) del diluyente incluido en la prueba.

Cuando la prueba comenzó a reaccionar se observó un color morado que recorrió la ventana de resultados al centro del dispositivo. Si la migración no inició después de un minuto se agregó otra gota de diluyente. Los resultados se interpretaron a los diez minutos, ya que según el inserto del producto pasado este tiempo ya no se deben considerar como veraces los resultados⁶⁷.

6. RESULTADOS

6.1 ELISAI con el péptido FIV

No hubo una reacción significativa con el uso de este péptido.

6.2 ELISAI con el péptido 140M1

La estandarización de la técnica se logró utilizando 600 ng de péptido, una dilución de 1:10 del primer anticuerpo y 1:1000 del conjugado y realizando la lectura de densidad óptica a los 30 minutos (Figura 5).

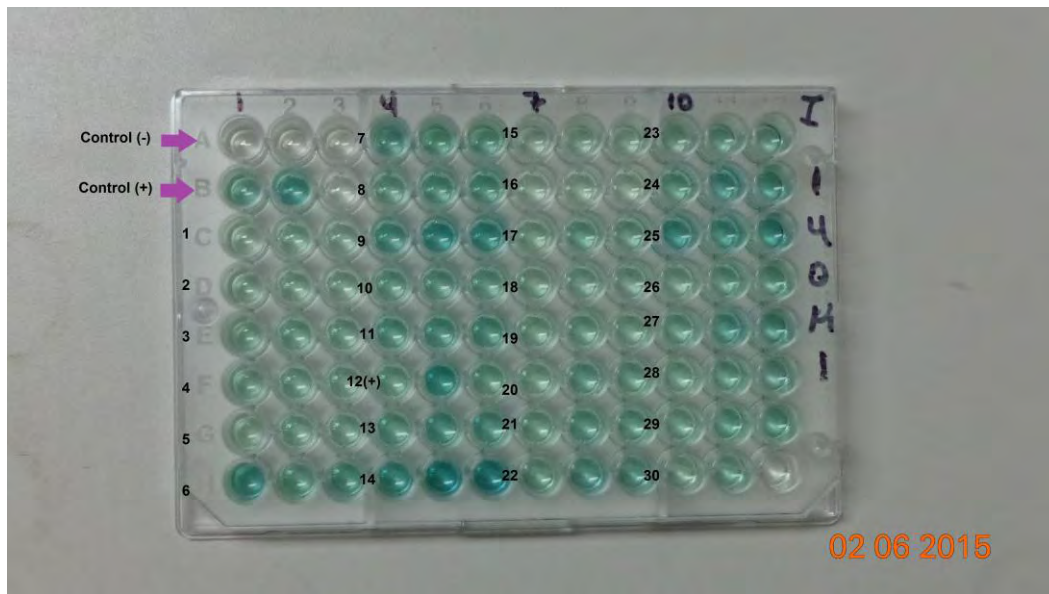


Figura 5. Placa de ELISA mostrando los resultados obtenidos de un panel de muestras evaluadas para determinar la presencia de anticuerpos contra el FIV.

Raw Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1 0.100	T9 0.094	T17 0.093	T25 0.652	T33 0.602	T41 0.427	T49 0.277	T57 0.274	T65 0.288	T73 0.405	T81 0.459	T89 0.415
B	T2 0.529	T10 0.810	T18 0.088	T26 0.477	T34 0.717	T42 0.613	T50 0.160	T58 0.219	T66 0.180	T74 0.522	T82 0.600	T90 0.473
C	T3 0.230	T11 0.370	T19 0.295	T27 0.667	T35 0.909	T43 0.726	T51 0.310	T59 0.360	T67 0.419	T75 0.855	T83 0.462	T91 0.614
D	T4 0.299	T12 0.296	T20 0.312	T28 0.403	T36 0.458	T44 0.429	T52 0.278	T60 0.306	T68 0.362	T76 0.313	T84 0.407	T92 0.390
E	T5 0.389	T13 0.447	T21 0.370	T29 0.463	T37 0.534	T45 0.575	T53 0.388	T61 0.364	T69 0.312	T77 0.372	T85 0.506	T93 0.517
F	T6 0.416	T14 0.400	T22 0.356	T30 0.391	T38 0.848	T46 0.472	T54 0.354	T62 0.450	T70 0.421	T78 0.307	T86 0.424	T94 0.418
G	T7 0.328	T15 0.380	T23 0.347	T31 0.445	T39 0.622	T47 0.451	T55 0.297	T63 0.425	T71 0.334	T79 0.330	T87 0.428	T95 0.433
H	T8 1.005	T16 0.619	T24 0.561	T32 0.835	T40 0.985	T48 0.681	T56 0.345	T64 0.573	T72 0.485	T80 0.298	T88 0.295	T96 0.086

Cuadro 5. Resultados cuantitativos de muestras de plasma de felinos evaluadas para la detección de anticuerpos contra el FIV, leídos a una absorbancia de 405 nm.

6.3 Determinación del valor de corte de la prueba de ELISAi con el péptido 140M1

Para comprobar la significancia de los valores obtenidos en la población de estudio y establecer una línea de corte, a partir de 41 muestras del banco de plasma y suero de felinos del laboratorio de virología. Se calculó el valor de la media (\bar{X}):

$\bar{X}=0.03015854$; la desviación estándar (δ)

$\delta= 0.06972324$;

a la cual se le aplicaron 3 desviaciones estándar (3δ)

$3\delta= 0.2091696$.

Con base en estos datos se estableció el valor de corte (VC) mediante la siguiente fórmula:

$$VC = \bar{X} + 3\delta$$

Al substituir los valores:

$$VC = 0.03015854 + 0.2091696 = 0.239.$$

Para aumentar la confianza en la prueba se aumentó el valor 10% hacia la izquierda para resultados positivos a FIV y se disminuyó el valor 10% hacia la derecha para resultados negativos a FIV.

Un valor igual o superior a 0.263 se consideró como un plasma positivo a anticuerpos contra el FIV.

