



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD
ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

USO DE LA TÉCNICA DE PCR PARA CONFIRMAR
EL DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA VIRAL FELINA Y EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS
PRODUCTOS AMPLIFICADOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARCELA AUTRAN MARTÍNEZ

TUTOR:

HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR:

SARA DEL CARMÉN CABALLERO CHACÓN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

HUGO RAMIREZ ALVAREZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Dentro de los principales productos que uno espera obtener al desarrollar una Tesis de Maestría, quizás uno de los más importantes es la ejecución de un Informe que contribuya positivamente a incrementar el conocimiento de la Sociedad en general y al área de interés en particular. Además uno anhela que dicho informe sea capaz de reflejar adecuadamente todos los conocimientos adquiridos durante los años de estudio de posgrado y los esfuerzos que ellos requirieron.

Sin embargo, como en muchas otras actividades de la vida, a las que se le dedica esfuerzo y sacrificio, los productos resultantes suelen brindar otro tipo de satisfacciones más allá de las académicas. En particular, en este caso, he tenido la posibilidad de estudiar, trabajar y socializar con un gran número de personas que de distintas maneras han dejado su marca en mi formación tanto profesional como personal.

Enumerar a todos sería utópico y hasta aburrido. Quisiera entonces dedicar estos párrafos, libres de formatos y estilos elegantes a agradecer a algunos de ellos y esperar que los demás, una vez más, comprendan que su apoyo y ejemplo, han sido y son muy valiosos para mí.

Resumen

Se obtuvo suero, plasma y células mononucleares de 100 gatos clínicamente sanos, los cuales se evaluaron (suero y plasma) mediante la técnica de ELISA Indirecta (ELISAI) y Western blot (WB) utilizando como antígeno una proteína recombinante gp70 (epítotope p45) y el ADN de las células mononucleares se utilizó para detectar ADN proviral por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). 82% de animales fueron seropositivos a ELISAI y 89% por WB. De los sueros evaluados el 14% resultaron negativos y el 1% resultaron ser discordantes entre las pruebas serológicas. La prueba de ELISAI mostró una sensibilidad del 87%, con una especificidad de 88% y un valor kappa de 0.75 con respecto al WB que se utilizó como prueba de referencia. La detección de ADN proviral a partir de células mononucleares de sangre periférica por PCR tuvo una sensibilidad de 92%, una especificidad de 95% y un valor kappa de 0.89. Con estos resultados se concluye que bajo las condiciones de este trabajo, la técnica de PCR es adecuada para el diagnóstico del FeLV. Los productos de la PCR derivados de la amplificación de dos regiones (*pol* y *env*) del virus de la Leucemia Felina fueron secuenciados. El árbol filogenético para la región del gen *pol* ubicó a las 17 secuencias obtenidas con una alta homología con secuencias descritas dentro del grupo de retrovirus endógenos felinos γ -8 y subgrupo recombinante B/C. Las 38 secuencias del gen *env* se situaron como retrovirus endógenos mostrando alta homología con el subgrupo endógeno *enFeLVGGAT*, *enFeLVAAGG* y *CATFELV-P*, sin embargo, las secuencias forman un grupo completamente diferente a las reportadas a nivel mundial.

PALABRAS CLAVE: Western Blot, ELISA indirecta, PCR, *pol*, *env*, provirus, gp70.

ABSTRACT

Serum, plasma and peripheral blood mononuclear cells samples were collected from 100 healthy cats, serum and plasma were evaluated by indirect ELISA (ELISAI) and Western blot (WB) using as a protein a recombinant antigen gp70 (p45 epitope). Mononuclear cell DNA was used to detect proviral DNA by the technique of Polymerase chain reaction (PCR). The test detected 82% of positive animals to ELISAI and 89% to WB. Of the samples tested only 14% were negative and 1% were found to be discordant serology. ELISAI test showed a sensitivity of 87%, a specificity of 88 % and a kappa value of 0.75 with respect to WB that was used as a gold standard. The detection of proviral DNA from peripheral blood mononuclear cells by PCR had a sensitivity of 92 %, a specificity of 95%, and a kappa value of 0.89. With these results we conclude that the PCR technique is appropriate for diagnosis of FeLV in our conditions. PCR products derived from amplification of two regions (*pol* and *env*) of FeLV and were sequenced; the phylogenetic tree for the region of the *pol* gene found that 17 sequences showed high homology to sequences described in the feline endogenous retrovirus group γ -8 and recombinant subgroup B/C. The 38 sequences of the *env* gene as endogenous retroviruses stood showing high homology with the endogenous subgroup *enFeLVGGAT*, *enFeLVAAAGG* and CatFeLV-P, but was found a group particularly different to those reported.

KEYWORDS: Western blot, indirect ELISA, PCR, *pol*, *env*, provirus, gp70.

Índice

Glosario y abreviaturas	67
Introducción	1
Etiología	3
Genoma del virus de Leucemia Felina	4
Subtipos del virus de Leucemia Felina	5
Ciclo de replicación	9
Patogenia	13
Respuesta inmune	15
Signos clínicos	17
Factores de riesgo	17
Diagnóstico	18
Tratamiento	23
Prevención	24
Justificación	27
Hipótesis	28
Objetivo general	29
Objetivos particulares	29
Material y Métodos	30
Resultados	37
Discusión	59
Conclusiones	66
Referencias bibliográficas	93
Anexo (1 al 3)	71, 77, 91

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.

Figuras

Figura 1. Genoma del virus de Leucemia Viral Felina (FeLV)	5
Figura 2. Proteínas estructurales del FeLV	6
Figura 3. Ciclo de replicación	7
Figura 4. Patogenía	13
Figura 5. Signos clínicos	18
Figura 6. ELISA i	39
Figura 7. Western Blot	40
Figura 8. Reactividad a WB	41
Figura 9. Muestras evaluadas mediante WB y ELISAi.	42
Figura 10. Resultados comparativos WB frente a estatus de vacunación	43
Figura 11. Seroprevalencia de ELISAi/WB.	43
Figura 12. Detección de ADN proviral mediante la técnica de PCR.	44
Figura 13. Seroprevalencia en regiones geográficas	45
Figura 14. Resultados de PCR para FeLV por edad	46
Figura 16. ELISAi/WB y PCR correlacionado con el rango etario y el estilo de vida.	47-49
Figura 17. Árbol filogenético de la región <i>env</i> .	50
Figura 18. Árbol filogenético de la región <i>pol</i> .	56

Cuadros

Cuadro1.Retrovirus endógenos (ERV´s)	4
Cuadro 2. Retrovirus exógenos	7
Cuadro 3.Variantes de la técnica de PCR	21
Cuadro 4.Técnicas de diagnóstico	23
Cuadro 5.Tipos de vacunas para la protección frente al FeLV	27
Cuadro 6.Características de los iniciadores	32
Cuadro 7.Valores de sensibilidad, especificidad e índice Kappa	51
Cuadro 8.Resultados de la población en correlación con los factores de riesgo	52
Cuadro 9.Número de gatos en convivencia en un hábitat y su seroprevalencia	53
Cuadro 11. Secuencias del gen <i>pol</i>	54
Cuadro 12. Secuencias del gen <i>env</i>	55

ANEXO 1

Cuadro 11. Densidad óptica para la detección del micrométodo de Bradford	78
Cuadro 12. Parámetros estadísticos de absorbancia de los gatos positivos	82
Cuadro 13. Densidad óptica de gatos de 6-11 meses	83
Cuadro 14. Densidad óptica de gatos de 1-3 años	84
Cuadro 15. Densidad óptica de gatos de 4-8 años	85
Cuadro 16. Densidad óptica de gatos de 9-12 años	86
Cuadro 17. Densidad óptica de gatos mayores de 13 años	87
Cuadro 18. Concentración de reactivos para la PCR de la región genética <i>pol</i>	88
Cuadro 19. Concentración de reactivos para la PCR de la región genética <i>env</i>	90
Cuadro 20. Secuencias genéticas utilizadas para la creación de los iniciadores tomadas a partir de la base de datos internacional GenBank	91 a 94

ANEXO 2

Figura 21. Inmunoelectrotransferencia	79
Figura 22. Transferencia de proteínas	80
Figura 23. Placas de ELISAi	81
Figura 24. Extracción de DNA	87

ANEXO 3

Figura 25. Cromatograma para la región <i>pol</i>	92
Figura 26. Cromatograma para la región <i>env</i>	93

1. INTRODUCCIÓN

Existen mas de 600 mil millones de gatos domésticos a nivel mundial, ^{24,55} en el presente trabajo no se encontró un dato exacto sobre la estimación de la población felina en México, sin embargo en 2012 la población calculada fue de 22 mil millones ^{1,8,9,79}. En 1964 se aislaron y describieron los primeros retrovirus en felinos silvestres ⁷¹. A partir de estos aislamientos de retrovirus felinos de gatos con linfoma (LSA) se desarrollaron técnicas indirectas accesibles para su identificación; posteriormente en 1993 utilizando tejidos, líquidos y sangre se establecieron técnicas como la inmunohistoquímica y PCR. El virus de la Leucemia Felina es considerado como la causa principal de la mayoría de las muertes relacionadas con enfermedad en los gatos y el responsable de diversos síndromes clínicos ⁵⁶. Uno de estos síndromes se relaciona con anemia e infecciones secundarias en los gatos, causadas por el efecto supresor del virus en el sistema inmunológico,⁵⁴ afectando primordialmente al linaje celular de los linfocitos–macrófagos. Aproximadamente un tercio de todas las muertes relacionadas con neoplasias en gatos están relacionadas a la infección por FeLV ⁵⁰. Por otro lado, los datos de seroprevalencia en gatos expuestos al FeLV en diferentes regiones son muy variables. Varios países de la Unión Europea ha reportado datos de seroprevalencia de un 12-15% ⁶⁹. En España se ha descrito seroprevalencia de 35.7% ¹⁰ en Suiza de 39%, (que es mucho mayor a lo descrito en otros países), se encontró un 47.5% de gatos infectados por FeLV²en Brasil utilizando una PCR anidada , y una prevalencia de 12.5 y 20.3% respectivamente ^{81,90,91}. En EE.UU. y Canadá la prevalencia es de 4 a 12.5% ²¹. La prevalencia está en alrededor de un 15% en Japón y es de 10% en Corea ^{6, 7} en la India es de 15.8% y prevalencias bajas en felinos silvestres ^{71,72}. En Oceanía y Africa no se han publicado datos de seroprevalencias en felinos domésticos ²¹. En lugares cerrados donde esta presente el virus de inmunodeficiencia felina y FeLV, este ultimo tiene mayor impacto para permanecer en la población. ⁷². La tasa de

mortalidad es de forma progresiva en infectados por FeLV en hogares con varios gatos y se ha estimado en aproximadamente un 50% en los dos años siguientes a su infección y el 80% en tres años ^{47, 49,72} pero es mucho menor para los gatos restringidos al hogar, lo que representa un factor importante en el control de la enfermedad. Las diferencias en la prevalencia pueden ser explicadas debido a las herramientas diagnósticas utilizadas en cada estudio ⁵³.

En México, mediante signos clínicos y hallazgos histopatológicos se han realizado descripciones de casos sospechosos de la infección por el virus de la Leucemia Felina (FeLV). Adicionalmente, otros estudios realizados en el Distrito Federal, Kanafany 2005 reportó 30% de prevalencia en gatos enfermos evaluados mediante pruebas comerciales de ELISA realizados en 3 laboratorios de la ciudad de México ³⁹, de igual forma en el 2007 Fonseca evaluó tejidos con LSA mediante inmunohistoquímica ²⁷, encontrando 71.4% de positividad al FeLV. En otro estudio realizado en el 2011 en Nayarit se encontró menos del 3% de seropositividad en sangre entera utilizando pruebas comerciales ⁸. En México no se han realizado reportes de aislamiento del virus de Leucemia Felina y el diagnóstico se basa principalmente en la detección de antígeno soluble mediante pruebas comerciales importadas y técnicas de inmunohistoquímica (8, 17, 27,39). En el año 2011 Zagal realizó un estudio preliminar en 87 gatos del Estado de México y el Distrito Federal, en donde encontró una seroprevalencia de 61% mediante la técnica de Western Blot (WB) y 48% de seropositividad utilizando una prueba de ELISA indirecta casera (ELISAi). Posteriormente, en el 2012 Carrión evaluó por la misma técnica 100 muestras de suero de gatos, encontrando 85% de seropositividad con la proteína gp70 del virus ¹⁸.

2. Etiología

El virus de la Leucemia Felina pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Orthoretrovirinae y al género *Gammaretrovirus*. Es un virus ARN de cadena sencilla que presenta la enzima transcriptasa inversa, la cual le confiere la capacidad de codificar ADN a partir de su ARN viral. Posee un genoma de un tamaño aproximado de 9600 bases. El FeLV se puede encontrar como virus exógeno, el cual es 100% infeccioso y transmisible generando enfermedad. Mientras que por otro lado, los retrovirus de gatos denominados como endógenos (ERV) son defectuosos a nivel de replicación viral ^{6,7} se transmiten y son heredados a la progenie a través de la infección interespecie, por lo que representan una huella de infección antigua por retrovirus ⁶⁰. Los retrovirus endógenos se clasifican en tres clases: I, II y III. Los ERV tipo I se relacionan estrechamente con los géneros retrovirales gammaretrovirus y epsilonretrovirus, los retrovirus endógenos tipo II se relacionan con los alfaretrovirus y betaretrovirus y los retrovirus endógenos tipo III se relacionan con los spumaretrovirus ⁴. La posible recombinación entre las diferentes clases de virus da lugar a un amplio rango de hospederos ^{50,51,53}. No existe la generación de viriones infecciosos dentro del grupo de retrovirus endógenos en los gatos, sin embargo, se han aislado un subconjunto de provirus defectuosos que contienen los 3 genes estructurales del FeLV (*gag*, *env* y *LTR*), con una alta expresión en líneas celulares de linfoma y en una gran variedad de tejidos durante ciertos estadios de la enfermedad; tales como condiciones autoinmunes y malignas ^{50, 51,53}. Además, existen provirus defectuosos expresados en los tejidos linfocíticos de gatos sanos y libres de patógenos específicos (SPF) ⁵¹. En general, una amplia diversidad de funciones se han asignado a los ERV, mientras que en algunos ensayos inducen tolerancia inmunológica ⁷¹⁻⁷³, en otros casos se cree que tienen un papel protector mediante la interferencia del uso del receptor vinculado a la infección de las células ^{20,21,24,25} que conlleva a mutaciones en las secuencias virales del gen *env* y esto parece

asociarse a la especificidad de la enfermedad, pero el modo en que la diversidad genética del FeLV contribuye a la generación de dichas variantes en la naturaleza se encuentra escasamente estudiado ^{70,71}. Además, los **retrovirus endógenos** se han integrado en el genoma de las células germinales ^{50,70,71} y constituyen el 10% del genoma total del felino, se encuentran inactivos por el hecho de presentar pérdidas y codones de paro asociados ⁶⁹. Por su capacidad de retrotransposición y recombinación entre ellos, son una fuente importante de remodelación genómica y junto con otros retroelementos participan en la generación de retrogenes y retroseudogenes, que representan un sustrato de variabilidad fundamental para la aparición de nuevas estructuras y funciones ⁶³. Puesto que su actividad responde también a las condiciones ambientales, los cambios genómicos generados por ellos no son graduales, sino que aparecen en oleadas, de modo que se puede producir una variedad fenotípica muy extensa en momentos evolutivos concretos, coincidiendo con situaciones ambientales críticas. Algunos de estos ERV's son capaces de transcribir proteínas relacionadas con la cubierta del virus que bloquearían la entrada a otros retrovirus exógenos ^{36,56}. A la vista de esto, parece clara la enorme importancia que los retrovirus han tenido en la variabilidad genética de las diferentes especies animales y en su evolución ^{2,45,47}. La recombinación puede alterar la dinámica en la genética de los virus exógenos, dando origen a nuevos agentes infecciosos que pueden resultar en virus altamente patógenos ^{72,76}. En el Cuadro 1 se aprecian los principales ERV's descritos en el genoma de gatos.

Cuadro 1. Retrovirus endógenos identificados en gatos

Subtipo	Características	Aislamiento
<i>enFeLV</i> AGTT (AY364319)	6-12 copias por célula haploide.	Trastornos degenerativos y proliferativos
<i>enFeLV</i> GGAG (AY364318)	6-12 copias por célula haploide.	Degenerativos y proliferativos
FA27 (M8998)		Recombinación con subtipo B y C
<i>enFeLV</i> A2 KO (M25425)	Co-expresión en cultivo con células T.	Relación con subtipo T <i>in vitro</i>
RD114 (AF155060)	15-20 copias por célula haploide.	Relación con subtipo FeLV C

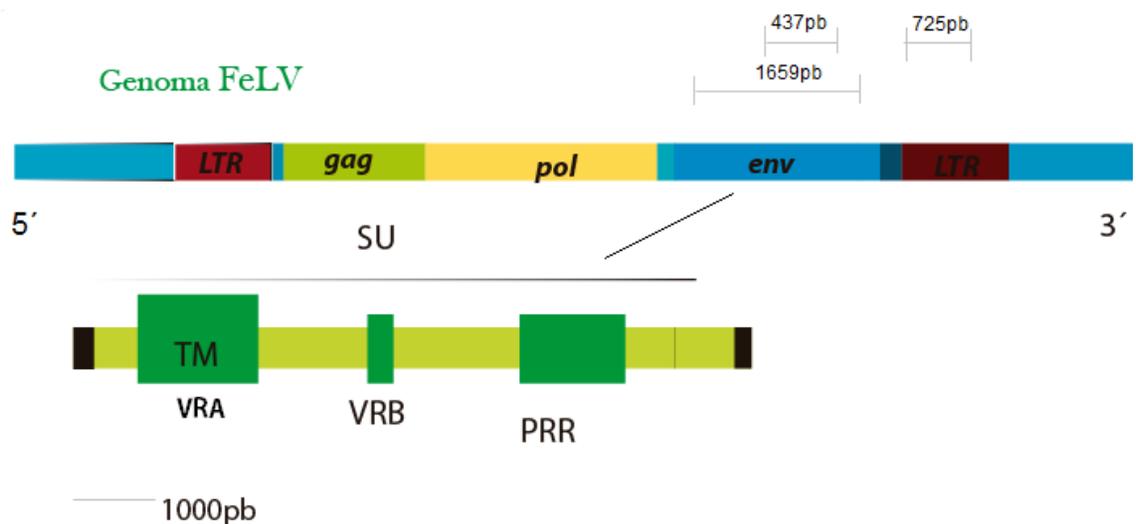
Modificado de Jarret, 1999 ⁸¹

Existen diversos estudios sobre *enFeLV* situados dentro del genoma del gato e identificados en librerías genómicas mediante evaluación con ensayos en las regiones *gag* y *pol* ^{44, 74,75}. Recientemente, se describió el subtipo **FeLV-D** derivado sintético de la variante *env* ERV-DC 10 ⁷⁰.

3. Organización genómica del FeLV.

El virus posee tres genes principales *gag*, *pol* y *env*, el genoma se encuentra flanqueado a los extremos por las *LTRs* (regiones terminales repetidas largas). El gen *gag* (antígeno asociado a grupo) codifica la producción de proteínas estructurales asociadas con el núcleo (p15c, p12, p27, p10), el gen *pol* (polimerasa) codifica las diferentes enzimas que intervienen en la replicación e integración del genoma viral, mientras que el gen *env* (envoltura) codifica las glicoproteínas de la envoltura, la glucoproteína de superficie (SU, gp70) y la proteína de transmembrana (TM, gp15)⁴⁸. En las Figuras 1 y 2 se observa un esquema con los principales componentes del virus²⁰.

Figura 1. Mapa genómico del FeLV



TM: transmembrana

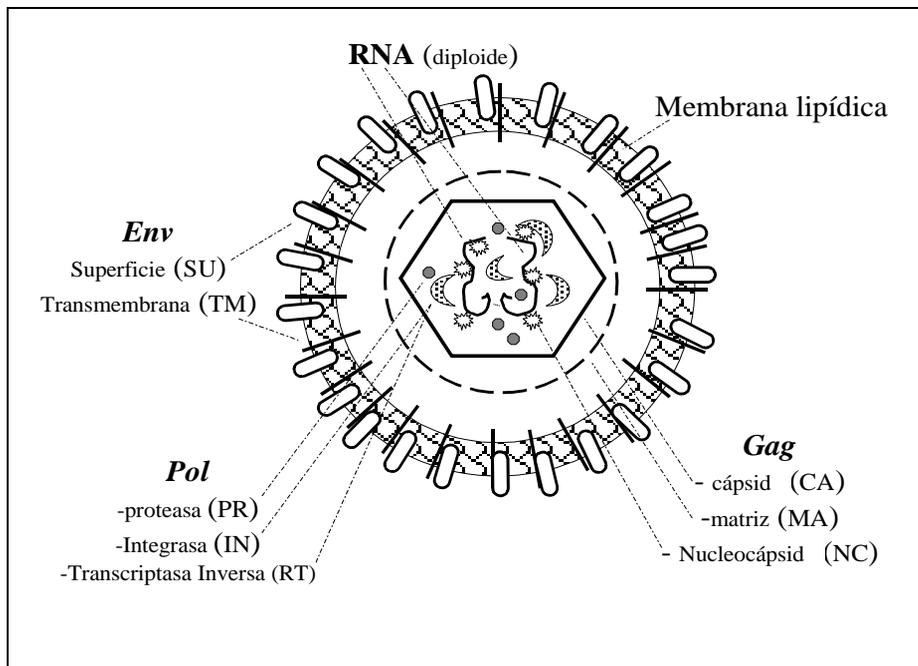
VRA: región variable A

PRR: región rica en prolina

VRB: región variable B

Modificado de Yukari, Anai 2008.⁶⁵

Figura 2. Proteínas estructurales del virus de leucemia felina (FeLV).



Modificado de Palmera, 2010.⁴⁵

4. Subtipos del FeLV

FeLV-A suele ser altamente contagioso, de baja patogenicidad bajo ciertas condiciones y se ha encontrado en todos los gatos infectados. Es restrictivo a un solo hospedero y crece bien en líneas celulares⁶³. En tanto que **FeLV-B** es pobremente infeccioso, puede ser encontrado en 30-60% de los gatos infectados pero solamente asociado con la presencia de FeLV-A^{53,58}. Se ha descrito que **FeLV-C** se asocia con anemia aplásica. Solo el 1% de los gatos es infectado por el FeLV-C. Recientemente el subtipo **FeLV-T**, una variante del subtipo A con tropismo hacia células T, genera un síndrome de inmunodeficiencia en los gatos^{53, 67,74}. En el cuadro 2 se muestra la clasificación de los subtipos de FeLV.

Cuadro 2. Retrovirus exógenos del FeLV.

Subtipos de virus	Frecuencia de aislamiento en gatos positivos a FeLV	Enfermedad relacionada
A	100% de los gatos virémicos	Neoplasia hematopoyética, experimentalmente puede causar hemólisis
B	Recombinación con subgrupo A y <i>enFeLV</i> (Nakamura, 2010) en alrededor de 50% de gatos con enfermedad neoplásica	No es patógeno solo; cuando se encuentra con A puede aumentar la virulencia
C	Mutación en <i>env</i> de FeLV-A Rara vez se aísla; tal vez replicación defectuosa	Anemia no regenerativa
T	Marcado carácter T-linfotrópico.	Induce inmunosupresión grave

Polani 2008, Yukari 2011.^{64,65}

5. Análisis filogenético.

Para estudiar mejor las relaciones genéticas que han tenido y tienen los virus relacionados con la Leucemia Felina, es importante realizar filogenias moleculares, las cuales se basan en la selección, amplificación y secuenciación de regiones. Dichas secuencias son revisadas, alineadas en función de sus homologías y posteriormente analizadas bajo distintos métodos de reconstrucción filogenética. El resultado del análisis bajo los distintos métodos de inferencia, es la construcción de uno o más árboles que representan las relaciones evolutivas, la similitud y divergencia de las muestras analizadas. A partir de estos árboles, si el muestreo taxonómico y de regiones ha sido adecuado, se pueden realizar inferencias sobre las relaciones evolutivas de las especies y las distancias genéticas ^{76,77}. Actualmente, las técnicas de biología molecular son imprescindibles para generar información que permite dilucidar las relaciones entre organismos ^{65, 67,68}. La filogenia se puede representar gráficamente mediante **filogramas**. Un filograma es un árbol filogenético elaborado como producto de un análisis de secuencias. La información está dada por la longitud de las ramas. Los números asociados con cada rama corresponden a un atributo de las secuencias, tal como cantidad de cambio evolutivo. La topología del árbol (patrón de ramificación) y la longitud de la rama reflejan la distancia evolutiva entre las secuencias.

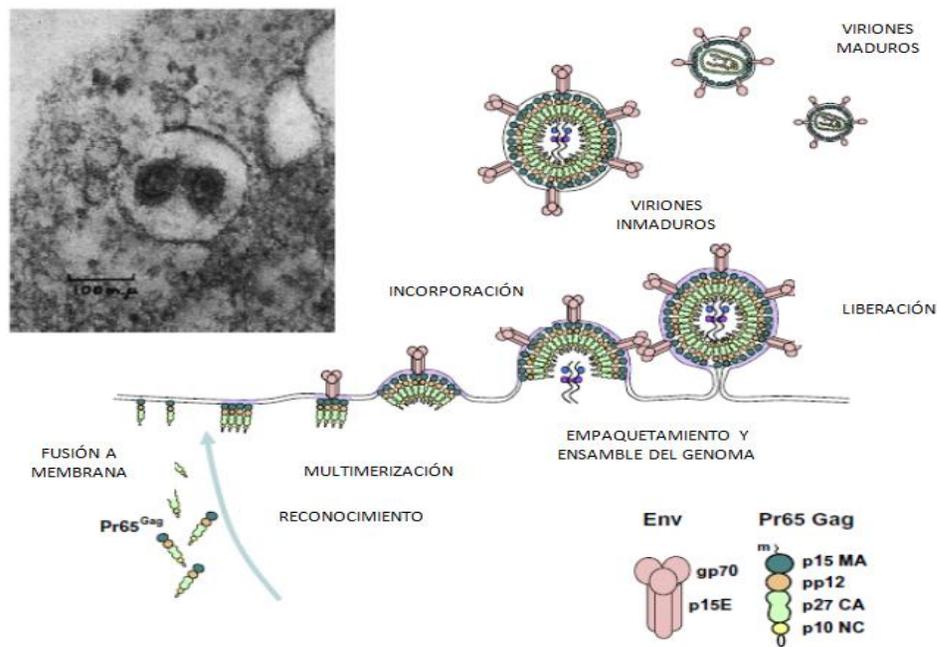
6. Ciclo de replicación

La entrada del FeLV en las células blanco se inicia por la interacción de las glucoproteínas retrovirales y posteriormente se produce la adsorción del virus en la superficie de la célula, la fusión de la envoltura viral y la liberación de la nucleocápside con el ARN vírico sucede en el citoplasma de la célula ^{25, 36, 43, 89,90}. La traducción primaria de los productos derivados del gen de la envoltura (*env*) son procesados a través de la escisión proteolítica en 2 unidades funcionales: la

proteína de superficie (SU; gp70) y la proteína transmembranaria (TM; p15E)^{25,36,59}. El ácido nucleico del virus se transcribe a ADN vírico, posterior a esta transcripción, el ARNm se traduce en poliproteínas que se cortan en proteínas virales maduras antes del ensamble del virus⁷³⁻⁷⁵. Durante la mitosis celular, las células hijas heredan el provirus (ADN vírico integrado) y se producen nuevas partículas víricas. Después el ARN viral se incorpora en el núcleo, se ensambla el virión y sale de la célula por gemación. Por lo general, las células infectadas no son destruidas durante la replicación viral^{58, 60,61}(Figura 3). La información genética de los retrovirus es codificada por un genoma de ARN y la primera etapa en el ciclo de replicación viral implica copiar este genoma ARN en ADN. Este proceso se lleva a cabo por la transcriptasa inversa, la enzima subvierte el flujo normal de las células con la información genética del ADN al ARN hacia la proteína. Una vez que un ADN copia del genoma de ARN se ha sintetizado, asistido por una segunda enzima, la “integrasa”. Este provirus permanece en el genoma de la célula para la duración de la vida de la célula y en la división celular el provirus se expresa conduciendo a la producción de viriones y la eliminación del virus. Esta propiedad única de los retrovirus los hace tan difíciles de erradicar por completo del huésped infectado o permanecer de forma "latente". La infección puede persistir, por lo que el virus permanece integrado en el genoma de las células. En consecuencia los gatos pueden albergar genoma proviral integrado, pero no está claro el papel para la diseminación del virus infeccioso, los gatos están “protegidos” y evitan el desarrollo de viremia y por lo tanto de la enfermedad, pero permanecen infectados. El virus emerge de la membrana de la célula infectada y se somete a la fase final de la maduración con la escisión del antígeno del grupo PR65 (*gag*) precursor en la estructura madura de la matriz de proteínas (p15), de la cápside (p27) y de la nucleocápside (p10). La proteína de la cápside es abundante en el plasma de gatos con viremia y constituye el elemento de identificación en la mayoría de las pruebas comerciales para las clínicas. Sin embargo, su utilidad como un marcador de diagnóstico para FeLV en gatos con viremia sólo es posible porque los gatos no parecen responder serológicamente a la proteína, una observación que ha llevado a la interrogante de que los gatos

pueden ser en gran medida inmunológicamente tolerantes a la p27 a través de la exposición a la forma endógena expresada por *gag*. A medida que los viriones adquieren la envoltura de la glucoproteína *env*, que comprende la superficie y la transmembrana (Figuras 2 y 3). El objetivo de los anticuerpos neutralizantes en los gatos es un componente esencial de las vacunas contra el FeLV, un vacuna recombinante expresada en bacterias de gp70 es el único componente de una vacuna de sub-unidad altamente eficaz⁷¹.

Figura 3. Ciclo de replicación del FeLV



Tomado de Willet; Hosie, 2013.⁶¹

6.1 Transmisión

El FeLV se transmite principalmente por saliva, lo que permite diseminarse debido al acicalamiento mutuo entre gatos o al compartir comederos y bebederos, aunque también puede producirse a través de mordeduras. El contacto social estrecho y prolongado entre gatos también favorece la transmisión. Los gatos virémicos excretan millones de partículas virales de forma constante en la saliva en ocasiones la concentración suele ser más alta que en el plasma^{19, 20, 89,90}.

Otra forma de transmisión puede ocurrir por secreción nasal, lagrimal, por leche, heces, semen, secreciones vaginales y placenta, además, el compartir arenero, contacto sexual y la lactancia son otras posibles formas de contagio. La transmisión por estornudo o tos es poco frecuente. Se han detectado partículas virales a las 3-6 semanas postinfección en la saliva, heces y orina. La pulga del gato (*Ctenocephalides felis*) es considerada una fuente potencial de transmisión. Estudios *in vitro* han demostrado que la pulga puede transmitir el virus por picadura de un gato virémico a uno sano^{20,21}. Se ha detectado ARN del virus tanto en la pulga como en sus heces. Adicionalmente se puede producir la transmisión iatrogénica por uso de material contaminado o por transfusiones de sangre. La transmisión de la madre a sus crías de forma vertical es posible a través de la placenta y posterior al parto, mediante el lamido o la leche. El virus puede atravesar la placenta^{21, 24,25} y producir reabsorción fetal y/o aborto; en gatitos neonatos se presentara debilidad y muerte posparto. Hasta un 20% de los gatos infectados por sus madres sobrevivirán y serán virémicos persistentes^{23, 24,29,35, 79,94}.

La transmisión puede suceder en gatas infectadas (ELISA negativa) ya que la reactivación puede ocurrir durante la gestación y quedar el virus latente exclusivamente en la glándula mamaria. Es posible que los gatitos nacidos de gatas infectadas, tengan resultados negativos en las pruebas de detección de antígeno viral al nacer, pero en cuanto el virus comience a replicarse, después de unas semanas o meses, se podrá detectar el antígeno viral en sangre. Por lo tanto, si la madre o los gatitos están infectados, la familia entera deberá considerarse como infectada y deberá mantenerse aislada de otros gatos hasta diagnosticarse adecuadamente^{33,58}.

6.2 Factores de riesgo en la transmisión del FeLV.

La infección por el FeLV no muestra una predilección por raza, se ha observado una mayor prevalencia en los machos la cual se relaciona con sus hábitos. La edad es otro factor en el que se encuentran diferencias en la susceptibilidad a la

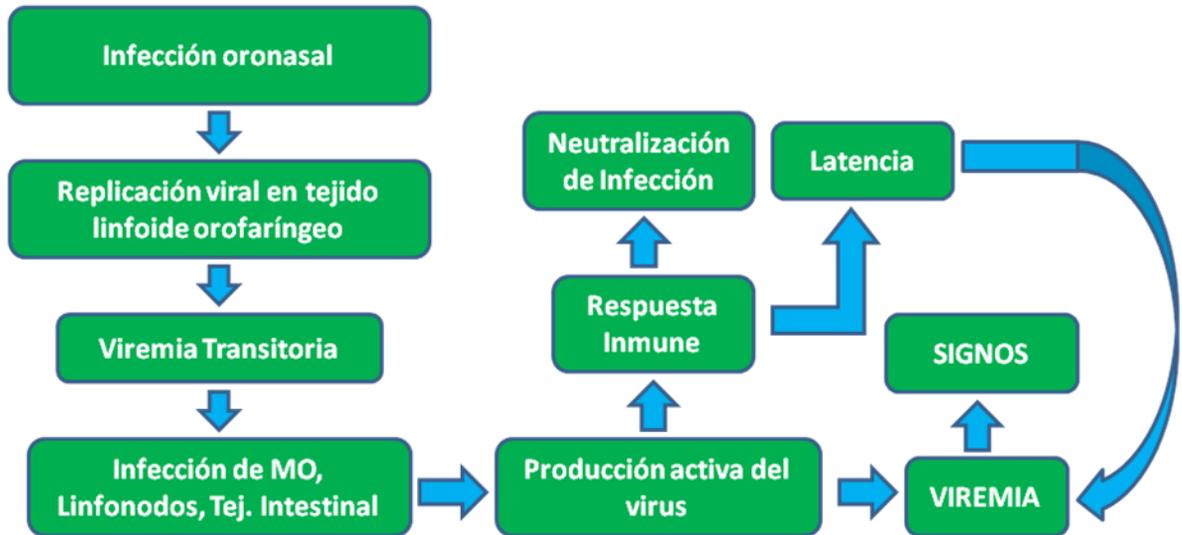
infección, siendo más alta en gatos jóvenes menores de 2 años de edad, se cree que esta susceptibilidad está relacionada con el número de receptores celulares los cuales disminuyen a medida que el gato se hace adulto, lo que hace más difícil que la infección se produzca^{22, 23,34}. Se ha encontrado una prevalencia mayor en gatos que salen al exterior de su lugar de residencia y en gatos sociables, ya que el virus requiere un contacto directo para la transmisión eficaz. Cada vez es menor en Europa y E.E.U.U lo cual está relacionado al aumento en la vacunación y el control con pruebas de laboratorio^{22, 23,82}.