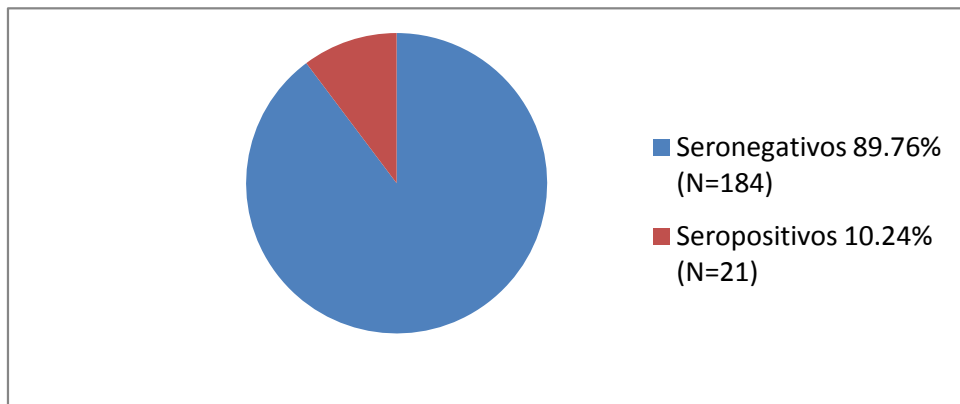
Un valor igual o menor que 0.215 se consideró como un plasma negativo a la presencia de anticuerpos contra el FIV.

Y los valores ubicados entre 0.215 y 0.263 fueron considerados como resultados indeterminados.

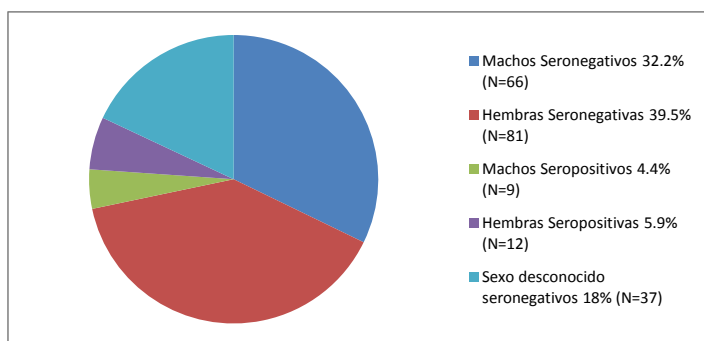
Los resultados obtenidos por serología para determinar la presencia de anticuerpos contra el FIV en la población estudiada se analizaron por sexo, edad, procedencia geográfica, estado reproductivo, acceso al exterior y número de gatos con los que convive.

6.4 Gráficas de los resultados de ELISAI

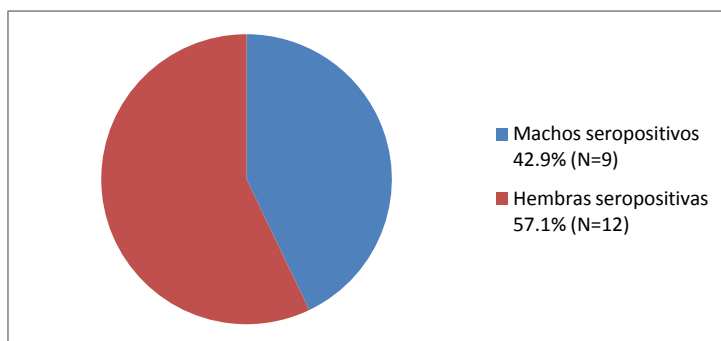
Gráfica 4. Porcentaje total de gatos seropositivos y seronegativos al virus de inmunodeficiencia felina evaluados con un ELISAI basado en el uso del péptido 140M1



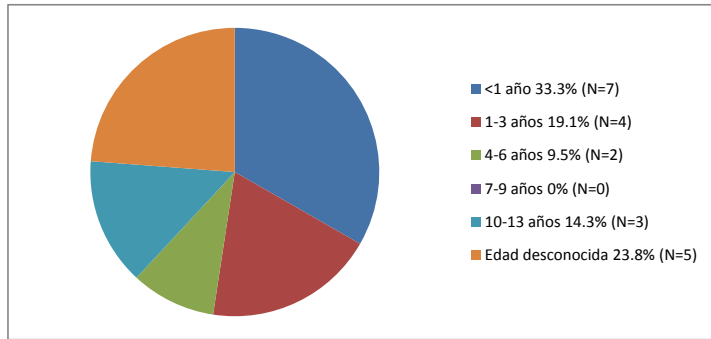
Gráfica 5. Individuos seronegativos y seropositivos al virus de inmunodeficiencia felina clasificados por sexo



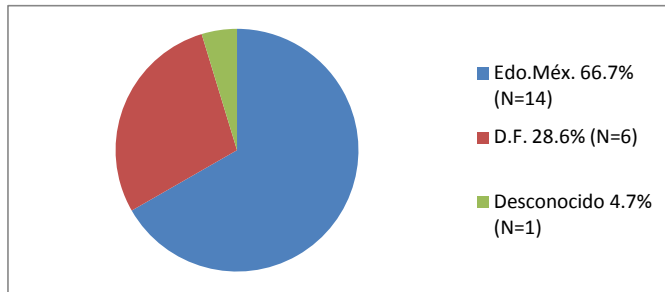
Gráfica 6. Gatos seropositivos al virus del FIV por sexo



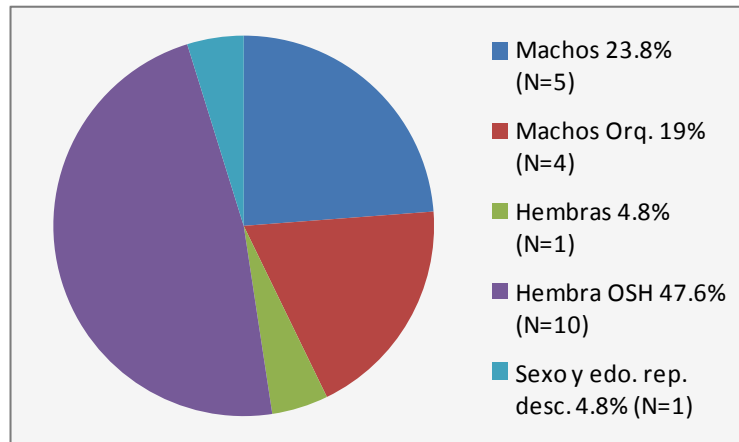
Gráfica 7. Rango etario de la población de gatos seropositiva al virus de inmunodeficiencia felina



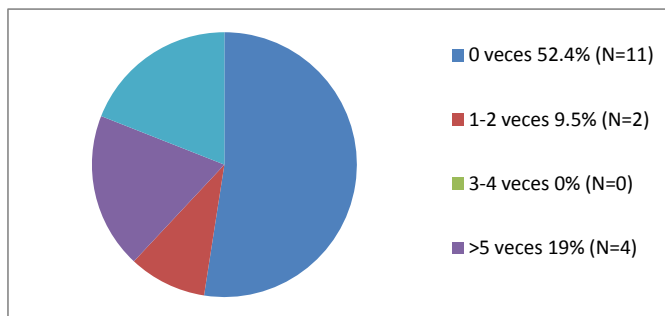
Gráfica 8. Procedencia geográfica de los gatos seropositivos al virus de inmunodeficiencia felina