7. Patogenia

La replicación inicial ocurre en tejidos de la orofaringe, específicamente en linfocitos y macrófagos tonsilares. En aquellos gatos donde la respuesta inmune (RI) no es adecuada, el virus se disemina mediante los linfocitos y monocitos infectados en la sangre, desde la oro faringe hasta el timo, bazo, linfonodos, y glándulas salivales donde se replica, esta es la fase virémica. El ciclo inicial de replicación ocurre entre las 3-16 semanas, pero en algunos casos puede durar hasta un año⁵⁸ Figura 4.

La fase de viremia ocurre pocos días después de la infección y se observarán signos clínicos inespecíficos como depresión, fiebre y anorexia. La duración de los signos es variable dependiendo del estado inmunológico del gato, la dosis vírica y la presencia de enfermedades concurrentes^{2,3}.

Figura 4. Patogenía de la infección del FeLV



Modificado de Hoffman-Lehmann, 1995. ²²

Se cree que en la presentación de cuadros neurológicos pueden estar implicadas nuevas variantes neurotrópicas, más adaptadas a las células del sistema nervioso y que incluye la participación de la glucoproteína de envoltura gp70, la cual presenta un carácter marcadamente neurotóxico, al aumentar las concentraciones de calcio intracelular en las neuronas que infecta ^{50,51,53,54}.

7.1 Oncogénesis

El FeLV al ser un virus oncogénico se relaciona con la generación de diversos tumores en los gatos como leucemia y linfoma ⁵⁰. Se han descrito 2 mecanismos por los cuales se pueden producir neoplasias. El primero es la inducción de oncogenes celulares y el segundo por adquisición de oncogenes por recombinación con material genético celular y la formación de virus recombinantes como el subtipo B de FeLV y FeSV (Virus del Sarcoma Felino). Los oncogenes mas habitualmente implicados en los linfomas por el FeLV son el *c-myc*, *flvi-1*, *flvi-2* (que contiene el *bmi-1*), *fit-1*, *pim-1* y *flit-1* ^{25, 36, 59}.

La patogenicidad del virus se debe principalmente a factores ligados a sus *LTR*'s ya que son potentes factores de transcripción capaces de activar los genes adyacentes a las regiones donde se inserta el provirus. Esta acción al parecer se frena en presencia de los anticuerpos ANTI-FOCMA que reconocen este antígeno alterado que se expresa en las células neoplásicas o transformadas por FeLV, aunque aún no está del todo claro el papel protector de estos anticuerpos ^{23,24,43-45}.

8. Respuesta Inmune

Una vez que el gato es infectado por el virus de la Leucemia Felina, el inicio de una respuesta inmune antiviral es orquestado por los Linfocitos T cooperadores (LTh). Dependiendo de la vía de entrada del virus en el organismo, se modulará la concentración de los antígenos derivados de la RI y la afinidad de los péptidos derivados de estos antígenos por el CMH y el TCR. Se han descrito 2 perfiles de respuesta: la respuesta Th1 y la respuesta Th2. Tras haber reconocido el péptido viral como extraño, el linfocito Th se diferenciará hacia un perfil de respuesta Th1, produciendo interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) e interleucina 2 (IL-2); o hacia un perfil Th2 produciendo IL- 4, 5, 6, 9 y 10 ⁶¹. En el caso de Th1 se estimulará la diferenciación de los precursores de los linfocitos T citotóxicos (Pre-LTc) a LTc maduros. Si la respuesta es Th2, se producirán linfocitos B que se diferenciarán a plasmocitos y a la producción de anticuerpos ^{61, 62,72}. Los complejos CMH-I/péptido son reconocidos por linfocitos T que junto a su TCR coexpresan moléculas CD8+ (fundamentalmente LTc). Este reconocimiento

induce una respuesta citolítica que lleva a la lisis de la célula presentadora del péptido (célula blanco) ^{18, 29,31}. Los complejos CMH-II/péptido son reconocidos por linfocitos T que expresan moléculas CD4+ (fundamentalmente LTh) lo que activa la producción y la liberación al medio de citocinas ^{58, 60,61}.

Los anticuerpos que se producen inicialmente frente a la infección se dirigen contra proteínas de la envoltura viral (entre ellas la gp70) y posteriormente se producen anticuerpos contra la cápside (gp27), siendo éstos los más importantes ya que son neutralizantes y capaces de bloquear la entrada del virus a la célula, impidiendo la unión de las glucoproteínas víricas a los receptores celulares. Se ha detectado formación de complejos inmunes circulantes en gatos infectados que podrían contribuir a las lesiones y signos clínicos que se observan en las enfermedades inmunomediadas asociadas a la infección ^{17,18}. La inmadurez de la respuesta celular podría explicar la mayor susceptibilidad de los gatos en el primer año de vida ¹⁹⁻²¹.

Los principales tipos de respuesta inmune en la práctica clínica que se presentan en un gato con infección por el FeLV ^{2,3} son los siguientes:

Gato inmunocompetente (infección abortiva). La respuesta inmune humoral y celular del hospedador cuando es efectiva y duradera (20-30% de los casos), la infección quedará restringida a la cavidad oronasal y el virus no se diseminará sistémicamente. Por lo cual nunca se llegará a determinar mediante pruebas serológicas ^{58, 60,61}.

Gato regresor (virémico transitorio). En un 30-40% de los casos, la viremia puede durar menos de 3 semanas, se denomina viremia transitoria. Será contagioso para otros de su especie, pero finalmente será capaz de eliminar la viremia y la infección. Hasta en un 10% de estos gatos, con técnicas diagnósticas más sensibles como la PCR de ADN/ARN en sangre, es posible encontrar provirus integrado en linfocitos o monocitos circulantes ^{58, 60,61}.

Gato virémico persistente (30%). La viremia persistente dura más de 3 semanas. Y generalmente el gato ya no será capaz de eliminar la infección. El

virus podrá infectar las células de la médula ósea (MO). Los jóvenes o inmunodeprimidos tienen un mayor riesgo de desarrollar este tipo de viremia^{2,9,10}.

Gato discordante o infección atípica (5-10%). Son infecciones que no siguen el patrón típico de la patogenia por el FeLV. El virus no se replica en sangre ni en MO y permanece latente, provocando resultados discordantes o alternantes en pruebas por ELISA. El virus puede mantenerse exclusivamente en algún órgano como vejiga, ojos y tejidos glandulares, por una RI parcialmente eficaz^{67,68}.

Gato portador latente en médula ósea. Algunos gatos son capaces de eliminar el virus de la sangre, pero no de la MO; la base molecular de la latencia es la integración de una copia del genoma viral (provirus) en los cromosomas del ADN celular, donde se mantiene como provirus durante toda la vida de esta célula. Es posible que líneas celulares completas de la MO contengan ADN proviral del FeLV, pero este ADN no se transcribe o traduce en proteínas y no se producen partículas virales infecciosas. Por lo tanto, solo en esa etapa no son infecciosos para otros gatos^{33, 35,43}. Durante las infecciones latentes, al no producirse partículas víricas no se observan signos clínicos, pero excepcionalmente el provirus (mediante las secuencias LTR's del genoma) puede interrumpir e inactivar genes de las células infectadas y provocar mielodisplasias o la formación de neoplasias hematopoyéticas⁵⁸⁻⁶⁰. Solo mediante biopsia de MO se puede detectar este tipo de infección. En algunos estudios se ha observado que el estado de latencia ocurre tanto en gatos vacunados como en no vacunados con posterior exposición al FeLV⁶¹⁻⁶³.

En alrededor del 30% de los gatos infectados con el FeLV la expresión vírica puede revertir y progresar a la infección hasta acabar en la muerte del animal^{15,16}. El subtipo FeLV-T en combinación con el subtipo FeLV-A puede producir una marcada inmunosupresión, al infectar tanto los linfocitos TCD4+, TCD8+ y linfocitos B en sangre, linfonodos y granulocitos. Esta diseminación vírica masiva puede comprometer la RI de una forma muy severa, provocando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida^{58,59}.

9. Signos clínicos

Los cuadros clínicos que se observan en la infección por FeLV son variables y dependen del subtipo genético infeccioso, por lo que es posible que los gatos presenten inmunosupresión, trastornos hematopoyéticos y una amplia variedad de alteraciones neoplásicas^{23, 24, 53, 54,91}. Los diferentes trastornos observados en la infección por FeLV se pueden dividir en 4 grupos principales, los cuales se muestran en la Figura 5⁶¹.

Figura 5. Signos clínicos principales relacionados a la infección con el FeLV



Modificado de O'Brien, 2012.⁴³

En promedio un 20% de los gatos con infección persistente por el FeLV desarrollan neoplasias linfoproliferativas (linfomas y leucemias linfocíticas) o mieloproliferativas. Algunos estudios han demostrado que un número significativo de gatos (más de 25%) con linfoma y serológicamente negativos al FeLV, resulta positivo a PCR a partir de ADN derivado del tejido neoplásico, lo que demuestra una infección latente. Por lo tanto, en gatos sin replicación viral activa, no se puede descartar el papel del virus en la formación de neoplasias^{38, 39,41}. Otros cuadros clínicos que se pueden presentar son los relacionados con alteraciones en la reproducción, neurológicas, oculares, osteocondromas, neuroblastomas, linfadenopatías, gingivoestomatitis, enteritis, enterocolitis, síndrome del gatito apagado y afecciones cutáneas^{2, 3,18}.

10. Diagnóstico

Los signos clínicos, las alteraciones hematológicas y los largos periodos subclínicos en los gatos que acompañan a la infección por el FeLV son insuficientes para un diagnóstico certero de la infección. Por consiguiente, es necesario recurrir a diversas técnicas diagnósticas para confirmar la infección. Además, el FeLV puede permanecer en latencia en la MO o en algún órgano o tejido, dificultando el diagnóstico^{2, 3,18}. Los métodos utilizados para reconocer las infecciones pueden clasificarse en **directos e indirectos**, según persigan demostrar la presencia del virus o de alguno de sus constituyentes (antígeno, genoma viral) o bien la respuesta de anticuerpos específicos por parte del huésped en el curso de la infección⁷⁸.

Las técnicas utilizadas en el diagnóstico se basan en pruebas serológicas que identifican componentes específicos, en especial proteínas antigénicas^{18, 36,87}. En algunas infecciones virales es posible detectar la presencia de antígenos virales previos al desarrollo de la seroconversión, siendo este hecho la única evidencia de la exposición al virus cuando no existe aumento de anticuerpos circulantes (gatos inmunodeprimidos). De igual forma, la detección del genoma viral puede favorecer la precocidad del diagnóstico viral y su confirmación. En la última década se han

desarrollado una serie de técnicas para el diagnóstico viral basadas en la detección de ácidos nucleicos^{9, 10}. Entre estas técnicas se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual ha sido la más utilizada. En la actualidad, la tendencia en el diagnóstico virológico consiste en emplear nuevas y más sensibles tecnologías de detección de antígenos y de ácidos nucleicos, con el propósito de lograr un diagnóstico viral más rápido¹⁵. En las técnicas inmunodiagnósticas es indispensable determinar sensibilidad y especificidad que permiten realizar inferencias a partir de los resultados y nos permiten establecer la confiabilidad de la prueba de diagnóstico. La sensibilidad determina los verdaderos positivos y la especificidad determina los verdaderos negativos^{42,43,45}.

10.1 Métodos directos

Al identificar antígenos permite diagnosticar la infección activa, utilizando técnicas como ELISA directa cuyo fundamento se basa en la detección de una o varias fracciones del virus⁹

Aislamiento viral. Representa la técnica estándar de referencia, sin embargo, la infraestructura necesaria y el tiempo de obtención es muy largo y laborioso¹⁵.

Amplificación de ácidos nucleicos virales mediante PCR. Tiene una sensibilidad elevada y detecta ADN proviral, permitiendo obtener grandes cantidades de una secuencia de ADN a partir de un número reducido de moléculas. La detección permite determinar la infección de forma definitiva.³⁵⁻³⁸. En el cuadro 3 se muestran los diferentes tipos de PCR que se pueden realizar para diagnosticar la infección por el FeLV.

Cuadro 3. Variantes de la técnica de PCR para el diagnóstico del FeLV

TÉCNICAS DE PCR	
PCR anidada	Amplifica el ADN de una 1ª PCR en una 2ª fase
RT-PCR	Copias de cADN. Utiliza la enzima retrotranscriptasa a partir de ARNRNA viral
PCRq o Tiempo real	Cuantitativa. Detección y cuantificación del provirus.

Tomado de Jarret, Cattori 2007. ⁸¹

La detección de ADN proviral mediante la técnica de PCR en los linfocitos de sangre periférica permite el diagnóstico de la infección por el FeLV, en los casos que no existe viremia, pero no siempre significa que el gato vaya a desarrollar alguna enfermedad asociada al virus. Esta técnica es especialmente útil en el caso de infección latente en la MO, donde no existe replicación vírica, o en los casos en los que existe en muy poca cantidad. Si el gato presenta una infección latente y no es virémico, las muestras de MO, y aspirados de linfonodo y de neoplasias son las más indicadas para realizar esta técnica de PCR, ya que dan resultados más fiables que las muestras de sangre ^{50, 51, 53,54}. Otra variante de la técnica de PCR es la PCRq o en tiempo real, se emplea para la cuantificación y detección de secuencias genéticas blanco. Este método posee la ventaja de la cuantificación viral del ADN de entrada, la utilización de bajas cantidades de ADN, la evaluación rápida de innumerables muestras y el bajo riesgo de contaminación. Algunos ensayos de PCR cuantitativa para el FeLV se encuentran disponibles ³⁵, pero tienen sus limitaciones por ejemplo; no reconocen todos los subtipos o secuencias del FeLV ^{62-65,67}.

Microscopía electrónica. Hace posible observar la morfología de los viriones presentes en muestras clínicas, sin embargo, para el diagnóstico del FeLV no es frecuente su uso ^{64, 65}.

10.2 Métodos indirectos

Son aquellos que reconocen la respuesta inmune (humoral o celular) por parte del huésped, mediante la detección y producción de anticuerpos específicos ^{36, 39,87}. En el curso de una infección varían las poblaciones de anticuerpos frente al agente infectante ^{18,45-47}. En una primera fase la clase predominante suele ser IgM, mientras que con el transcurso del tiempo las IgM disminuyen hasta desaparecer o quedar a baja concentración residual, y en cambio, aumentan las IgG. La búsqueda de anticuerpos clase IgM es de utilidad para hacer diagnóstico de infecciones recientes ^{4, 5, 53,54}.

Detección de anticuerpos: determina la presencia de las diferentes inmunoglobulinas presentes en suero mediante la técnica de ELISA indirecta. La prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas se basa en la utilización de anticuerpos que han sido unidos a enzimas, los cuales al ponerse en contacto con un sustrato para detectar la reacción antígeno-anticuerpo por medio de un método visual (diferencias en la coloración) o por medición de la densidad óptica. Se ha descrito el uso para esta prueba en proteínas recombinantes de la cápside y transmembrana ¹⁵.

Algunos estudios han demostrado que los gatos infectados por el FeLV dan positivo a antígeno mediante ELISA directo a partir de los 28 días posinfección ^{36, 91,94}.

Inmunofluorescencia indirecta. Esta técnica requiere sólo de 2-4 horas y se ha reportado una sensibilidad del 70-80% comparada con el aislamiento del virus en cultivos celulares ^{20,21}.

Western blot (WB). Se basa en la separación electroforética de proteínas virales son posteriormente inmovilizadas en un papel de nitrocelulosa con el objeto de determinar la presencia de anticuerpos específicos contra cada una de esas proteínas^{37, 38,40}.

Radioinmunoensayo (RIA). Tiene una buena sensibilidad y especificidad, pero la aparición de los métodos inmunoenzimáticos (EIA) como el ELISA; tienen la ventaja de un mayor tiempo de conservación de los reactivos, su costo relativamente más bajo y la ausencia de residuos radioactivos, con lo que han reemplazado las técnicas de RIA en la mayor parte de los casos de detección de antígeno viral^{4, 53,54}.

En el cuadro 4 se resumen las técnicas diagnósticas (métodos directos e indirectos) más comunes para detección de la infección por el FeLV, las cuales se basan en la detección de antígeno y anticuerpos, mediante el uso de suero y/o plasma, también en la detección de ácido nucleico integrado o bien el aislamiento del virus⁷⁸.

Cuadro 4. Técnicas de diagnóstico para detectar la infección por el FeLV⁷⁶.

Pruebas Diagnósticas	Detección	Muestras
ELISA	p27	Suero, Plasma, Lágrimas o Saliva.
Inmunofluorescencia	p27	Granulocitos.
Titulación de anticuerpos	Anti-gp70 y anti-FOCMA	Suero o Plasma.

En general las pruebas comerciales detectan antígeno viral y no anticuerpos, por lo tanto, no interfiere con el diagnóstico en gatos vacunados^{18,57-59}. Los resultados discordantes son resultados conflictivos obtenidos entre las diferentes pruebas, comúnmente entre las pruebas serológicas (detección de anticuerpos) y las que

detectan el ácido nucleico (detección del material genético del virus). Las discordancias pueden producirse como consecuencia de la etapa de infección, en infecciones latentes o por las mismas limitaciones de cada técnica diagnóstica ³⁵⁻³⁸.

11. Tratamiento

Hasta el día de hoy no existe un tratamiento curativo para la enfermedad de Leucemia Felina. Solo se pueden usar alternativas que aumenten la calidad y esperanza de vida. Es importante instaurar un tratamiento de soporte adecuado en cuanto se observen signos clínicos de enfermedad concomitante. En gatos infectados con el FeLV que presentan anemia no regenerativa, la transfusión de sangre será una parte muy importante del tratamiento, la mayoría de los gatos responde después de la primera transfusión ^{58, 60,61}.

La administración de eritropoyetina (EPO) puede ser útil en algunos casos, aunque en la mayoría de los gatos con anemias secundarias por el FeLV, la concentración de EPO supera los valores normales y también aumenta el número de plaquetas y megacariocitos. En algunos casos, la administración ayuda a la resolución de la anemia, sin embargo, en el 25-30% de los gatos se desarrollan anticuerpos contra la EPO, por lo que habrá que valorar los posibles beneficios antes de la administración ⁶⁷.

El uso del interferón omega Ω , e interferones tipo I (IFN) dada su actividad antiviral no específica, participan en la mayoría de los mecanismos de defensa innatos contra infecciones virales. Su administración se ha propuesto para el tratamiento de varias enfermedades virales e inmunomediadas como una terapia inmunomoduladora. En estudios diversos se demuestra que puede mejorar drásticamente la condición clínica de los gatos infectados e inducir la mejora de los parámetros hematológicos ²³.

12. Prevención y control

Experimentalmente se ha demostrado que los gatitos susceptibles podrían estar protegidos contra la infección del FeLV, teniendo títulos elevados de anticuerpos IgG, IgM, citocinas e interferón frente al virus. La mayoría de los gatos que

superan una viremia del FeLV, posteriormente presentan elevados títulos de anticuerpos neutralizantes. Además, se ha observado que los linfocitos T citotóxicos *in vitro*, disminuyen la carga viral en los gatos virémicos^{69, 71,72}. Las variaciones geográficas en la frecuencia del FeLV pueden tener influencia sobre la decisión de vacunar contra el FeLV. En algunos países europeos, el FeLV ha sido ampliamente erradicado, pudiendo existir considerables variaciones locales en su abundancia entre los distintos países donde el virus sigue siendo un tema de preocupación sanitaria. En caso de duda, el FeLV debe incluirse en el programa de vacunación⁵⁷⁻⁵⁹. Las vacunas eficaces suponen una muy buena protección frente a la infección mortal, y los beneficios para la mayor parte de los gatos superan considerablemente cualquier riesgo de efectos secundarios. Será necesaria la vacunación en los casos donde la posibilidad de una exposición futura al FeLV no pueda rechazarse por completo^{12,13}. Se recomienda iniciar la primovacunación mediante 2 dosis vacunales:

La primera dosis a gatitos de 16 semanas de edad. La segunda dosis de 18 semanas de edad. Se recomienda vacunar al año de la primovacunación, con una dosis única y posteriormente revacunar anualmente si el gato vive en un ambiente de riesgo⁵⁻⁷. A diferencia de otras vacunas, no se ha determinado la eficacia de una sola vacuna contra FeLV. Por tanto, el valor de vacunación frente a FeLV es cuestionable si solo se puede administrar una dosis, como en los programas de captura-castración-liberación de gatos silvestres^{8,9}.

Es muy importante examinar a los gatos frente a FeLV, antes de la vacunación inicial y realizar segunda prueba, a los 2 meses, ya que existe un periodo de incubación para que la viremia de FeLV, sea detectable en sangre⁴⁹.

La duración de la inmunidad depende de factores como el estado inmune del gato, el entorno en el que habita y la presión infecciosa del ambiente. Estos parámetros pueden ser difíciles de evaluar para cada gato. La vacunación frente a FeLV deberá realizarse en felinos con un riesgo potencial a la exposición del virus. La prevalencia de FeLV en cada región geográfica también influirá a la hora de

decidir si se vacuna frente a FeLV ^{12,13}. Hay que tomar en cuenta que las circunstancias bajo las que viven los gatos pueden cambiar rápidamente, haciendo que un animal que no estaba anteriormente bajo riesgo de infección por FeLV se encuentre ante una posible exposición. La vacunación de los gatitos es muy recomendable, ya que tienen más probabilidades de desarrollar infecciones progresivas que los adultos en caso de exposición ²¹⁻²³.

Los gatos infectados antes de la vacunación no obtienen ningún beneficio al vacunarlos frente a FeLV. Ésta no cambia el estado de portador a la capacidad de infectar otros gatos o al desarrollo de la enfermedad en gatos infectados previamente. En el caso de la vacunación en gatos infectados con FIV, deben ser vacunados si viven en un ambiente de riesgo o si salen al exterior (18-20). En gatos con la enfermedad subclínica, la revacunación deberá hacerse de forma más frecuente en felinos negativos a FIV, ya que la duración de la inmunidad puede ser menor. En el caso de gatos inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas en un proceso de reactivación de la enfermedad no deben ser vacunados, si la enfermedad permanece estable, y tienen riesgo de ser infectados por FeLV, deben vacunarse ^{14, 15,35}.

No se recomienda la vacunación en gatos en tratamiento con corticoesteroides o inmunosupresivo ya que interferirán o suprimirán una correcta respuesta inmune ³⁵

En el manejo de los gatos infectados por FeLV deberán esterilizarse y evitar que salgan al exterior, para prevenir un posible contagio de otras enfermedades, a la vez que evitamos el contagio de FeLV a otros gatos ²¹⁻²³. Se deben tomar en cuenta medidas de prevención y cuidado integral posterior al diagnóstico de infección por el virus: aislamiento, esterilización, plan de revisión, cirugía y hospitalización si lo requiriera, vacunación y desparasitación ^{28,29}.

Las vacunas disponibles hoy en día para prevenir la infección del FeLV en México, son recombinantes y de subunidades. Las mejoras que se buscan en las vacunas para el FeLV se basan en incrementar la inmunidad local para mucosas, disminuir la replicación vírica en caso de infección y disminuir el riesgo de desarrollar

latencia en los gatos vacunados ^{75,76}. En el cuadro 5 se describen las características y tipos de vacunas que se han desarrollado para el FeLV.

Cuadro 5. Tipos de vacunas desarrolladas para proteger contra la infección por el FeLV.

Vacunas inactivadas	Son vacunas que utilizan virus inactivado.
Vacunas de subunidades	Constituidas por proteínas virales purificadas.
Recombinantes o de ADN	Son vacunas en las que el vector viral, permite la expresión de los genes víricos en el hospedador y se expresan en la superficie de las células infectadas unidas al CMH-1.
Vacunas de virus activo atenuado	No se utilizan hoy en día, son vacunas con virus atenuado y pueden revertir a su virulencia en el hospedador.

Tomado de Palmera, 2010.⁶⁷

Los estudios disponibles utilizan vías de inoculación distintas a las de la infección natural. No es factible evaluar la protección frente a otras cepas que no sean la que está incluida en la vacuna. Además, no existe una correlación clara entre concentración de anticuerpos detectados y grado de protección, aunque exista seroconversión semanas después de exponer el virus patógeno a gatos vacunados ^{75,76}

13. JUSTIFICACIÓN

En México no se tiene información y datos fehacientes de la incidencia y prevalencia de la infección y/o enfermedad de FeLV. Así mismo se desconocen los genotipos virales existentes que están relacionados con la infección en los gatos domésticos. El diagnóstico se realiza utilizando pruebas comerciales importadas, las cuales detectan antígeno a partir de muestras de sangre completa, suero, plasma y saliva. La constante población de felinos demanda opciones de diagnóstico a enfermedades. Por lo que es necesario generar mayor información para mejorar las técnicas y conocer la genética viral con el fin de valorar las vacunas existentes.

14. HIPÓTESIS

El uso de herramientas moleculares permite detectar un mayor número de animales infectados en comparación con técnicas serológicas. Adicionalmente, se puede identificar las variantes genéticas del virus de FeLV.

14.1 OBJETIVOS GENERALES

Detectar la presencia del virus de Leucemia viral felina en células mononucleares de gatos clínicamente sanos utilizando la técnica de PCR y valorar su eficacia de detección de la infección correlacionándola con pruebas serológicas.

Ubicar filogenéticamente las secuencias obtenidas por PCR.

14.2 Objetivos Particulares Diseñar iniciadores que se unan a regiones específicas de los genes *pol* y *env* del FeLV

Estandarizar y validar la prueba de PCR para detectar ADN proviral a partir de células mononucleares de gatos clínicamente sanos.

Evaluar la sensibilidad, especificidad y valor kappa de la técnica de PCR con respecto a técnicas serológicas (ELISA indirecta y Western Blot).

Realizar análisis filogenético de los productos amplificados obtenidos mediante PCR.

13. METODOLOGÍA

13.1 Población de estudio. El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM Campo 4. La colección de muestras se realizó durante el periodo de enero del 2012 a enero del 2013.

Una población de 100 gatos con características heterogéneas fue el grupo de estudio. Las muestras fueron obtenidas en colaboración con clínicas veterinarias particulares (12), el hospital de pequeñas especies de la FESC (5) y de gatos directamente remitidos al laboratorio (83). Los gatos al momento del muestreo no presentaron signos clínicos sugestivos de la infección por el virus de Leucemia Felina y se generó un expediente clínico de forma individual, sin embargo durante el periodo de muestreo 14 gatos de la población manifestaron signos clínicos.

13.2 CICUAE. La propuesta de estudio fue evaluada por el Comité interno de uso y cuidados para los animales de experimentación de la FESC, siendo aprobado con la clave C13_06.

13.3 Muestras: La obtención de muestras de suero y plasma fue a partir de la colección de sangre por venopunción de la vena radial o yugular, utilizando tubos al vacío sin aditivo (Venoject II Plain clot activator disc®) y tubos con EDTA como anticoagulante (K2 EDTA 7.2 mg) (BD Vacutainer®). Para la separación del suero o plasma de las muestras de sangre se utilizó una centrifuga marca Rolco, Modelo MS-6R, en donde se colocaron los tubos con sangre y fueron centrifugados a 1000 g durante 15 minutos y posteriormente se obtuvo el sobrenadante correspondiente, las muestras fueron conservadas en tubos Eppendorf estériles a -20°C hasta su uso posterior.

13.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica. A partir de las muestras de sangre colectadas en tubos con anticoagulante fueron separadas las células mononucleares (CMN). Las muestras fueron rotuladas y almacenadas en tubos Eppendorf estériles con PBS a -20°C hasta su uso posterior.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

13.5 Diseño de iniciadores. Para el diseño de los iniciadores a utilizar en la PCR, se usaron los programas bioinformáticos BioEdit³⁰ y Primer3 input (versión 0.4.0),⁷⁷ y secuencias nucleotídicas de genomas completos del FeLV disponibles en la base de datos del GeneBank con los siguientes números de acceso: ABO06732 (FeLV 33, Japón), AFO52723 (FeLV Rickard Subgroup A, USA), M18247 (FeLV Subgroup A, FeLV-FAIDS USA), AY364318 (FeLV A1 endogenous FeLV-AGTT, USA), AY364319 (FeLV A2 endogenous FeLV-GGAG, USA) y AB672613 (clone pJ7E2 Japón). Para asegurar la amplificación de la mayor cantidad de muestras con regiones variables en la zona donde se unirían los iniciadores, estos fueron diseñados utilizando posiciones degeneradas y además, se tomó en cuenta en el diseño que los iniciadores se ubicaran en los genes representativos del genoma del virus

Cuadro 6. Características de los iniciadores diseñados para unirse a los genes de *env* y *pol* del FeLV

Nombre del iniciador	Secuencia	Longitud	Producto esperado	TM
MAR <i>env</i> Fw FeLV	TAYTGGGCCTGTAACAYG	19 pb	<i>env</i> 508 pb	60.2°C
MAR <i>env</i> Rv FeLV	CGCTGTTTTAGTCTTTCTCTTA	22 pb		57.1°C
Fw <i>pol</i> FeLV	GCYAMCCRTTATTRGGDAGAGA	22 pb	<i>pol</i> 790 pb	59.3°C
Rv <i>pol</i> FeLV	CCAGCAAGAGGTCATCTACA	20 pb		60.4°C

13.6 Extracción de ADN: Para la obtención de ADN proviral a partir de CMN, se utilizó el kit comercial Favorprep de FAVORGEN® siguiendo las instrucciones del proveedor. La cuantificación de ADN obtenida se realizó con un espectrofotómetro (Eppendorf®) y las muestras se conservaron en tubos Eppendorf estériles a 4°C hasta su uso.

13.7 Estandarización de la técnica de PCR. La estandarización se estableció para los dos pares de iniciadores específicos diseñados para unirse a los genes *pol* y *env* del FeLV. La mezcla de reacción para las PCRs fueron: Buffer 1X (Invitrogen®), 1.5 mM de MgCl₂ (inVitrogen®), 225 µM de DNTP's (MP Thermoscientific®), 600 nm de cada iniciador (Operon®), 0.04 U/µL de taq platinum polimerasa (inVitrogen®) y 1000 ng de ADN por reacción, en un volumen final de 30 µL. Las condiciones de las PCRs fueron: una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 54°C por 60 segundos (gen *env*) o 55°C por 45 segundos (gen *pol*) y una extensión a 72°C por 50 segundos, con un paso final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

13.8 Visualización de productos amplificados. La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en una cámara horizontal en geles de agarosa al 1.5% con solución amortiguadora TAE (Tris Base 121 g Sigma Aldrich®, ácido acético glacial 28.55 mL Sigma Aldrich® y EDTA 0.5 M pH 8 Life Technologies® USA) teñidos con 6 µL de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/mL (Gibco BRL ultrapure Life Technologies® UK). Se utilizó un marcador de 100 pares de bases (pb) (DNA Ladder 100 pb New England Biolabs Technologies UK®) para determinar el tamaño de los productos de PCR. Estos productos de PCR fueron separados a 85 volts durante 1 hora y 20 minutos, en una fuente de poder marca Biorad® y visualizados en un transiluminador (Upland) y la imagen fue capturada en un fotodocumentador (MiniBISPro DNR CSI product supplies® USA). La mezcla restante (27 µL) de PCR conservada a 4°C. Se envió al servicio de secuenciación para su posterior análisis filogenético.

13.9 Secuenciación. Los productos de la PCR positivos fueron enviados a la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la UNAM FES-Iztacala, departamento de Bioquímica Molecular. Se utilizó un secuenciador Modelo 3130xl Genetic analyzer de 16 capilares. Se emplearon ambos primers de cada PCR para realizar la secuenciación.

Análisis Filogenético. Las secuencias nucleotídicas fueron editadas, alineadas y analizadas con el programa BioEdit³⁰. El árbol filogenético fue construido con el método Maximum Likelihood utilizando el programa MEGA5^{42,66} con la distancia de Tamura-Nei Gamma. La confianza estadística de la topología fue asegurada con valores de bootstrap de 1000 repeticiones. Nodos con valores de bootstraps arriba de 50 (500) fueron considerados^{25, 26, 32, 65, 66,68}.

Técnicas serológicas. Para valorar la eficacia de las técnicas serológicas diseñadas y estandarizadas para el presente trabajo se evaluaron muestras pareadas de suero y plasma de cada gato, mediante la técnica de Elisa Indirecta (ELISAI y Western blot WB).

Western blot. Para realizar esta técnica se utilizó la metodología descrita previamente por Zagal, 2011 y Carreón, 2012 con ligeras modificaciones. Se utilizó un antígeno vacunal que contiene la glucoproteína gp70 recombinante, el antígeno vacunal fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente transferido a membranas de nitrocelulosa. La membrana inicialmente fue bloqueada con leche libre de grasas (Blotting grade blocker non fat dry-milk Biorad Laboratories®) durante 24 horas a 4°C. Enseguida fue lavada y cortada en tiras de 3 mm de ancho y colocadas en soportes con divisiones para procesar de forma individual las muestras de suero o plasma. Dichas muestras fueron diluidas 1:50 en buffer de dilución (Anexo 2) e incubada 1 hora a 37°C en agitación. Posteriormente, fueron lavadas 4 veces con PBS-Tween durante 5 minutos en cada ocasión. Al término de los lavados se agregó el anticuerpo anti IgG de gato acoplado a peroxidasa (Life Technologies ® Alemania) a una dilución de 1:1000 en buffer de dilución y se incubó 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente se repitió el proceso de lavado descrito y se agregó el sustrato de la enzima (diaminobencidina al 0.05% Sigma Aldrich ® Suiza), revelando bandas de color ocre, correspondiente a la gp70 en caso de resultados positivos.

Técnica de Elisa indirecta. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc C Maxisorp®UK) previamente sensibilizadas con una concentración 1 µg/pozo de antígeno vacunal gp70. Se siguió la metodología descrita por Carrión, 2012, con ligeras modificaciones.⁶⁶ Se realizó el bloqueo de los sitios de unión no cubiertos por el antígeno vacunal con un buffer de bloqueo que contenía un 1% de suero porcino (Anexo 2), se lavó la placa y se colocó el anticuerpo primario (suero o plasma) y el anticuerpo secundario (anti IgG de gato acoplado a peroxidasa) diluido 1:20 y 1:5000 respectivamente e incubados por 1 hora a 37°C. El revelado se realizó utilizando como sustrato OPD (Sigma Aldrich® 2 mg UK) y se incubó en oscuridad durante 20 minutos.