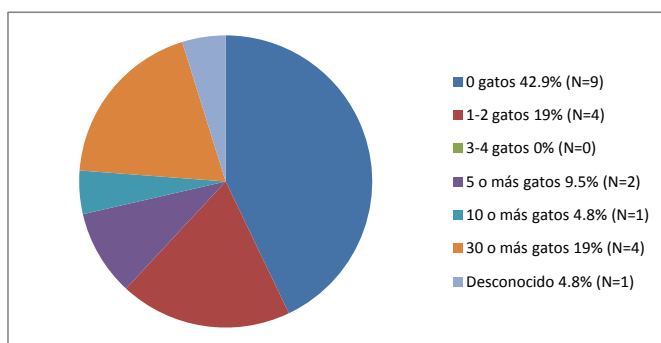
Gráfica 9. Estado reproductivo de los individuos seropositivos al virus de inmunodeficiencia felina



Gráfica 10. Número de veces que los individuos seropositivos al virus de inmunodeficiencia felina tienen acceso al exterior en una semana.



Gráfica 11. Número de gatos con los que convive cada individuo seropositivo al virus de inmunodeficiencia felina

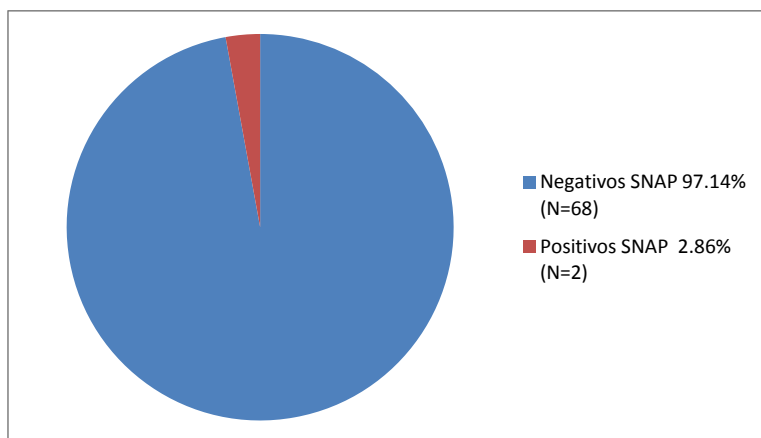


6.5 Resultados de la prueba rápida de inmunocromatografía

Se obtuvieron para la prueba comercial un total de 2 resultados positivos (2.86%) y 68 negativos (97.14%). Mientras que para la prueba de ELISAi con el péptido 140 M1 fueron 10 resultados positivos (14.29%) y 60 resultados negativos (85.71%). Sin encontrar concordancia de resultados positivos entre las dos pruebas.

Adicionalmente, en la prueba SNAP se obtuvieron para el FeLV 7 resultados positivos (10%) y 59 resultados negativos (84.29%).

Gráfica 12. Gatos seropositivos y seronegativos al virus de inmunodeficiencia felina en la prueba rápida



Los dos gatos que resultaron positivos a la prueba de diagnóstico rápido son muestras que fueron remitidas al laboratorio por la MVZ. Esp. Tamara Libertad Iturbe Cossío.

Estos gatos son dos hermanos machos orquiéctomizados, procedentes de la Ciudad de México, uno de ellos tiene acceso al exterior diariamente y el otro una vez a la semana y conviven con 5 gatos más en casa.

7. DISCUSIÓN

Las secuencias peptídicas pueden mimetizar epítomos inmunodominantes de las proteínas virales, considerándose antígenos bien definidos químicamente. Es por ello que se han utilizado para aumentar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas diagnósticas. Por el contrario, con el uso de antígenos convencionales no definidos, se genera una deficiente reproductibilidad de los resultados, así como la variabilidad en la sensibilidad de los ensayos inmunológicos clásicos⁷³.

Se han realizado estudios para identificar regiones peptídicas de lentivirus de felinos silvestres que permitan determinar si son conservadas como los que se han encontrado para felinos domésticos, de forma que también se puedan desarrollar técnicas de diagnóstico para otras especies⁹³.

Debido a las ventajas que representan los péptidos actualmente hay diversos estudios que hacen uso de estos, para fines diagnósticos de enfermedades. Se han utilizado péptidos sintéticos para su uso en técnicas de diagnóstico serológico de enfermedades como el SIDA humano causado por el VIH, artritis reumatoide, hepatitis C y G; dónde los resultados confirmaron la utilidad de agregar péptidos sintéticos específicos a los antígenos habitualmente empleados para el diagnóstico de infecciones, como lo describen otros estudios^{71,73,94-96}. Los péptidos no sólo se utilizan de manera experimental, también se utilizan en productos de uso comercial como en los estuches de diagnóstico rápido para el FIV de los laboratorios Bionote, IDEXX y Zoetis^{49,59,60}.

Estos trabajos y aplicaciones conforman un antecedente para que en el presente estudio se diseñaran y evaluaran dos péptidos, uno de la región de la proteína de superficie (péptido FIV) y otro de la región de transmembrana del virus (péptido 140 M1); en el primero de los casos no se obtuvieron resultados significativos en las lecturas de las pruebas de ELISA en ninguna de las variantes probadas. Mientras que con el segundo si se logró obtener una respuesta cuantificable de la formación del complejo Ag-Ab entre el péptido como un antígeno sintético y los anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia felina presentes en el plasma o suero de los gatos probados. El no obtener los resultados esperados con todos los péptidos que se diseñan no es extraño sino más bien esperable, en la mayoría de los experimentos en que se diseñan y sintetizan péptidos se realiza con muchos de ellos para identificar a aquel o aquellos que demuestran el mejor desempeño para el tipo de producto esperado como en el caso de trabajos como el de; Avrameas et al., 1993; Dean et al., 2004; Pérez, 2007^{57,73,90}.

La razón de por qué no todos los péptidos presentan la reacción esperada en las pruebas, se explica a partir de que la presentación o no de una reacción significativa se puede dar con base en diferentes variables, como son los genotipos, la región, fase de infección, posición de péptidos en la proteína, entre otras⁹⁶, puesto que el virus de inmunodeficiencia felina está compuesto por diferentes estructuras proteicas internas, enzimas virales y glicoproteínas de la envoltura⁸³; basados en la variabilidad genética de las regiones V3-V5 presentes en el gen de la envoltura⁹⁷.