Posteriormente, se realizó la lectura a una longitud de onda de 490 nm en un lector de ELISA (Awariness Technology INC[®] USA).

Análisis estadístico.

Análisis de Varianza (ANDEVA). La evaluación de la técnica de ELISA estandarizada fue utilizando estadística paramétrica y análisis de varianza, (coeficiente de Pearson), estableciendo un valor de $p \leq 0.05$. Un valor de p menor de 0.05 indicaría una diferencia significativa que valida el modelo entre la población total de muestras analizadas, por tanto, las diferencias observadas entre las muestras de suero o plasma de gatos analizadas y agrupadas por edad se deben a la variación intrínseca del muestreo^{42,77}. La línea de corte de la prueba se estableció a partir del promedio de la densidad óptica de 4 sueros controles negativos en WB adicionándole tres desviaciones estándar al primer valor. De tal forma que el resultado de la densidad óptica de cada suero se dividió entre la línea de corte para determinar su valor final.

Sensibilidad, especificidad e índice Kappa. Se utilizó el paquete estadístico Win Episcopo 2.0 para calcular los valores de sensibilidad, especificidad e índice kappa, tomando como estándar de referencia la técnica de WB. Una prueba de diagnóstico es altamente sensible y específica si es capaz de identificar a todos los individuos enfermos y sanos como tal. La sensibilidad nos indica la capacidad de nuestro estimador para dar como casos positivos los casos realmente enfermos; proporción de enfermos correctamente identificados. Es decir, la sensibilidad caracteriza la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad en sujetos enfermos, mientras que la especificidad nos indica la capacidad de nuestro estimador para dar como casos negativos los casos realmente sanos; proporción de sanos correctamente identificados. Es decir, la especificidad caracteriza la capacidad de la prueba para detectar la ausencia de la enfermedad en sujetos sanos.

Para establecer la concordancia entre pruebas se tomó como referencia la descripción hecha por Landis y Koch. El valor κ puede variar entre 0 y 1, por tanto, cuando se obtiene un valor κ de 0 se considera una concordancia "pobre" entre pruebas, valores κ entre 0-0.2 se consideran con una "ligera" concordancia, valores κ entre 0.21-0.40 se consideran como una "moderada" concordancia, valores κ de 0.41-0.60 como una "buena", concordancia, valores κ de 0.61-0.80 se consideran que tienen una concordancia "sustancial" y valores κ de 0.81-0.99 indica una "concordancia casi perfecta" ^{25,26,57}.

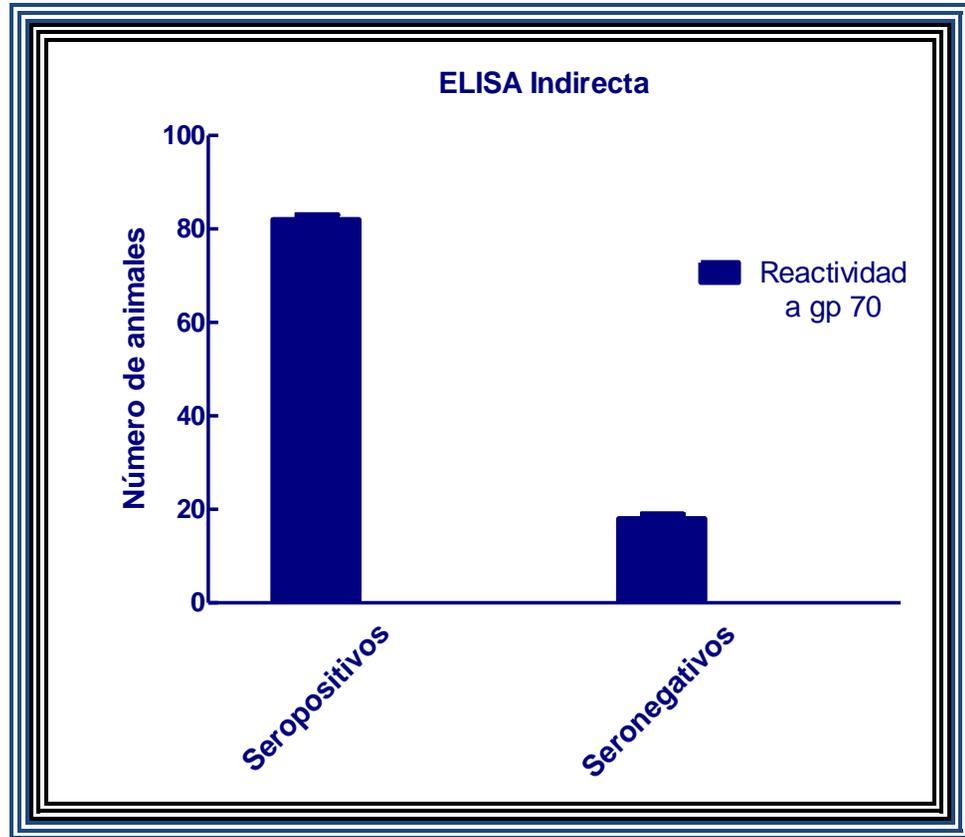
15.RESULTADOS

15.1 Población de estudio. Las características de la población de estudio analizadas se estructuraron de la siguiente forma: el 58% fueron machos y el 42% hembras; el intervalo etario fue: 40% de los gatos menores de 1 año, 40% entre 1-5 años, 6% entre 6-9 años, 8% entre 10-12 años y 6% de gatos mayores de 13 años. El 4% fueron vacunados contra el virus de Leucemia Felina, mientras que el 96% no estaban vacunados. Respecto a la ubicación geográfica, el 58% de las muestras provenían de gatos que habitan el Distrito Federal, mientras que el 42% fueron de gatos provenientes del Estado de México.

15.1 Serología

15.2ELISA Indirecta. Los resultados obtenidos en las muestras pareadas de suero (Figura 7) y plasma fueron muy similares, detectando un 82% de muestras positivas y un 18% de muestras negativas.

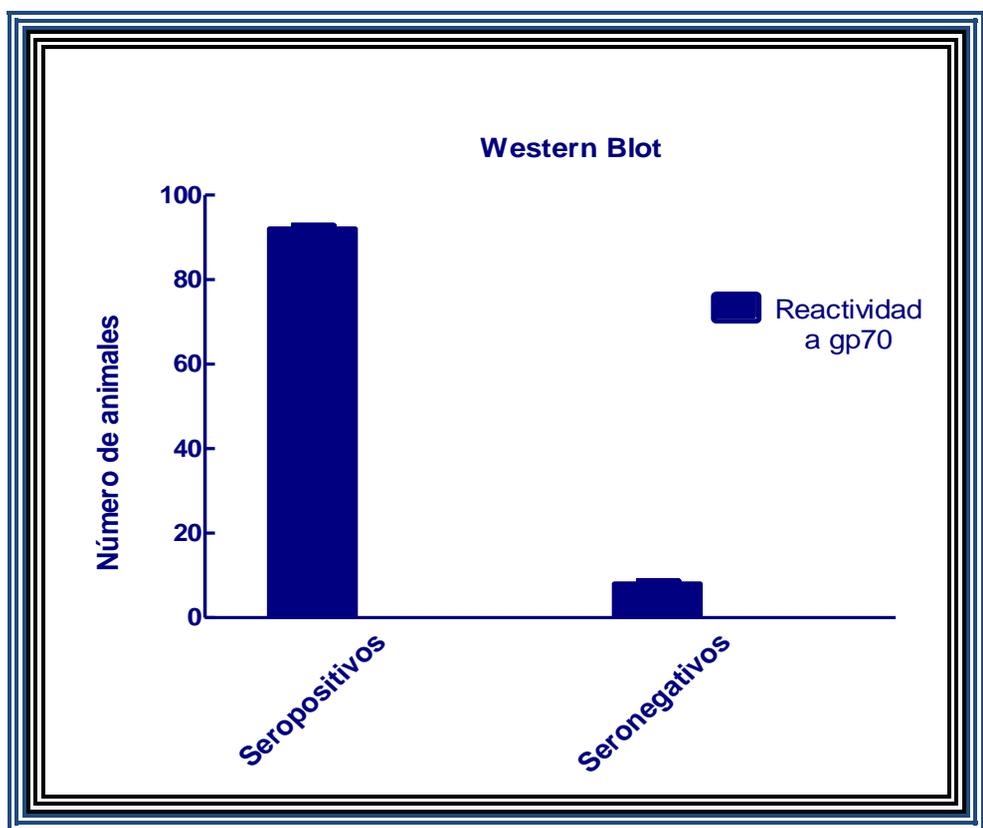
Figura 7. Animales con anticuerpos específicos contra la proteína gp70 del FeLV evaluados en la técnica de ELISAI utilizando suero



Seropositivos y Seronegativos a ELISAI

15.3 Western Blot. Los resultados obtenidos en la técnica de WB de las muestras pareadas de suero (Figura 8) y plasma resultaron muy parecidos a los obtenidos por ELISAI, detectando un 89% de muestras positivas y un 11% de muestras negativas.

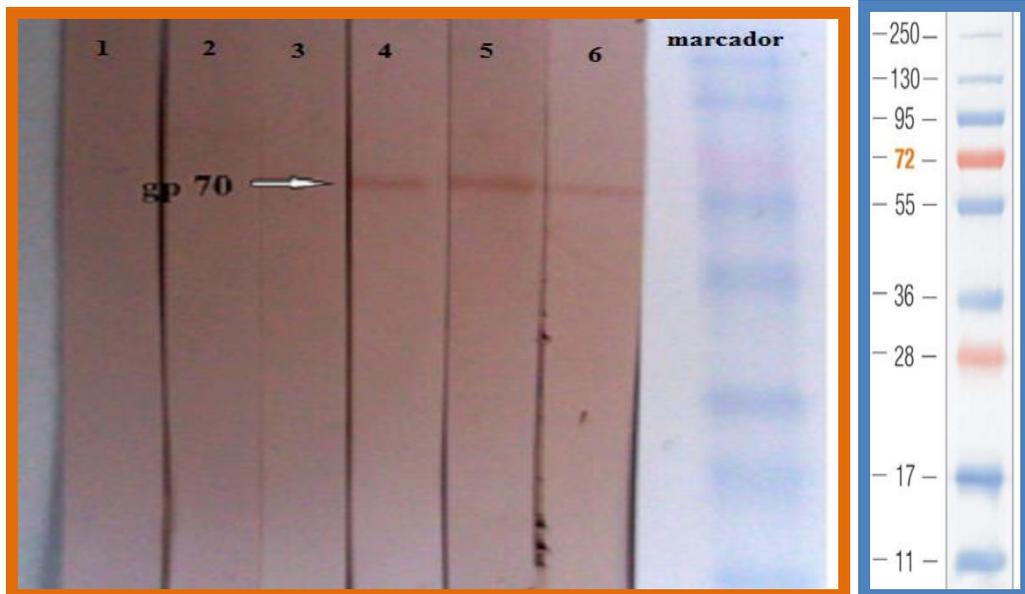
Figura 8. Animales con anticuerpos específicos contra la proteína gp70 del FeLV evaluados en la técnica de WB utilizando suero



En las tiras de nitrocelulosa fue posible revelar la glucoproteína gp70 como una banda de color ocre utilizando suero y plasma proveniente de los gatos de estudio (Figura 9).

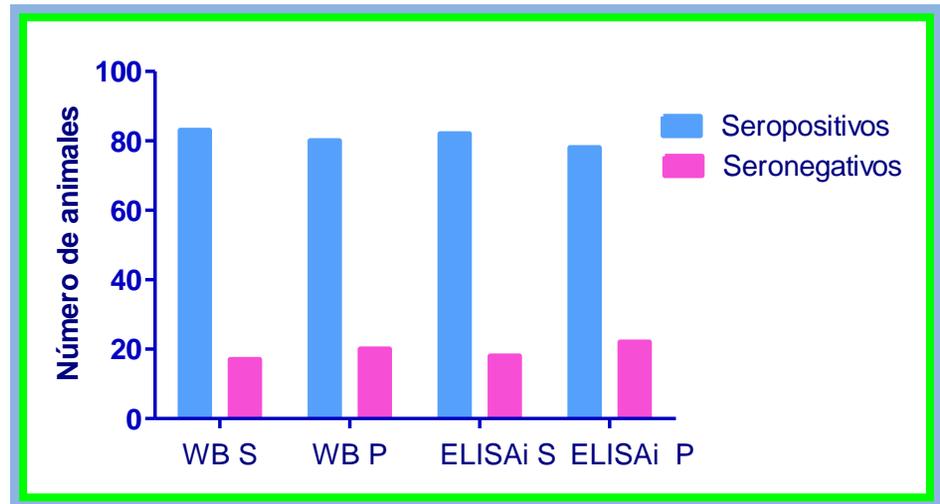
15.4 Western Blot y ELISAi. Se realizó una comparación entre las pruebas serológicas desarrolladas. Se obtuvo una detección ligeramente mayor de gatos seropositivos en la técnica de WB (Figura 9).

Figura 9. Reactividad de las muestras de suero evaluadas por la técnica de WB utilizando la proteína gp70 del FeLV



Carril 1, 2 y 3: sueros con resultados negativos; Carril 4, 5 y 6: sueros con resultados positivos; último carril, marcador de peso molecular.

Figura 10. Comparación de la eficacia de detección entre las técnicas serológicas (ELISAI y WB) utilizando suero o plasma de gatos como fuente de anticuerpos frente a la gp70 del FeLV.

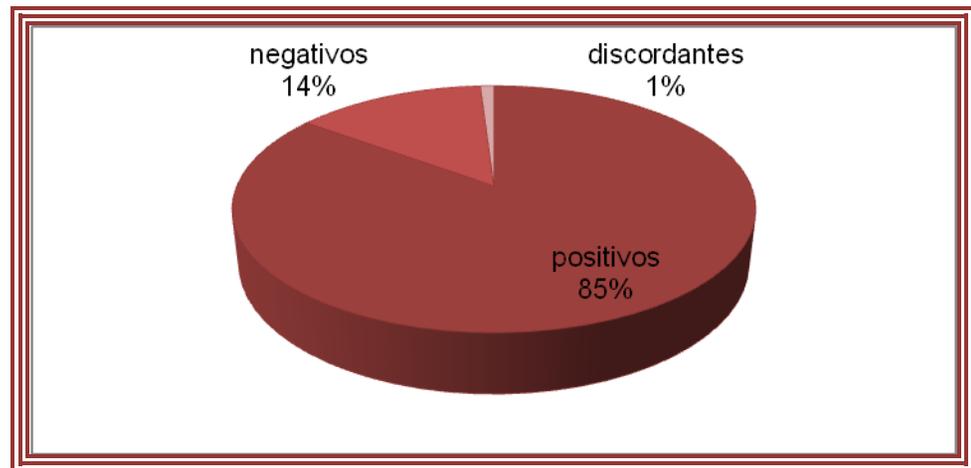


WB S: Western blot suero ELISAI S: Elisa indirecta suero

WB P: Western blot plasma ELISAI P: ELISA indirect plasma

En ambas técnicas serológicas utilizadas, resultó con 85% de seropositivos, obtenida con el uso de suero o plasma en la población total de gatos evaluados. Esta reactividad fue concordante en el 85% de las muestras con resultado positivo y en 14% de las muestras con resultado negativo, sin embargo, se encontró un 1% de muestras discordantes, lo cual se define como muestras con resultados diferentes entre las 2 técnicas (Figura 11).

Figura 11. Resultados obtenidos en las pruebas (ELISAi/WB) que identifican anticuerpos (ELISAi/WB) contra la gp70 del FeLV, de la población total de gatos evaluados

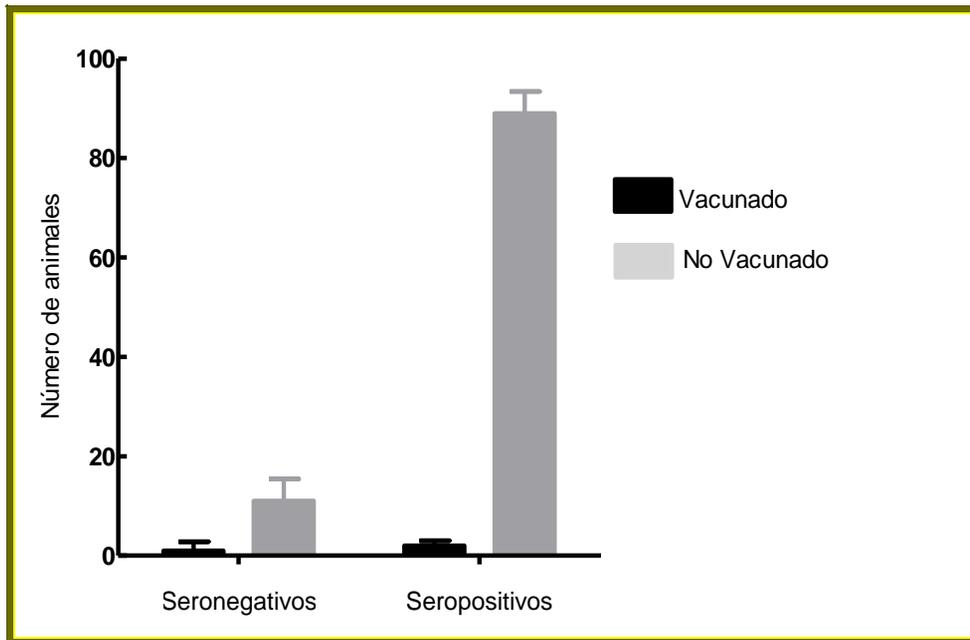


Cuadro 6.1 Comparación de las pruebas ELISAi y Western blot.

PRUEBAS	MUESTRAS	SEROPOSITIVOS
WB (+) ELISA (+)	67	82.7%
WB (-) ELISA (-)	8	9.9%
WB (+) ELISA (-)	3	3.7%
WB (-) ELISA (+)	3	3.7%
TOTAL	81	100%

Los resultados obtenidos de 94 animales no vacunados mostraron que el 33% resultaron seropositivos (Figura12).

Figura 12. Resultados obtenidos del total de gatos de la población de estudio frente a la reactividad a gp70 del FeLV (Western Blot) con respecto a la vacunación.



15.5 Prevalencia de FeLV en la población de estudio

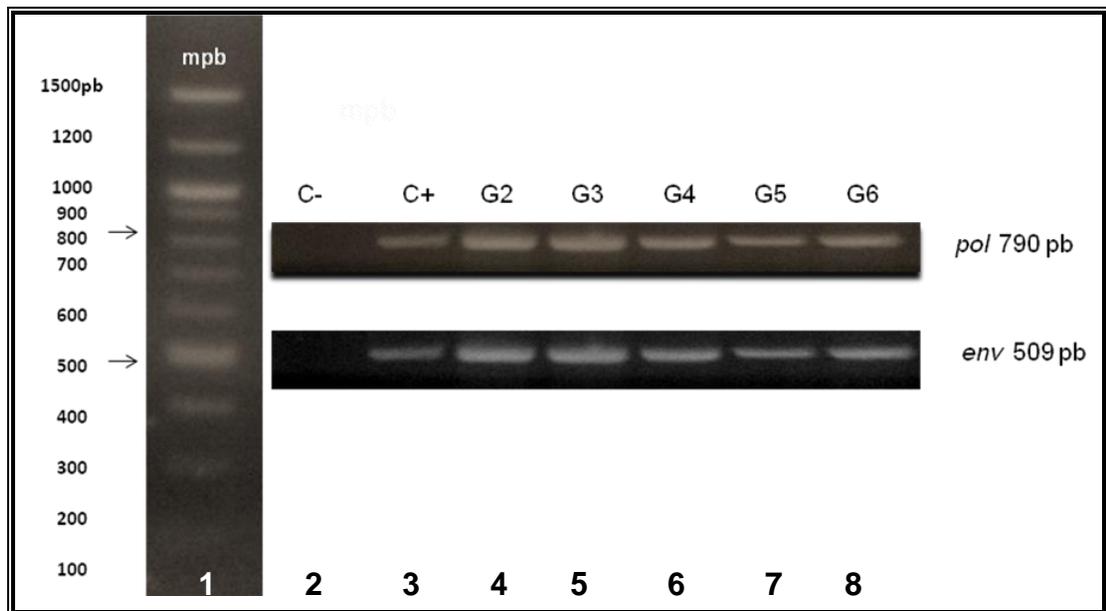
La seroprevalencia al FeLV en los gatos evaluados en las dos técnicas serológicas fue de 70% y 30% para el caso del Distrito Federal y el Estado de México respectivamente (Figura 13).

Figura 13. Seroprevalencia del FeLV utilizando pruebas serológicas (ELISAI/WB) en gatos del Estado de México y Distrito Federal.



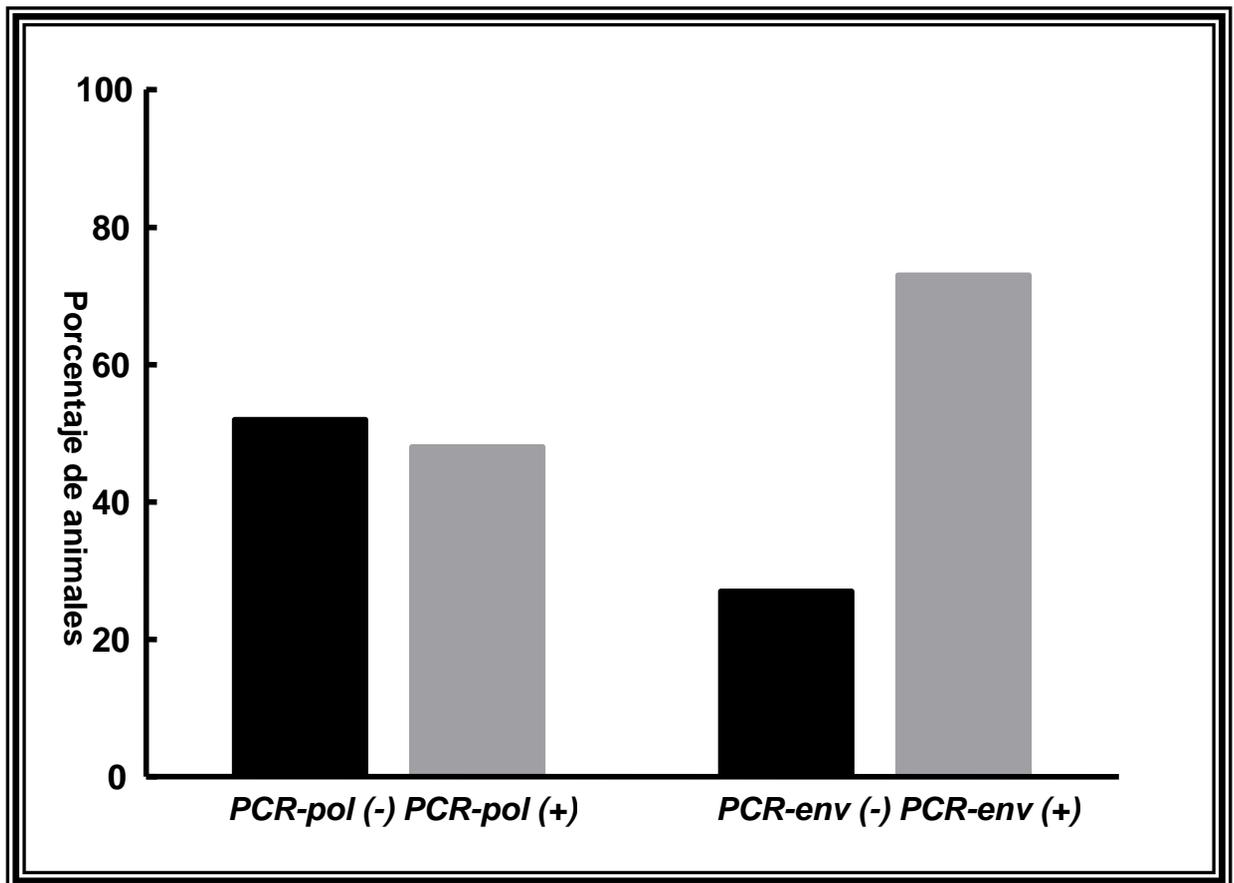
17.7 Reacción en cadena de la polimerasa. Se estandarizó la técnica de PCR utilizando como molde ADN proviral derivado de células mononucleares de sangre periférica de gatos. Se diseñaron PCRs para amplificar dos regiones genéticas (*pol* y *env*) del FeLV. Los productos positivos amplificaron bandas de un tamaño de 790 y 509 nucleótidos para el gen *pol* y *env* respectivamente (Figura 14). Del total de las 100 muestras de ADN evaluadas por PCR se obtuvo en un 83% de ellas resultados positivos para al menos una de las dos PCRs utilizadas. En el gen *env* se obtuvieron 76 muestras positivas mientras que para el gen *pol* 54 muestras fueron positivas (Figura 15).

Figura 14. Detección de ADN proviral en células mononucleares de gatos por PCR mostrando los productos de amplificación obtenidos para dos regiones genéticas (*env* y *pol*) del FeLV.



mpb: marcador de pares de bases; C- : control negativo; C+: control positivo; G2,G3,G4,G5 y G6: muestras de gatos infectados.

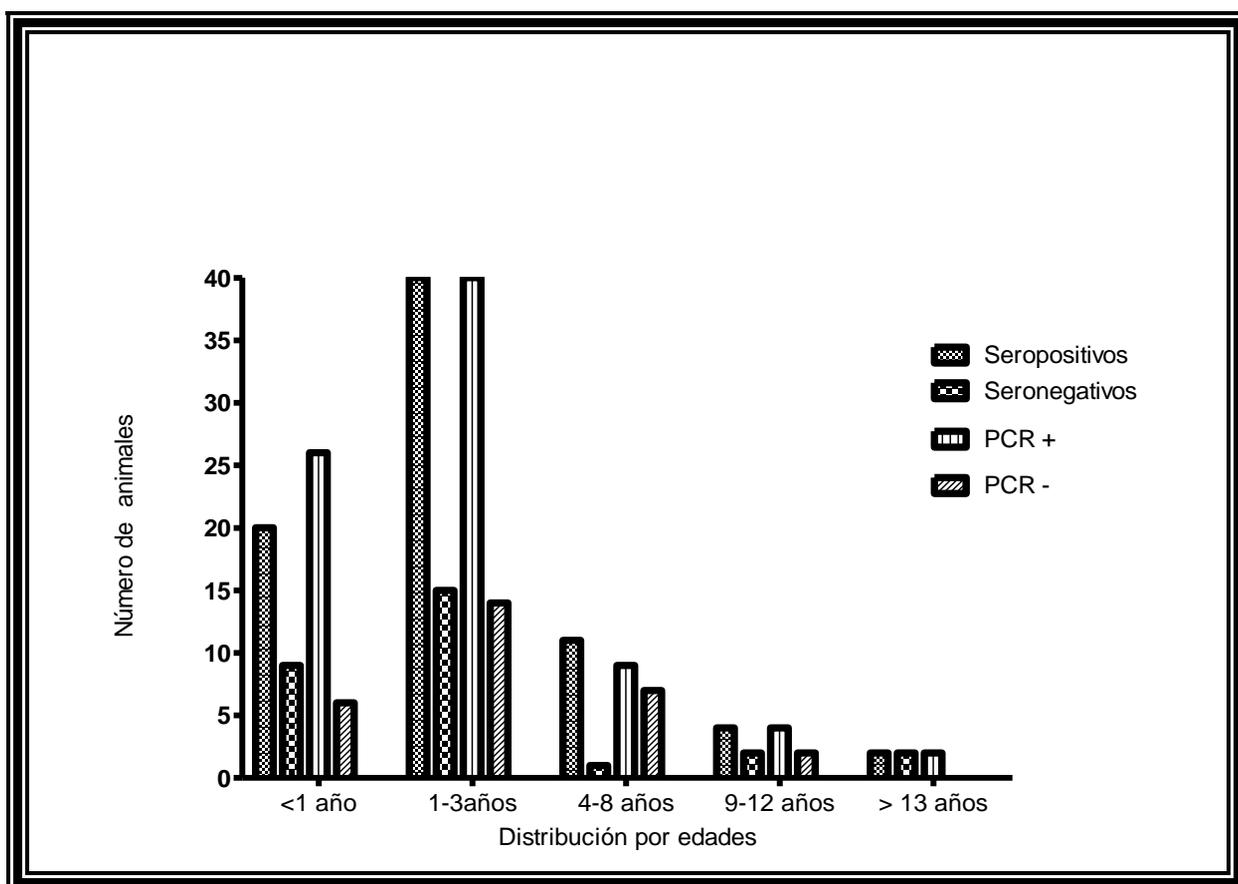
Figura 15. Resultados obtenidos en las PCR diseñadas en dos regiones genéticas (*pol* y *env*) del FeLV en una población de 100 muestras de gatos evaluados.



Se determinó el estado de salud en la población de gatos de estudio, dividiéndola en dos grupos: gatos clínicamente sanos y gatos enfermos (Figura 16). Tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas serológicas y de PCR, se estableció para el grupo de gatos enfermos que en el 87% se detectó ADN proviral del FeLV y en el 80% presentó anticuerpos contra la gp70 del FeLV (Figura 16).

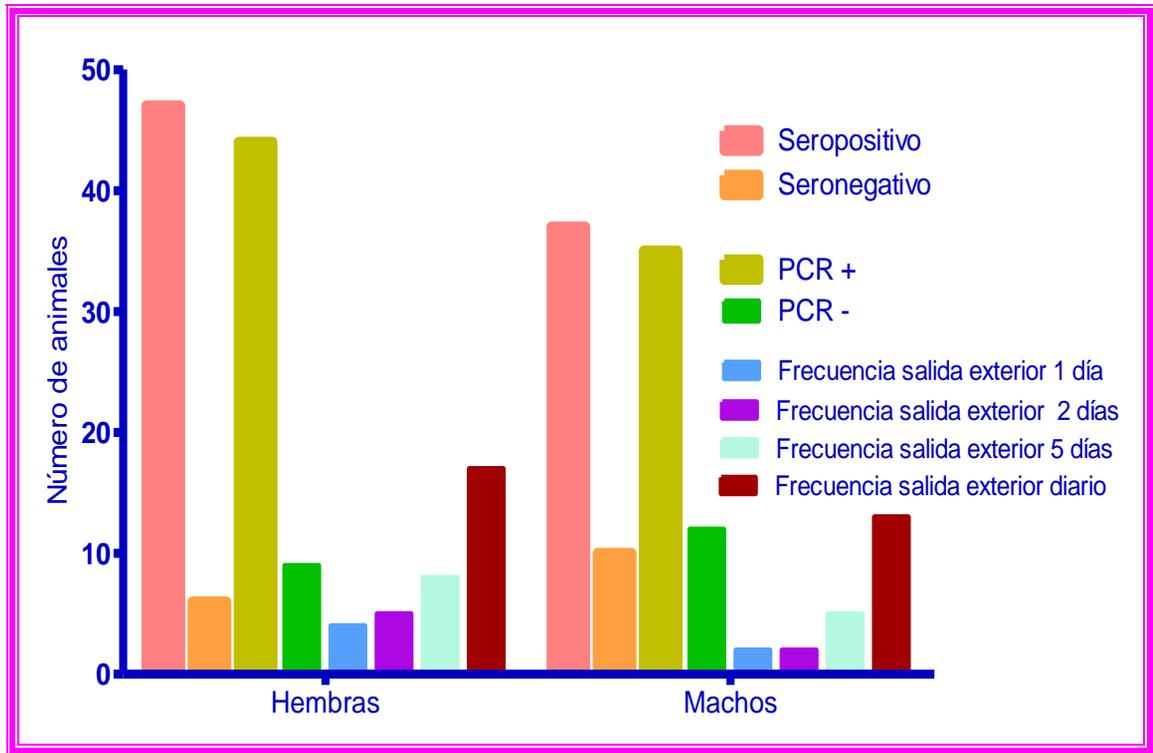
En la figura 17 se presenta la población de gatos de estudio distribuidos con respecto al intervalo etario y los resultados obtenidos utilizando las técnicas serológicas (ELISAi y WB) y de detección por PCR. Se observa que la mayor parte de la población seropositiva y con presencia de provirus se ubica en el intervalo de edad de 1-3 años.

Figura 17. Resultados serológicos y de PCR de los gatos evaluados en las diferentes edades



Respecto a los hallazgos serológicos y de detección de provirus del FeLV sobresalen en la población de estudio, que tanto en las hembras como en los machos con una mayor frecuencia de acceso al exterior por semana, se incrementa la frecuencia de detección de individuos seropositivos e infectados con el FeLV (Figura 18).

Figura 18. Correlación entre la seroprevalencia y la presencia de provirus del FeLV con respecto a la frecuencia semanal de acceso al exterior de los gatos.



Se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad e índice kappa respecto a la técnica de Western Blot (estándar de referencia) encontrando que estos 3 valores fueron mayores para la PCR y mostrando que dicha técnica fue capaz de detectar un mayor número de animales infectados por el FeLV. La concordancia obtenida fue “casi perfecta” para la técnica de PCR y para la técnica de ELISAi tuvo una concordancia “sustancial (Cuadro 7).

Cuadro 7. Sensibilidad, especificidad y concordancia (Kappa) obtenidos para las técnicas de ELISAI y PCR en gatos clínicamente sanos.

Valores	ELISAI	PCR
Sensibilidad	87%	92%
Especificidad	88%	95%
Índice kappa	0.75	0.89

El análisis estadístico generado a partir del registro de datos en la población de estudio y su correlación con los factores de riesgo muestran que el género y la frecuencia de acceso al exterior, presenta una ($p < 0.0010$), indicando diferencia estadística significativa, demostrando que ambas características son determinantes para la seropositividad e infección por el FeLV en gatos con mayor frecuencia de acceso semanal al exterior. En el cuadro 9 se aprecia que si el número de gatos en conjunto es mayor a 5 la tendencia a presentar seropositividad es marcada sin embargo la diferencia no es notoria respecto a los que se encuentran aislados (0) pero la seropositividad al FeLV continua presente. Existe una correlación clara y estadísticamente significativa respecto a la seropositividad e infección al FeLV y los factores de riesgos presentados como muestra el Cuadro 20.

La determinación del número de animales que conviven entre si, mostró que la seropositividad e infección al FeLV es mayor en gatos que conviven en una población con más de 6 animales en conjunto, mostrando una significancia estadística importante (Cuadro 9).