Actualmente se han identificado seis distintos subtipos (de la A a la F) y un subtipo recientemente descubierto por Hayward en 2007, subtipo que al parecer exclusivamente infecta a los gatos de Nueva Zelanda⁹⁸. En el presente estudio considerando que no se ha identificado el o los genotipos que se encuentra infectando a los gatos domésticos del país, se diseñaron péptidos en regiones conservadas de diferentes variantes genéticas del virus ubicadas en el gen *env* el cual codifica para las Gp100 y Gp 36.

En el presente estudio los plasmas o sueros utilizados provenían de sangre completa en EDTA colectada de gatos. De las muestras de sangre se separó el plasma y las células para su uso en el caso de la primera muestra en técnicas serológicas y para la extracción de ADN de las células mononucleares. El ADN fue utilizado en un trabajo paralelo que buscó identificar el FIV por técnicas moleculares⁹². El uso del plasma no es bien aceptado por algunos laboratorios de diagnóstico serológico, argumentando pérdida de sensibilidad en las pruebas, sin embargo se ha demostrado que no existe una diferencia significativa en los resultados al momento de decidir hacer uso de suero o plasma en las técnicas serológicas, por ejemplo, en un estudio realizado por Aufrán en 2014 para la identificación del virus de leucemia viral felina, se evaluaron el plasma y el suero utilizándolo en las técnicas de ELISA y Western blot, encontrando que los resultados no fueron afectados por la muestra utilizada como fuente de anticuerpos⁵³.

En el caso de las tres pruebas de diagnóstico rápido para el FIV ya mencionadas (IDEXX, Zoetis y Bionote) se pueden utilizar indistintamente el suero o el plasma, así como sangre completa^{56,66,67}.

En el presente estudio se encontró un mayor porcentaje de hembras ooforosalpingohisterectomizadas positivas en el ELISA para detectar el FIV (47.6%), los siguientes grupos con mayor cantidad de gatos positivos a la prueba fueron los gatos machos enteros (23.8%) y los gatos machos esterilizados (19%). Estos resultados son diferentes de los reportados en estudios realizados en diferentes países como el de Levy de 2006 en Estados Unidos de América o el Norris de 2007 realizado en Australia del Este, en los cuales se ha encontrado que la prevalencia de la infección por el FIV es mayor en gatos machos enteros, machos castrados y gatos ferales en comparación con la población general de los gatos domésticos que tienen un dueño^{82,99}.

Una posible razón de la discrepancia entre los resultados encontrados en este trabajo a los de otros estudios podría deberse a la cantidad de hembras (n=94) y machos (n=76) con diferentes estados reproductivos en donde en particular, el mayor número representado en la población de estudio correspondió a hembras ooforosalpingohisterectomizadas (n= 51). La distribución heterogénea de estos factores en la población de estudio fue debida a que el muestreo se llevó a cabo por conveniencia, tomando muestras de gatos que tenían un propietario o responsable (no se probaron muestras de gatos ferales) y que en algunos casos correspondieron a muestras tomadas durante campañas de esterilización, en

donde los machos fueron pocos y un gran número de hembras llevadas a estos programas.

Los resultados que se obtuvieron en cuanto a la distribución geográfica de los felinos positivos en el total de la población fue de 6.82% que provienen del Estado de México (EM), el 2.92% de la Ciudad de México y solo del 0.48% en el que se desconoce si proceden de la CDMX o del Edo.Mex.

Como antecedentes a estos datos se tiene conocimiento de tres estudios serológicos realizados en México previos al presente trabajo, en los cuales la prueba diagnóstica utilizada fueron de tipo comercial que detectan anticuerpos para el FIV.

El primer trabajo del que se tiene conocimiento fue una tesis realizada en 1993 por Morales (1993) en la cual no se encontró ningún resultado positivo en pacientes provenientes de la Ciudad de México¹⁰⁰.

En el siguiente estudio que realizó Marín (2005) mediante la colaboración de 100 consultorios, clínicas y hospitales veterinarios distribuidos a lo largo de 21 estados y el Distrito Federal de nuestro país. La población total fue de 500 muestras y se detectó un 7.4% de pacientes positivos al FIV; en lo particular, en el caso de gatos provenientes del Distrito Federal se encontró 1.8% de pacientes positivos¹⁰¹. Resultados muy similares a los encontrados en el presente estudio, lo que al parecer indica que la prevalencia del FIV en la población de gatos de la Ciudad de México no se ha modificado substancialmente.

Finalmente, el tercer trabajo que se ha realizado en materia de detección serológica del FIV en México, se llevó a cabo en el estado de Yucatán a cargo de Ortega (2014). Con una prevalencia de 2.5% para el FIV¹⁰².

Aún que los retrovirus se caracterizan por tener un periodo de latencia largo y suelen causar cuadros clínicos a edades más avanzadas en el caso del presente estudio la mayor parte de la población seropositiva estuvo conformado en un mayor porcentaje por individuos jóvenes (de uno a tres años).

Sin embargo, de los dos grupos etarios que fueron mayoritarios se observó que aún que el grupo de gatos de uno a tres años fue mayor que el de gatos de menos de un año, el grupo en donde se encontraron mayor número de seropositivos al FIV fue en este último.

Este hallazgo puede explicarse con estudios que demuestran que los anticuerpos maternos pueden interferir en el diagnóstico del FIV^{82,101}. Otros estudios como el realizado por Westman (2015), sobre la detección del FIV utilizando diferentes pruebas comerciales en Australia, excluyen dentro de los criterios de recolección de muestras que conformarían su población de estudio a gatitos que tuvieran menos de 6 meses de edad debido a que la inmunidad materna aún presente en estos individuos podía ser un factor que arrojará resultados positivos que no correspondieran a la infección natural^{83,103}.

Otro factor a considerar en gatos jóvenes es que posiblemente estén infectados y cursen con una etapa de gatos asintomáticos, sin una respuesta inmunológica detectable, dado al riesgo que tienen sus madres de infectarse durante la

gestación y transmitir la infección a sus crías *in utero*, vía perinatal, con calostro o saliva⁷.

Con respecto al número de veces que los gatos salen a lo largo de una semana es un factor de riesgo que se analizó en vista de que la transmisión del virus ocurre mediante la convivencia y principalmente en episodios de agresión entre sus coespecíficos, al salir más veces a realizar actividades de vagabundeo (una actividad que es más común en machos y en general en animales no esterilizados) es mayor la probabilidad de que esto ocurra; como lo menciona Norsworthy (2011)⁷.

El grupo con mayor porcentaje de positivos fue el de gatos que no salen de casa, lo cual es llamativo pues contradice los resultados obtenidos en otros estudios, las razones tras este resultado podrían estar vinculados a que este es el grupo con el mayor número (n=66) de individuos en la población de estudio. Los siguientes grupos con porcentajes altos de seropositividad fueron el grupo de cuyos propietarios no saben cuántos días a la semana tienen acceso al exterior y los que tienen acceso más de cinco días a la semana, estos resultados concuerdan con los hallazgos de otras investigaciones, cómo las de Levy (2006) y Norris (2007)^{82,99}.

El último factor que se analizó en este trabajo fue la convivencia cotidiana de los gatos con coespecíficos en el mismo hábitat. La relevancia de analizar este factor radica en que a pesar de que se conoce que la principal forma de transmisión del

virus es mediante las mordidas en peleas, existe evidencia que demuestra que puede transmitirse de manera casual entre individuos que tienen una convivencia cercana y apacible, al compartir los tazones de agua y alimento o mediante el acicalamiento social, como lo reportaron Addie et al., en el 2000¹⁰⁴.

El grupo con mayor porcentaje de individuos positivos fue a su vez, el grupo que formo mayormente la población total del estudio, este fue el de los individuos que no conviven con ningún gato; resultado diferente de lo reportado en estudios como las de Levy (2006) y Norris (2007)^{82,99} que demuestran la tendencia en otros países, posiblemente debido a que en la presente investigación no se incluyeron muestras de gatos ferales y que los gatos de este grupo estuvo compuesto de gatos que tienen un propietario.

Se usó un kit comercial basado en inmunocromatografía de forma complementaria con la finalidad de comparar los resultados obtenidos por el ELISAI. Estudios previos realizados en el país que se han basado en el uso de este tipo de pruebas identificaron menos del 3% de animales seropositivos¹⁰⁰⁻¹⁰². Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio, sin embargo con la prueba de ELISAI con el péptido 140 se identificó un 14.29% (n=10) de seropositivos, 5 veces mayor a los que se han identificado con pruebas comerciales. Ocho de los 10 gatos seropositivos fueron concordantes con los resultados obtenidos por PCR de la región gag del FIV en el estudio de González, 2015¹⁰⁴.

Otra posible explicación de la no concordancia de los resultados seropositivos entre pruebas es que la prueba rápida y la prueba de ELISAI estén detectando subtipos diferentes del virus. En vista de que todas las pruebas comerciales son

productos importados estas pueden estar orientadas a los subtipos más comunes y de mayor importancia en la región geográfica donde se fabrican y prueban. Lo que realza la importancia de validar las pruebas de importación para la situación epidemiológica del país.

Es posible que se generen resultados falsos negativos o falsos positivos en las pruebas comerciales que están disponibles para utilizarse en los consultorios veterinarios o incluso con el uso de la PCR comercial para FIV Real PCR™ de IDEXX (esta prueba detecta los subtipos A, B, D y F). En un trabajo realizado por Westman et al., (2015) comparando las cuatro diferentes técnicas diagnósticas comerciales y un ELISA experimental, encontraron que entre las pruebas existió discordancias entre cada una de ellas. Lo que pone de manifiesto que ninguna técnica de diagnóstico es infalible y que el uso de al menos dos técnicas asegurará el diagnóstico para el FIV^{83,105}. A la luz de esto se hace evidente la necesidad de realizar análisis filogenéticos en casos de gatos con resultados positivos para el desarrollo de pruebas más específicas.

8. CONCLUSIONES

Se diseñaron dos péptidos sintéticos de epítomos lineales; el péptido FIV de la región de superficie y el péptido 140 M1 de la región transmembranal del virus de inmunodeficiencia felina.

El péptido FIV no fue reactivo en pruebas de ELISA.

El péptido 140 M1 fue reactivo y se utilizó para estandarizar una técnica de ELISAi que identificó anticuerpos específicos contra la infección por el virus de inmunodeficiencia felina.

Los péptidos utilizados en el presente estudio fueron diferentes de los utilizados en otros estudios previamente presentados.

9. RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos en las pruebas de serología y biología molecular desarrolladas y estandarizadas en el laboratorio de virología, genética y biología molecular de la facultad de estudios superiores Cuautitlán, sería útil continuar con esta línea de investigación siendo recomendable evaluar péptidos de otras regiones virales o de diferentes epítomos de los ya analizados, desarrollar un estudio filogenético del virus de inmunodeficiencia felina presente en gatos de México, entre otras posibilidades de estudios y de esta forma contribuir con más información respecto al virus de inmunodeficiencia felina.

10. APÉNDICES

10.1 Solución 0.05 M de buffer de carbonatos-bicarbonatos a pH 9.6

Disolver 1 cápsula de carbonate-bicarbonate buffer (marca Sigma Número de catálogo C3041-50) en 90 ml de H₂O ultrapura filtrada. Medir el pH de la solución a fin de que se encuentre a pH 9.6, una vez obtenido este valor aforar a 100 ml. Almacenar hasta su uso a temperatura ambiente o 25°C.

10.2 Stock de los péptidos 140 M1 y FIV a 4 µg/µl (250 µl)

Pesar 1 mg del péptido (140 M1 o FIV) y adicionar 250 µl de agua mili Q, de esta solución realizar alícuotas de 20 µl.

10.3 Solución de lavado PBS -0.05% Triton X100

Disolver el contenido de un sobre de Phosphate Buffered Saline (Marca Diasorin Inc.), pH (7.4 +0.2) en un litro de agua bidestilada y adicionar 500µl de Triton X100.

10.4 Solución de bloqueo (Caseína 2.5%)

0.3 M de NaOH, pesar 3 g. de NaOH y disolverlos en 200 ml de H₂O recién destilada, aforar a 250 ml.

Pesar 6.25 g. de caseína y disolverla poco a poco con agitación fuerte en 200 ml de 0.3 M de NaOH, hasta que sea homogénea la solución. Posteriormente se deja

agitando por una hora (o más) hasta que se mantenga un pH de 7.0, finalmente debe ajustarse el volumen a 250 ml con agua bidestilada.

Nota: 17 ml son suficientes para bloquear una placa de 96 pozos colocando 150 μ l por pozo.

8 ml diluidos en 16 ml de solución de lavado es suficiente para las diluciones de 32 sueros que pueden probarse en una placa.

6 ml diluidos en 12 ml de solución de lavado es adecuado para preparar el conjugado que se utiliza en una placa.

Con base en lo anterior un total de 35 ml de solución de bloqueo son suficientes para todo el desarrollo del ELISA.

10.5 Solución para diluir anticuerpos 1° y 2°

Diluir 1:2 la solución de bloqueo con solución de lavado.

10.6 Solución de trabajo de 6 ng/ μ l del péptido 140 M1

Para realizar la dilución a 600 ng de péptido se diluyen 18 μ l de la solución stock en 6 ml de buffer de carbonatos-bicarbonatos.