Cuadro 8. Resultados obtenidos en la población de gatos de estudio que se muestran por rango etario, sexo, acceso al exterior, ubicación geográfica, raza y su correlación con la seropositividad y detección de provirus al FeLV

<u>Edad</u>	<u>Total de gatos</u>	<u>Seropositivos</u>	<u>Provirus (+)</u>
<1 año	41	15 (37%)	21 (51%)
1-3 años	35	31 (88%)	15 (43%)
4-8 años	18	5 (27%)	14 (77%)
9-12 años	4	4 (100%)	2 (50%)
>13 años	2	2 (100%)	1 (50%)
<hr/>			
<u>Género</u>		p> 0.05†	
Macho(intacto)	41	35 (85%)	25 (61%)
Macho (castrado)	6	2(33%)	3 (50%)
Hembra(intacta)	43	38(88%)	28 (65%)
Hembra(castrada)	10	9 (90%)	3 (30%)
<hr/>			
<u>Acceso al exterior (por semana)</u>	(n=63)	p> 0.05†	P< 0.05†
1 día	6	3 (50%)	2 (33%)
2 días	7	6 (90%)	3 (43%)
5 días	13	4(31%)	8 (62%)
Diario	30	29(90%)	15 (50%)
Desconocido	44	1(14%)	3 (43%)
<hr/>			
Estado de México	42	30 (71%)	22 (52%)
Distrito Federal	58	17 (29%)	38 (65%)
Raza Pura (Angora,siames,azul ruso)	4	1 (25%)	2 (50%)
Sin raza	96	76 (79%)	87 (89%)

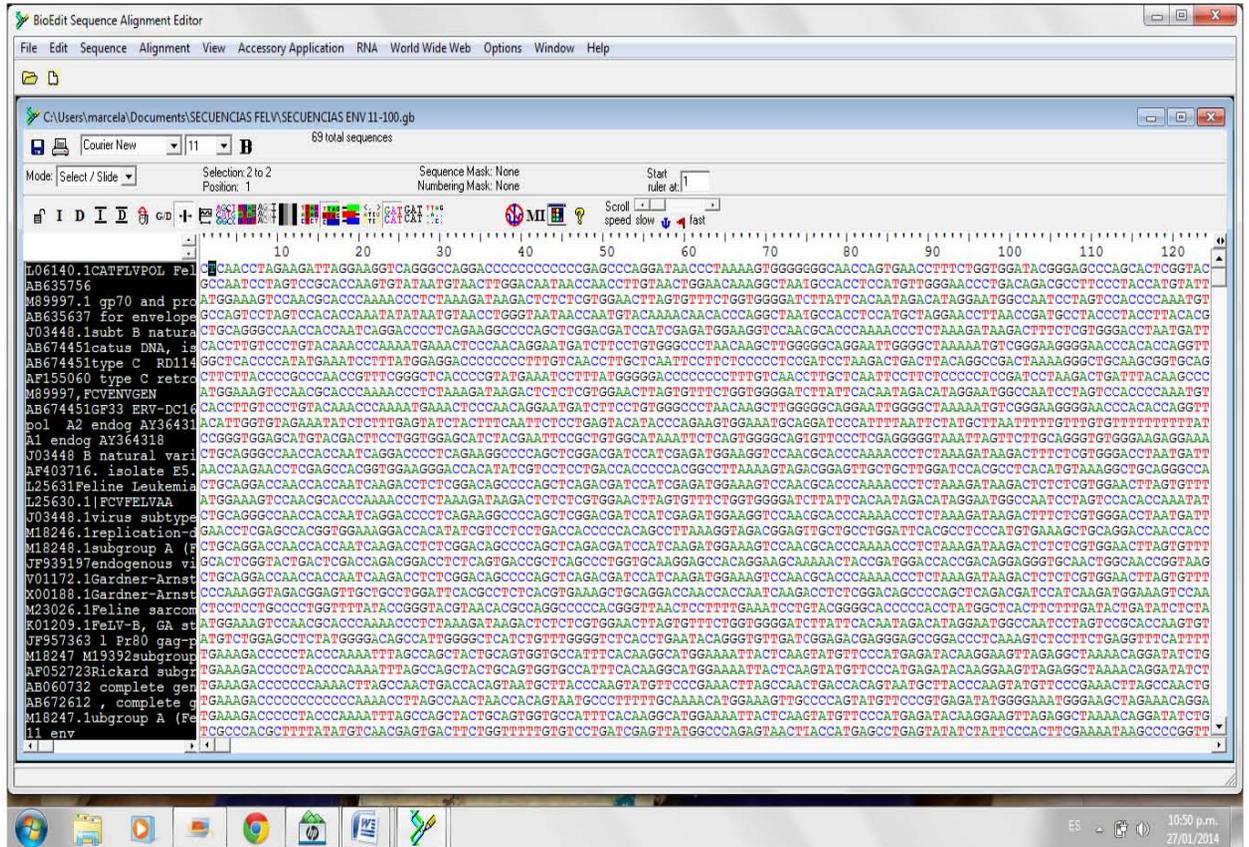
Cuadro 9. Número de gatos en convivencia en un mismo hábitat de la población total de estudio en correlación con la seropositividad y detección de ADN proviral del FeLV.

Número de gatos	Numero de gatos con los que convive	Seropositivos al FeLV	Detección de provirus
18	0	12 (66%)	11 (61%)
20	1	9 (45%)	10(50%)
9	3	5 (55%)	4(44.4%)
16	5	12 (75%)	11(69%)
37	más de 5	33 (89%) *	25*(68%)

* $p < 0.0011$ Significancia estadística/ **IC 95%** Sero+:1.245-12.845 **IC 95%** PCR+: 0.345-8.794

15.6 Análisis filogenético. A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los productos amplificados de PCR en los genes *pol* y *env*. Las secuencias se visualizaron utilizando el programa Chromas, obteniendo un total de 53 secuencias de las cuales 38 fueron de la región del gen *env* y 15 de la región del gen *pol*. Las secuencias fueron analizadas y editadas en el programa Bioedit. Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando el programa MEGA 5.2 utilizando el método de máxima verosimilitud con 1000 bootstraps de confianza estadística entre las secuencias, además se utilizaron diferentes secuencias de referencia reportadas en la base de datos internacional (GeneBank) las cuales fueron: a) **retrovirus exógenos** FeLV_E5.14, FeLV-FAIDS, FeLV_T, Rickard_A, FeLV_Glasgow, FeLV-C_Sarma, Japón_Clona 33, pJ7E2, b) **retrovirus endógenos**. **Anexo 1 Cuadro 20.**

Cuadro 10. Secuencias nucleotídicas de la región env



CUADRO 12. Secuencias nucleotídicas de la región *pol*

MS: Alignment Explorer (POL TESIS FINAL.Fas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrv

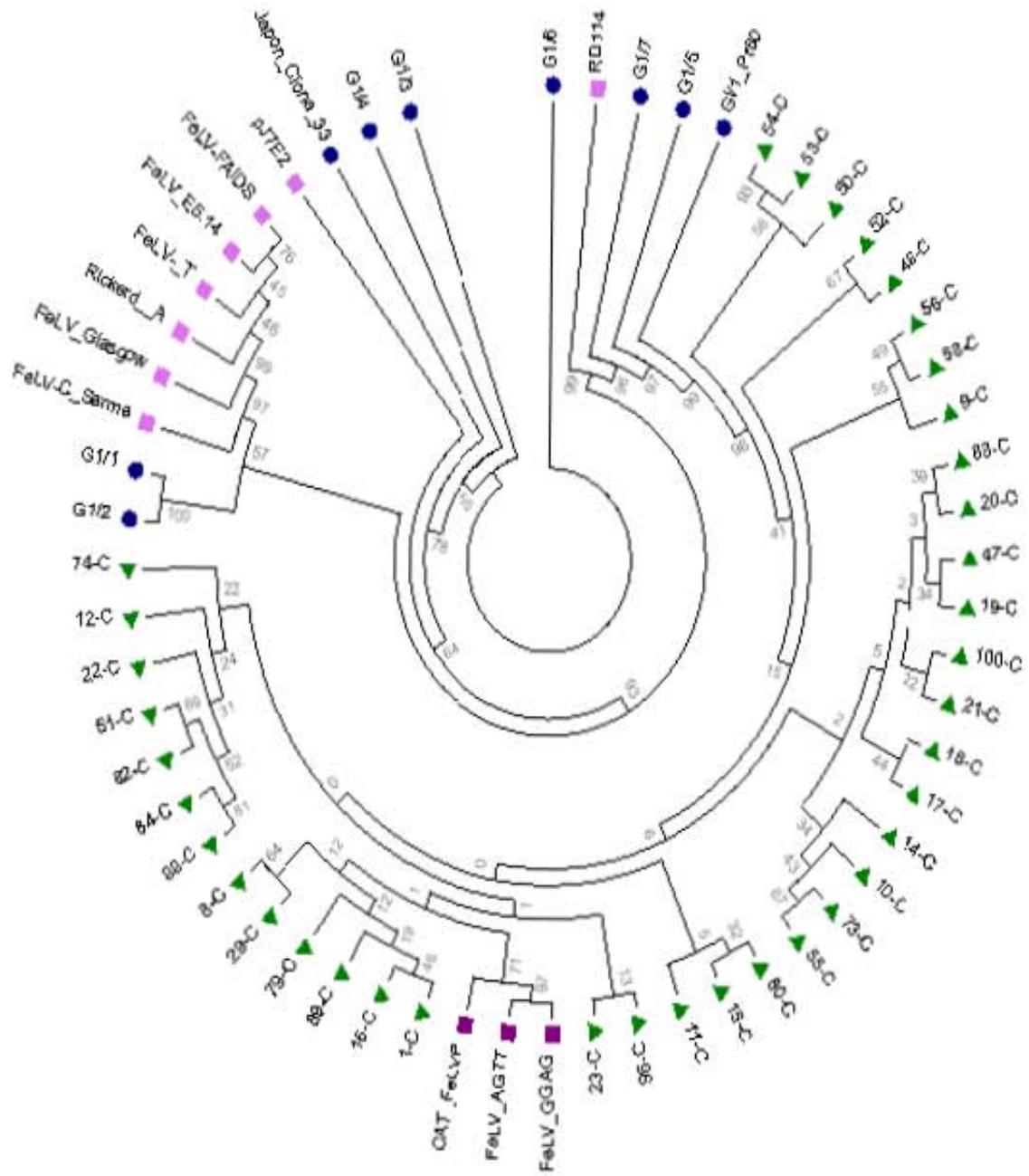
1. EnFeLV GGAG
2. EnFeLV AGTT
3. FeLV I
4. FeLV FAIDS
5. FeLV ERV DC10
6. FeLV Japon Clona 33
7. FeLV pJ7E2
8. FeLV Rickard A
9. FeLV Clona 4914
10. FeLV RD114 Sc3C
11. FeLV Clona 2518
12. Gamma1
13. Gamma2
14. Gamma3
15. Gamma4
16. Gamma5
17. Gamma6
18. Gamma7
19. Gamma9
20. Beta1
21. Gamma 8
22. FeLV Recomb B C
23. 1-C
24. 2-C
25. 24-C
26. 25-C
27. 28-C
28. 30-C
29. 31-C
30. 33-C
31. 56-C
32. 58-C
33. 75-C
34. 77-C
35. 85-C
36. 90-C
37. 26-C
38. Gamma1 Door

Site # 88 with w/o Gaps

ES 10:16 p.m. 27/01/2014

Adicionalmente para la construcción del árbol utilizando las secuencias nucleotídicas generadas de la región *env* se tomó como referencia las secuencias clasificadas en el trabajo realizado por Watanabe *et al* 2013, el cual agrupa secuencias de la región *env* del virus de FeLV en 3 genotipos (I, II y III), dentro de los cuales el genotipo I y II incluye secuencias descritas solo en Japón y el genotipo III incluye secuencias descritas en otros trabajos tanto de retrovirus endógenos como exógenos. Las 38 secuencias obtenidas en el presente trabajo conformaron un grupo diferente a los 3 genotipos descritos por Watanabe (I, II y III) y se asociaron a los genotipos endógenos *enFeLV GGAG*, *enFeLV AGTT* y *CAT FeLVP* con un soporte estadístico de 98 bootstraps.

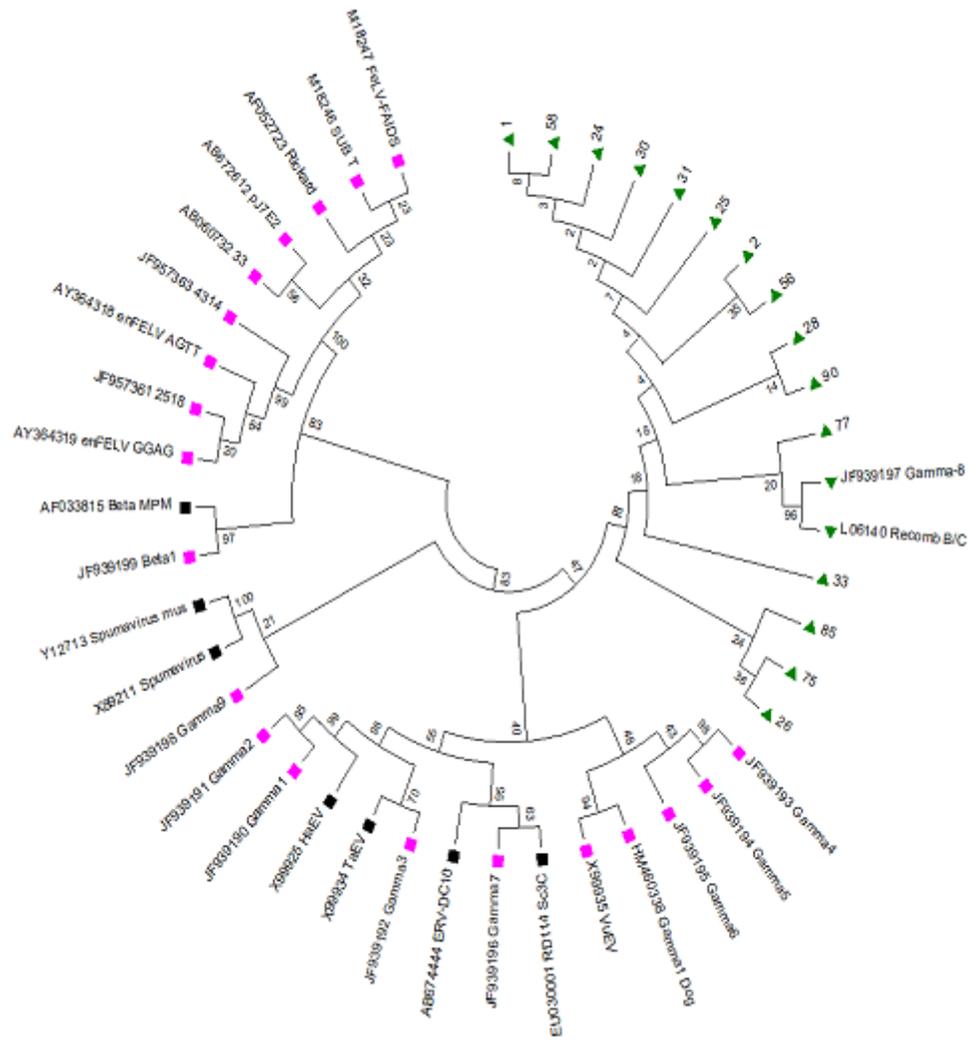
Figura 19. Árbol filogenético construido con 38 secuencias de la región *env* del FeLV obtenidas a partir de ADN proviral de gatos infectados.



La construcción del árbol fue utilizando el método *maximum likelihood* (máxima verosimilitud) con 1000 bootstraps como soporte estadístico. Se muestra el nombre de las secuencias virales de FeLV utilizadas para construir el árbol.

Para construir el árbol con las secuencias nucleotídicas obtenidas de la región *pol* se tomó como referencia las secuencias descritas en el trabajo de Song *et al* 2012, en dicho trabajo las secuencias del gen *pol* son clasificadas en gammaretrovirus (γ 1 al γ 9) y betaretrovirus, todas ellas derivadas de retrovirus endógenos. Las 17 secuencias obtenidas en el presente trabajo se agruparon en una rama asociada al genotipo gammaretrovirus 8 y al genotipo recombinante B/C exógeno, apoyado con un valor de bootstrap de 82.

Figura 20. Árbol filogenético construido con 15 secuencias de la región *pol* deL FeLV obtenidas a partir de ADN proviral de gatos infectados



La construcción del árbol fue utilizando el método máxima verosimilitud (máxima verosimilitud) con 1000 bootstraps como soporte estadístico. Se muestra el nombre de las secuencias virales de FeLV utilizadas para construir el árbol

16. DISCUSIÓN

La población de estudio analizada en el presente trabajo fue conformada con gatos domésticos muestreados aleatoriamente y ubicados en 2 regiones geográficas bien definidas (Distrito Federal y Estado de México) y en su mayoría no vacunados contra el FeLV. Se evaluó la seroprevalencia, frecuencia de infección y factores de riesgo asociados al FeLV.

En estudios previos realizados en el Distrito Federal y Estado de México se encontró un alto índice de animales seropositivos (65% y 79% respectivamente) utilizando pruebas de ELISAI y WB basadas en el uso de una fracción de la glucoproteína gp70^{17,18,76}, sin embargo, la presencia de anticuerpos no es un elemento concluyente para asegurar la infección por el FeLV en los gatos, ya que como se ha descrito la respuesta inmune puede ser efectiva y no permitir el establecimiento del FeLV de forma latente^{3,11,16-18,28,30,34}. Las técnicas serológicas utilizadas en el presente trabajo detectaron un porcentaje ligeramente superior de animales seropositivos a los trabajos previamente descritos y estos resultados fueron apoyados con la detección del provirus en el 76% de los casos, lo que refuerza el hecho de que estos gatos estaban infectados con el FeLV.