Nota: 6 ml de esta dilución son suficientes para sensibilizar una placa de 96 pozos.

10.7 Solución de trabajo de la Proteína anti IgG de gato en cabra

Diluir 3.5 µl de Proteína anti IgG de gato en 3500 µl de solución para diluir anticuerpos y mezclar con el vortex. Esto para obtener una solución a una concentración de 1:1000 del stock de anti IgG de gato.

Cuadro 6. Tabla de resultados de la prueba rápida para FIV/FeLV y para ELISA i

NÚMERO DE MUESTRA	FIV SNAP	FeLV SNAP	FIV ELISA
1	(-)	(-)	(+)
2	(-)	(-)	(-)
4	(-)	*	(-)
55	(-)	(-)	(-)
57	(-)	(+)	(-)
92	(-)	(+)	(-)
94	(-)	(-)	(-)
97	(-)	(-)	(-)
98b	(-)	(-)	(-)
99	(-)	(-)	(-)
101	(-)	(-)	(-)
103	(-)	(-)	(-)
104	(-)	(-)	(-)
120	(-)	(-)	(-)
121	(-)	(-)	(-)
122	(-)	(-)	(-)
123	(-)	(-)	(-)
124	(-)	(-)	(-)
125	(-)	*	(-)
126	(-)	(-)	(-)
127	(-)	*	(-)
129	(-)	(-)	(+)
133	(-)	(-)	(-)
135	(-)	(-)	(-)
136	(-)	(-)	(-)
137	(-)	(-)	(-)
138	(-)	(+)	(-)
139	(-)	(-)	(+)
140	(-)	(-)	(+)
141	(-)	(-)	(-)

142	(-)	(+)	(-)
143	(-)	(-)	(-)
144	(-)	(-)	(-)
146	(-)	(-)	(+)
147	(-)	(+)	(-)
150	(-)	(-)	(-)
151	(-)	(-)	(-)
153	(-)	(-)	(-)
156	(-)	(+)	(-)
162	(-)	(-)	(-)
163	(-)	(-)	(-)
164	(-)	(-)	(-)
165	(-)	(-)	(+)
166	(-)	(-)	(+)
167	(-)	*	(-)
169	(-)	(-)	(-)
170	(-)	(-)	(-)
171	(-)	(-)	(-)
172	(-)	(-)	(+)
173	(-)	(-)	(-)
174	(-)	(-)	(-)
175	(-)	(-)	(-)
176	(-)	(-)	(+)
177	(-)	(-)	(+)
178	(-)	(-)	(-)
179	(-)	(-)	(-)
180	(-)	(-)	(-)
181	(-)	(-)	(-)
182	(-)	(-)	(-)
184	(-)	(-)	(-)
186	(-)	(-)	(-)
188	(-)	(+)	(-)
190	(-)	(-)	(-)
192	(-)	(-)	(-)
194	(-)	(-)	(-)
197	(-)	(-)	(-)
198	(-)	(-)	(-)
199	(-)	(-)	(-)
213	(+)	(-)	(-)
214	(+)	(-)	(-)

Cuadro 7. Resultados de 21 muestras de PCR y ELISA para FIV.

NÚMERO DE MUESTRA	FIV PCR	FIV ELISA
1	(+)	(+)
12	*	(+)
32	*	(+)
94 ^a	(+)	(+)
119	*	(+)
129	(-)	(+)
130	(-)	(+)
139	(-)	(+)
140	(+)	(+)
146	(+)	(+)
148	(+)	(+)
155	*	(+)
165	(-)	(+)
166	(+)	(+)
168	(-)	(+)
172	(+)	(+)
176	(+)	(+)
177	(-)	(+)
208	*	(+)
210	*	(+)
S/N	*	(+)

*. No se realizó la prueba

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Kulyk M. Vih, virus, partícula, ilustraciones, 2005.
2. Llorens C, Futami, R., Covelli, L., Dominguez-Escriba, L., Viu, J.M., Tamarit, D., Aguilar-Rodriguez, J. Vicente-Ripolles, M., Fuster, G., Bernet, G.P., Maumus, F., Munoz-Pomer, A., Sempere, J.M., LaTorre, A., Moya, A. . FIV structure. <http://gydb.org/index.php/Element:FIV>: The Gypsy Database (GyDB) of Mobile Genetic 2011.
3. Sprague WS, Apetrei C, Avery AC, et al. Large granular lymphocytes are universally increased in human, macaque, and feline lentiviral infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2015;167:110-121.
4. Lecollinet S, Richardson J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: the road not taken. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008;31:167-190.
5. Brown EW, Yuhki N, Packer C, et al. A lion lentivirus related to feline immunodeficiency virus: epidemiologic and phylogenetic aspects. *J Virol* 1994;68:5953-5968.
6. Richards JR. Feline immunodeficiency virus vaccine: implications for diagnostic testing and disease management. *Biologicals* 2005;33:215-217.
7. Nosworthy GD. *The Feline Patient*. 4th ed: Wiley-Blackwell, 2011.
8. Gómez-Lucia Duato EAS, A.; Barneto Carmona, A. et al. . Retrovirosis felinas I. *Canis et felis* 2006.
9. MIRÓ CORRALES G, BARNETO CARMONA, A., COLLADO ALCALÁ, V.M. et al. . Retrovirosis felinas II. *Canis et felis* 2006;II.
10. Palmero Colado ML, Carballés Pérez , Vanessa. *Enfermedades infecciosas felinas*. Navarra: Servet, 2012.
11. Greene CE. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. . 4th ed, 2011.
12. Horzinek MA, D.; Belak, S. et al. . ABCD guide lines on Feline Immunodeficiency virus. . *European Advisory Board on Cat Diseases* 2008.
13. Palmero Colado ML. Leucemia e Inmunodeficiencia felina: Claves diagnósticas. *Gattos: Gattos Centro Clínico Felino*, 2011;22.
14. Bishop SA, Stokes CR, Gruffydd-Jones TJ, et al. Vaginal and rectal infection of cats with feline immunodeficiency virus. *Vet Microbiol* 1996;51:217-227.
15. Levy JK, Crawford PC, Kusuhara H, et al. Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. *J Vet Intern Med* 2008;22:330-334.
16. Yamamoto JK, Hansen H, Ho EW, et al. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1989;194:213-220.
17. Guaguére E, Prélaud, P. . *Guía práctica de dermatología felina*: Laboratorio Merial 1999.

18. Maingat F, Vivithanaporn P, Zhu Y, et al. Neurobehavioral performance in feline immunodeficiency virus infection: integrated analysis of viral burden, neuroinflammation, and neuronal injury in cortex. *J Neurosci* 2009;29:8429-8437.
19. Gleich S, Hartmann K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J Vet Intern Med* 2009;23:552-558.
20. Fujino Y, Horiuchi H, Mizukoshi F, et al. Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection. *Vet Microbiol* 2009;136:217-225.
21. Grimoldi F. Enfermedades infecciosas de los felinos, 2º Parte In: Facultad de Ciencias Veterinarias UdBA, ed. *Enfermedades infecciosas de los felinos*. Buenos Aires, Argentina, 2003.
22. Ackley CD, Yamamoto JK, Levy N, et al. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1990;64:5652-5655.
23. Brown WC, Bissey L, Logan KS, et al. Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Virol* 1991;65:3359-3364.
24. Choi IS, Hokanson R, Collisson EW. Anti-feline immunodeficiency virus (FIV) soluble factor(s) produced from antigen-stimulated feline CD8(+) T lymphocytes suppresses FIV replication. *J Virol* 2000;74:676-683.
25. English RV, Nelson P, Johnson CM, et al. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994;170:543-552.
26. Novotney C, English RV, Housman J, et al. Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS* 1990;4:1213-1218.
27. Sparger EE, Beebe AM, Dua N, et al. Infection of cats with molecularly cloned and biological isolates of the feline immunodeficiency virus. *Virology* 1994;205:546-553.
28. Beatty JA, Willett BJ, Gault EA, et al. A longitudinal study of feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *J Virol* 1996;70:6199-6206.
29. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, et al. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994;68:6103-6110.
30. Bucci JG, English RV, Jordan HL, et al. Mucosally transmitted feline immunodeficiency virus induces a CD8+ antiviral response that correlates with reduction of cell-associated virus. *J Infect Dis* 1998;177:18-25.
31. Jeng CR, English RV, Childers T, et al. Evidence for CD8+ antiviral activity in cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1996;70:2474-2480.
32. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular

immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68:4650-4655.

33. Song W, Collisson EW, Li J, et al. Feline immunodeficiency virus (FIV)-specific cytotoxic T lymphocytes from chronically infected cats are induced in vitro by retroviral vector-transduced feline T cells expressing the FIV capsid protein. *Virology* 1995;209:390-399.

34. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, et al. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986;234:1563-1566.

35. Martínez Rodríguez HA. Respuesta imune al VIF. *Foro virus de inmunodeficiencia felina (VIF)*. Auditorio Extensión universitaria campo 4. Facultad de Estudios superiores Cuautitlán, UNAM., 2015.

36. Gruffydd-Jones TJ, Hopper CD, Harbour DA, et al. Serological evidence of feline immunodeficiency virus infection in UK cats from 1975-76. *Vet Rec* 1988;123:569-570.

37. Lutz H, Arnold P, Hubscher U, et al. Specificity assessment of feline T-lymphotropic lentivirus serology. *Zentralbl Veterinarmed B* 1988;35:773-778.

38. Lutz HE, H.; Arnold, P. ; Winkler, G. ; Wolfensberger, C. ; Jarret, O.; Parodi, A.L.; Pedersen, N.C. and Horzinek, M.C. . Felines T-lymphotrophes Lentivirus (FTVL): Vorkommen in einiegen Länder Europas. *Kleintier Prax* 1988 b:455-459.

39. O'Connor TP, Jr., Tanguay S, Steinman R, et al. Development and evaluation of immunoassay for detection of antibodies to the feline T-lymphotropic lentivirus (feline immunodeficiency virus). *J Clin Microbiol* 1989;27:474-479.

40. Yamamoto JK, Sparger E, Ho EW, et al. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am J Vet Res* 1988;49:1246-1258.

41. Brunner D, Pedersen NC. Infection of peritoneal macrophages in vitro and in vivo with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1989;63:5483-5488.

42. Dow SW, Dreitz MJ, Hoover EA. Feline immunodeficiency virus neurotropism: evidence that astrocytes and microglia are the primary target cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;35:23-35.

43. Dow SW, Poss ML, Hoover EA. Feline immunodeficiency virus: a neurotropic lentivirus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990;3:658-668.

44. Matteucci D, Mazzetti P, Baldinotti F, et al. The feline lymphoid cell line MBM and its use for feline immunodeficiency virus isolation and quantitation. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;46:71-82.

45. Miyazawa T, Furuya T, Itagaki S, et al. Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus. *Arch Virol* 1989;108:131-135.

46. Phillips TR, Talbott RL, Lamont C, et al. Comparison of two host cell range variants of feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1990;64:4605-4613.

47. Tochikura TS, Hayes KA, Cheney CM, et al. In vitro replication and cytopathogenicity of the feline immunodeficiency virus for feline T4 thymic lymphoma 3201 cells. *Virology* 1990;179:492-497.
48. Tokunaga K, Nishino Y, Oikawa H, et al. Altered cell tropism and cytopathicity of feline immunodeficiency viruses in two different feline CD4-positive, CD8-negative cell lines. *J Virol* 1992;66:3893-3898.
49. Yamamoto JK, Ackley CD, Zochlinski H, et al. Development of IL-2-independent feline lymphoid cell lines chronically infected with feline immunodeficiency virus: importance for diagnostic reagents and vaccines. *Intervirology* 1991;32:361-375.
50. Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, et al. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J Gen Virol* 2001;82:1589-1596.
51. Jackson ML, Haines DM, Taylor SM, et al. Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. *J Vet Diagn Invest* 1996;8:25-30.
52. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
53. Autran Martínez M. Uso de la técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de Leucemia Viral Felina y el Análisis filogenético de los productos amplificados *Programa de Maestría y Doctorado en ciencias de la producción y salud animal*. Mexico, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2014;110.
54. Vásquez Contreras E. Secuencias específicas de ADN pueden ser amplificadas (reacción en cadena de la polimerasa) Instituto de Química, UNAM, 2003.
55. Calzolari M, Young E, Cox D, et al. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;46:83-92.
56. IDEXX L. Feline Leukemia Virus Antigen-Feline Immunodeficiency Virus Antibody Test Kit Insert. U.S.A., 2013.
57. Avrameas A, Strosberg AD, Moraillon A, et al. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection based on synthetic peptides from Env glycoproteins. *Res Virol* 1993;144:209-218.
58. Pancino G, Chappey C, Saurin W, et al. B epitopes and selection pressures in feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J Virol* 1993;67:664-672.
59. Pancino G, Fossati I, Chappey C, et al. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 1993;192:659-662.
60. Barr MCC, P.P. ; Roelke, M.E. ; Scott, F.W. Feline immunodeficiency virus infection in nondomestic felids. *J Zoo Wildl Med* 1989;20:265-272.
61. Brown EWORAMJSOBSJ. Exposure to FIV and FIPV in wild and

captive cheetahs. *Zoo Biol* 1993;12:135-142.

62. Letcher J.D. ; O`Conner TP. Incidence of antibodies reacting to feline immunodeficiency virus in a population of Asian lions. *J Zoo Wildl Med* 1991;22:324-329.

63. Olmsted RA, Langley R, Roelke ME, et al. Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. *J Virol* 1992;66:6008-6018.

64. Ochoa Tovar MdL. Kits de diagnóstico utilizados en la Clínica Veterinaria Cihuacóatl México, D.F.; Colonia la Nueva Santa María, Calle Piña #215bis, 2014.

65. Hernández D. Kits de diagnóstico Rápido Utilizados en la Clínica Veterinaria Bastet México, D.F. Vecindario Talaltelolco Calle Lerdo # 304 Edificio Zaragoza Local 12

2014.

66. Zoetis. Witness FIV Insert. *Zoetis™*. Francia, 2013.

67. BioNote IA. One-step Feline Immunodeficiency virus Antibody and Feline Leukemia virus Antigen Test, Insert In: BioNote I, ed. *BioNote, Inc.* Republic of Korea 2013.

68. Crowther JR. *The ELISA Guidebook*. Totowa: Humana Press, 2001.

69. Lee VM, Carden MJ, Schlaepfer WW. Structural similarities and differences between neurofilament proteins from five different species as revealed using monoclonal antibodies. *J Neurosci* 1986;6:2179-2186.

70. Angeletti RH. Design of useful peptide antigens. *J Biomol Tech* 1999;10:2-10.

71. Lottersberger J SJyTG. Evaluación de péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Argentina de microbiología* 2003:149-155.

72. Harper DR. *Molecular virology*. 2nd ed. London, U.K.: Bios scientific

73. Pérez Escoda MT. Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). *Departamento de Química de Péptidos y Proteínas*. Barcelona: Universidad de Barcelona, 2007;45.

74. Fields GB, eds *Methods in Enzymology*: Academic Press, 1997.

75. Hendrickson WAaW, K. . *Macromolecular Structures* Academic Press, 1992.

76. Mayo KH. Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: for the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol* 2000;18:212-217.

77. Bennett MK, Garcia-Arraras JE, Elferink LA, et al. The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 1993;74:863-873.

78. Johannes L, Lledo PM, Roa M, et al. The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J* 1994;13:2029-2037.

79. Stewart JM YJ. *Solid Phase peptide synthesis* Rockford Pierce chemical company, 1984.
80. Hosie MJ, Addie D, Belak S, et al. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009;11:575-584.
81. Yamamoto JK, Hohdatsu T, Olmsted RA, et al. Experimental vaccine protection against homologous and heterologous strains of feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1993;67:601-605.
82. Norris JM, Bell ET, Hales L, et al. Prevalence of feline immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. *J Feline Med Surg* 2007;9:300-308.
83. Westman ME. MR, Hall E, Sheehy PA, Norris JM. Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2015.
84. FORD RB. FeLV / FIV (Proceedings). *CVC in Kansas City proceedings*. Kansas City CVC, 2010.
85. Kiyomasu T, Miyazawa T, Furuya T, et al. Identification of feline immunodeficiency virus rev gene activity. *J Virol* 1991;65:4539-4542.
86. Kolaskar ASTPC.
http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input, 2014.
87. Olmsted RA, Hirsch VM, Purcell RH, et al. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:8088-8092.
88. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 1990;276:172-174.
89. Avrameas A, Guillet JG, Chouchane L, et al. Localisation of three epitopes of the env protein of feline immunodeficiency virus. *Mol Immunol* 1992;29:565-572.
90. Dean GA, LaVoy A, Burkhard MJ. Peptide mapping of feline immunodeficiency virus by IFN-gamma ELISPOT. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;100:49-59.
91. Sibille P, Avrameas A, Moraillon A, et al. Comparison of serological tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection of cats. *Vet Microbiol* 1995;45:259-267.
92. González Fernández VD. Detección en México del virus de inmunodeficiencia felina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Laboratorio de virología, genética y biología molecular México, Estado de México: Universidad nacional autónoma de México, Facultad de estudios superiores Cuautitlán* 2015;67.
93. Kania SA, Kennedy MA, Potgieter LN. Serologic reactivity using conserved envelope epitopes in feline lentivirus-infected felids. *J Vet Diagn Invest* 1997;9:125-129.
94. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic

properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000;43:155-163.

95. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, et al. Automated RIBA HCV strip immunoblot assay: a novel tool for the diagnosis of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2001;21:104-111.

96. El Awady MK, El-Demellawy MA, Khalil SB, et al. Synthetic peptide-based immunoassay as a supplemental test for HCV infection. *Clin Chim Acta* 2002;325:39-46.

97. Hayward JJ, Rodrigo AG. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). *Vet Immunol Immunopathol* 2010;134:68-74.

98. Hayward JJ, Taylor J, Rodrigo AG. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. *J Virol* 2007;81:2999-3004.

99. Levy JK, Scott HM, Lachtara JL, et al. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc* 2006;228:371-376.

100. G. MR. Diagnóstico del virus de la leucemia felina (FeLV) y del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) a través de la prueba de ELISA y correlación con la biometría hemática y posibles hallazgos a la necropsia en gatos enfermos de la ciudad de México México: Facultad de estudios superiores Cuautitlán, Universidad nacional autónoma de México, 1993.

101. Marín Heredia JM, W. Montes de Oca, A. Nuñez, O.L. Determinación de la seroprevalencia de la leucemia viral felina y el síndrome de inmunodeficiencia adquirido felino en gatos de la república mexicana. *WSAVA-FIAVAC-AMMVEPE*. Ciudad de México, 2005.

102. Ortega-Pacheco A, Aguilar-Caballero AJ, Colin-Flores RF, et al. Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. *J Feline Med Surg* 2014;16:460-464.

103. Niewiesk S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol* 2014;5:446.

104. Addie DD, Dennis JM, Toth S, et al. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. *Vet Rec* 2000;146:419-424.

105. Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, et al. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J Feline Med Surg* 2007;9:439-445.



17-3-2016

Lozi

**EACH OF US AT SOME TIME IN OUR LIVES
TURNS TO SOMEONE... AND ASKS...
"WHY AM I HERE? WHAT WAS I MEANT TO
BE?"**

**COMMANDER SPOCK
STAR TREK: TMP**