En el trabajo realizado por Kanafany 2007 en gatos provenientes del centro del país y en el cual se emplearon pruebas comerciales (detección de antígeno p27) se encontró un 75% gatos con signos clínicos y sospecha de FeLV, lo cual fue altamente concordante con la seroprevalencia encontrada en el presente trabajo (82%) y por lo descrito por Zagal 2011 y Carrión 2012^{18, 76}.

En las técnicas serológicas descritas por Zagal 2011; Carrión 2012, se empleó únicamente suero como muestra de diagnóstico, mientras que en el presente trabajo se evaluó la utilidad tanto de la muestra de suero como de plasma para el diagnóstico del FeLV, detectando diferencias mínimas entre los resultados que arrojaron ambas muestras en las dos técnicas utilizadas (ELISAI/WB), demostrando que ambas muestras son igualmente confiables para la detección de anticuerpos específicos contra el FeLV.

El virus de Leucemia Felina integrado (provirus) en las células mononucleares de sangre periférica fue detectado por PCR en el 89% de la población felina de estudio, en otros reportes los valores de detección de ADN proviral son altamente variables por ejemplo; los valores mas bajos de detección descritos por PCR han sido reportados en Canada (3-4%), Suiza y Estados Unidos (15-20%), en España (35.7%), valores intermedios de detección, Brasil (47.5%) y Reino Unido (50%). En todos estos trabajos fueron utilizados iniciadores diseñados en 4 de los principales genes de los gammaretrovirus (*LTR*, *gag*, *pol* y *env*). En el presente estudio se diseñaron iniciadores para dos genes principales del genoma viral (*pol* y *env*) encontrándose una diferencia del 22% en la detección de ADN proviral según la región amplificada por PCR, siendo mayor para el caso de la PCR de *env*. En conjunto la PCR de *pol* y *env* detectaron ADN proviral en 89% de las muestras, siendo este valor mayor al descrito por otros estudios realizados con PCR en gatos de Sudamérica (70%)^{38, 44}. Las diferencias encontradas en la detección de ADN proviral entre el presente estudio y otros trabajos realizados en diferentes países pudieran radicar: a) en las características del diseño de los iniciadores se incluyeron posiciones degeneradas, lo cual puede permitir una mayor captación de variantes genéticas b) se consideró que los iniciadores pudieran unirse no solo a retrovirus exógenos del FeLV sino también a retrovirus endógenos c) la región centro del país posee una alta presión de la infección por el FeLV, sin embargo, la detección del provirus fue más elevada que lo reportado en otros países.

En el presente trabajo se demostró que el uso de la PCR fue una técnica más adecuada para el diagnóstico de FeLV que el uso de pruebas serológicas, encontrando que para la técnica de PCR los valores de sensibilidad y especificidad fueron más elevados respecto a la prueba de ELISA indirecta, 92/87% y 95/ 88% respectivamente. Además el valor kappa mostró que la técnica de PCR tuvo una concordancia ($\kappa=0.89$) "casi perfecta" respecto al estandar de referencia (WB). En Canadá y USA, la prueba de ELISAi ha presentado mayor sensibilidad y especificidad que WB⁵. Los ensayos brasileños⁸¹ reportan bajas tasas de infección, también se encuentra en 12.5 y 20.3%, respectivamente

La mayor parte de los estudios de patogénesis y eficacia vacunal del FeLV se desarrollaron antes de que se establecieran métodos de diagnóstico moleculares específicos y sensibles para la detección del virus, en este estudio se ha demostrado que la PCR punto final funciona y que el uso de PCR tiempo real para la cuantificación del provirus de FeLV y de las cargas de ARN viral ^{72,73,75} mejoraría el diagnóstico, en comparación con la detección de aislamiento en cultivo celular, antígeno viral, e inmunofluorescencia ^{14, 15, 24}.

Existen diversos factores involucrados en la eficacia de la técnica de PCR como son la especificidad de los iniciadores, la calidad del ADN, la etapa de la infección en la que se encuentren los animales infectados y además la fuente de ADN proviral. En el presente trabajo se realizó la obtención de ADN proviral a partir de células mononucleares de sangre periférica debido a que en este grupo celular se puede encontrar una alta cantidad de linfocitos que son una de las células blanco específicas para la infección por el virus de Leucemia viral felina ²⁴. Tal como se ha demostrado en estudios en los que determinando la carga viral de ADN/ARN, encontrando que los linfocitos fueron infectados predominantemente, no así los monocitos y granulocitos en los gatos avirémicos ^{26,28,85}. Las células mononucleares de gatos infectados con provirus no siempre se encuentran con la carga viral disponible para el diagnóstico, esto depende de la patogenia de la enfermedad. ³¹.

El grupo de gatos en el estudio fue una población totalmente heterogénea: las características del grupo dividieron a los animales respecto a: a) región geográfica b) género c) edad d) población de vacunados y no vacunados e) acceso al exterior f) número de gatos en convivencia. Todas estas variables han sido evaluadas en otros estudios ^{19,29,31,85,86,91} en los cuales determinan que son factores de riesgo en la infección por el FeLV. Considerando la región geográfica se encontró que el número de gatos infectados en el Distrito Federal (70%) fue mayor que en el Estado de México (30%), esta diferencia puede radicar en el número de animales muestreados procedentes de la región 58% y 42% respectivamente, el tipo de vivienda en base al estilo de vida de la población del Distrito Federal, puede ser determinante en la densidad de población de gatos, sin embargo, no es posible

corroborar esta información dado que no existen censos disponibles de la población de gatos en ambas entidades.

El análisis estadístico generado a partir del registro de datos en la población de estudio y su correlación con los factores de riesgo muestra que las hembras (88% infectadas) tienen un mayor porcentaje de infección al FeLV ($p < 0.0010$) respecto los machos (85% infectados), lo cual concuerda con estudios similares³³⁻³⁵ que muestran datos relevantes respecto al género como factor relevante en la frecuencia de infección por el FeLV. En el análisis estadístico realizado por intervalo etario no se encontró una diferencia significativa, aunque fue evidente que la población con un mayor número de animales infectados se ubicó en animales menores a 2 años, posiblemente esto radique en las vías de transmisión, ya que los animales jóvenes se pueden infectar vía transplacentaria y además la toma de calostro y leche, saliva (acicalamiento de la madre a la cría), y para el caso de animales mayores, la vía de transmisión principal es por la convivencia con otros gatos, el acicalamiento mutuo y la menor cantidad de receptores que favorecen la entrada del virus a las células^{55,56,62,63}. Un factor recientemente descrito presente en gatos adultos es la molécula REFREX-1 la cual está involucrada como factor antirretroviral y molécula mimetizadora de los retrovirus exógenos y activador transcripcional en los retrovirus endógenos^{69, 86}.

Respecto al estatus de vacunación el grupo de estudio fue conformado con gatos que en su mayoría no estaban vacunados contra el FeLV, lo que seguramente fue lo que permitió que un alto porcentaje de estos gatos resultaran infectados. La falta de vacunación contra el FeLV puede estar asociada a la alta prevalencia de dicho retrovirus en el estudio. Se ha descrito que el impacto de la infección retroviral en gatos puede verse reducida drásticamente con adecuados programas de vacunación, control, aislamiento y educación a los dueños^{71,72}.

El análisis hecho respecto al número de gatos que conviven entre sí en grupos sociales definidos, demostró que la seropositividad (técnicas de ELISAI y WB) e infección (técnica de PCR) al FeLV fue mayor en gatos que conviven en grupos

que involucran a más de 6 individuos, mostrando una significancia estadística; este factor no se encontró en otros ensayos hechos en México ni en América Latina. Respecto a los hallazgos serológicos y de detección de provirus del FeLV, fue relevante que en la población de estudio, tanto en las hembras como en los machos con una mayor frecuencia de acceso al exterior por semana, se incrementó la frecuencia de detección de individuos seropositivos e infectados con el FeLV. Además del acceso al exterior y la convivencia entre poblaciones de gatos, es importante también considerar la densidad de población y el hacinamiento lo cual resulta en estrés, mala higiene y un mayor contacto directo entre los gatos⁶⁰⁻⁶².

A partir de los resultados del presente estudio, se demuestra que la prevalencia del FeLV es elevada entre los gatos de la Ciudad de México y está influenciada significativamente por factores de riesgo relacionados con la demografía, el estado de salud del gato, edad, el género, el comportamiento y tipo de hogar, los cuales son elementos importantes para determinar la condición de salud de los felinos. La elevada prevalencia de FeLV sugiere la necesidad de un mayor uso de medidas de control específicas, tales como la detección temprana de la infección y la práctica de vacunar contra Leucemia Viral Felina en México. Como la mayoría de los factores de riesgos identificados en el presente estudio, son similares a los descritos en otras partes del mundo^{73, 94,95}, es posible entonces, adoptar y poner en práctica las actuales directivas recomendadas por las asociaciones internacionales (Leucemia viral felina: ABCD Lineamientos para la prevención, control y manejo de las enfermedades infecciosas en felinos) para lograr una mejor estrategia de control y prevención contra el FeLV.⁹⁰

A pesar de que los gatos de la población de estudio fueron aparentemente sanos al momento del muestreo, cerca del 90% de ellos, resultaron infectados, aunque esto podría resultar contrastante respecto al hecho de que no mostraban signos clínicos, estos hallazgos fueron también descritos por Jarret a finales de los 60's, aislando retrovirus obtenidos de animales con linfosarcoma y aparentemente sanos⁸⁷.

El genotipo A del FeLV es el genotipo más abundante y el responsable de la transmisión del virus entre los animales ^{77,79,87}. Además, se ha descrito y comprobado que la vacunación contra este genotipo es la única opción para inducir inmunidad que prevenga la infección. Por otro lado, los genotipos de FeLV, B y C son generados a partir de la recombinación entre el genotipo FeLV-A y endógenos *envFeLV* ^{6,7}. Para el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas en la región *env*, en el presente trabajo se utilizaron las secuencias descritas por Watanabe 2013, las cuales son clasificadas en 3 clases I, II y III (incluyo secuencias de FeLV-A, B y C) y fuera de estos grupos se ubicaron secuencias de retrovirus endógenos (*enFeLV GGAG* y *enFeLVAGTT*). Todas las secuencias nucleotídicas obtenidas para la región *env* del presente estudio se asociaron con el grupo de retrovirus endógenos *enFeLVGGAG*, *enFeLVAGTT* y *Cat FeLV-P*, los tres genotipos se han asociados con enfermedad en gatos ^{6, 7, 52,53,69,70}.

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la región *pol* en la población de gatos de estudio, se asociaron dentro del grupo γ -8 de retrovirus endógenos y el subgrupo exógeno recombinante B/C, el cual fue reportado en 1991 por Pandey. Más adelante Lynn en 1993 describe una población de 100 gatos con linfosarcoma y ausencia de antigenemia en un 68% de la población, verificando la presencia del retrovirus exógeno recombinante B/C ^{49,50,59}. El análisis filogenético hecho a partir de las secuencias nucleotídicas provirales obtenidas de la población de gatos en este estudio, revela que existe un alto porcentaje de virus de FeLV presentes en gatos con elevada homología con los retrovirus endógenos, también el tipo de virus endógeno encontrado en este estudio constituye un grupo único y particular presente en felinos domésticos del país y que tiene una alta divergencia con otros retrovirus endógenos descritos en la literatura o de los cuales se disponen de secuencias en la base de datos (GenBank). No obstante, no se pudo determinar la asociación que existe entre la presencia de este genotipo endógeno de FeLV y su asociación con patologías o cuadros clínicos específicos en los gatos infectados, lo que hace necesario

realizar estudios para determinar su verdadero impacto como agente etiológico de enfermedad. Adicionalmente es necesario un estudio que involucre la secuenciación completa del retrovirus endógeno identificado en este trabajo para identificar las regiones genéticas y las proteínas asociadas a la expresión de las mismas. Aunque, en este trabajo se demostró que en los gatos infectados existió la expresión de antígenos asociados a la proteína de envoltura, ya que se demostró su presencia al identificar anticuerpos contra estos antígenos en la mayor parte de la población de estudio.

A pesar de que inicialmente se pensaba que la patogenicidad relacionada a la presencia de retrovirus endógenos no estaba asociada a enfermedad, dado a que generalmente el genoma de estos virus es interrumpido por codones de terminación, supresiones o mutaciones en el sitio de desplazamiento y marco de lectura; no obstante, se ha comprobado que es factible que algunos retrovirus endógenos sean transcripcionalmente activos y estudios más recientes revelan que es posible encontrar expresión de proteínas o formación de partículas, lo cual puede estar asociado con los resultados del presente trabajo ^{69,72,73,75}, también la mayoría de las pruebas de diagnóstico comerciales que detectan antígeno no son capaces de evidenciar la presencia de infección con virus endógenos del FeLV, por lo que se hace necesario realizar pruebas más sensibles y específicas para identificar animales que estén expresando retrovirus endógenos relacionados con enfermedad en los gatos. Hay que destacar, que la población de gatos positiva al provirus y negativa al antígeno, probablemente no coincidan en el número de gatos infectados de forma latente, por lo tanto, la identificación de provirus y la detección de antígeno son dos métodos que no son equiparables. Mientras, que el estado de infección se puede determinar identificando al provirus por PCR, una infección latente se caracteriza por un virus reactivable en gatos negativos al antígeno ^{40,49,53}.

Finalmente se requieren trabajos que involucren el estudio del virus de Leucemia viral felina como modelo de estudio para generar información básica de la oncogénesis retroviral.

17. CONCLUSIONES

Se detectó el provirus de FeLV en células mononucleares de sangre periférica en gatos utilizando la técnica de PCR en el presente estudio....

La sensibilidad, especificidad y el valor kappa de la técnica de PCR fueron superiores con respecto a las técnicas serológicas.

El análisis filogenético realizado identificó principalmente secuencias de retrovirus endógenos prevalentes en la población de gatos del país.

.La técnica de PCR estandarizada en este trabajo es una buena opción de diagnóstico para la detección de la infección del virus de Leucemia viral felina de gatos en México.

18. PERSPECTIVAS

Basado en los hallazgos de este trabajo es necesario profundizar en la participación real que están teniendo los retrovirus endógenos presentes en la población de felinos domésticos del país

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

Caracterización de los retrovirus endógenos.

19. GLOSARIO Y ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

Amplicón: Conjunto de moléculas de ADN idénticas, producto de una PCR

Anticuerpos anti-FOCMA: Anticuerpo contra un antígeno de membrana celular asociado a un oncornavirus felino

Arbol filogenético: Es un diagrama que muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que se cree que tienen una ascendencia común.

ARN: Ácido ribonucleico

Bioedit: programa para edición de alineamientos y análisis de secuencias

Bootstrap: Es un método estadístico que permite estimar las distribuciones por creación repetida y análisis de conjuntos de datos artificiales simula esto pero en lugar de muestrear, de una población “remuestrea” los datos originando pseudorréplicas

CD4+: Linfocito TCD4+

CD8+: Linfocito TCD8+

Cebador o primer: Oligonucleótido de 18-30 nucleótidos de longitud que sirve como punto de partida para la replicación del ADN

Linfocito NK: Linfocito asesino natural

Clustal X: Herramienta informática para el análisis estructural de ácidos nucleicos y el alineamiento global de múltiples secuencias y la construcción de árboles filogenéticos

CMH-I: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1

CMH-II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas

env: Gen de la envoltura

ERV: Retrovirus endógeno

Fc: Fracción constante

FeLV: Virus de Leucemia viral felina

Filogenia: Es la ciencia de estimar el pasado evolutivo basada en comparación de secuencias de proteínas o de ADN

Filograma: Diagrama que contiene información adicional del árbol filogenético construido dada por la longitud de las ramas.

FOCMA: Antígeno de membrana de celular infectada por un oncornavirus felino

LSA: Linfocoma

LB: Linfocito B

LTh: Linfocito T helper o cooperador

LTR: región terminal larga

MO: Medula ósea

Nodo: El punto donde cada rama del árbol construido se bifurca o termina.

Mega 5: Es una herramienta bioinformática integrada para la alineación de secuencias, inferencia de árboles filogenéticos, bases de datos basadas en la red, tasas de estimación de evolución molecular, inferencia de secuencias ancestrales y las pruebas de hipótesis evolutivas

MLE (Método máximo likelihood): Método preferido para estimación de parámetros en estadística, indispensable para muchas técnicas de modelado estadístico como el modelado no-lineal con datos que no siguen una distribución normal, la meta es deducir la forma de un proceso al probar la viabilidad del modelo.

μL: Microlitros

pb: Pares de bases

pol: gen de la polimerasa

RI: Respuesta inmune

Secuencia nucleotídica: Secuencia de ADN o secuencia genética es una sucesión de letras representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN o banda

TCR: Receptor de células T

TLR: Receptor de linfocito T

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

SI: sistema inmune

ANEXO 1.

MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras sanguíneas: suero y plasma

MATERIAL DE LABORATORIO

Tubos con y sin anticoagulante

Tubos al vacío

Adaptador de plástico para tubo al vacío

Jeringas de 3 mL y agujas de calibre 22G

Torundas con alcohol y benzal

Máquina rasuradora

Centrífuga marca Rolco®

Micropipetas y pipetas tipo Pasteur

Tubos Eppendorf y tubos cónicos de 20 mL

Puntas para micropipetas de diferente volumen (10, 20, 100, 200, 500, 1000 μ L).

Hisopos estériles

Portaobjetos

Vórtex

Autoclave

Campana de flujo laminar

Termociclador

Transiluminador de luz UV con fotodocumentador

Cámaras de electroforesis horizontal y vertical

Cameras de transferencia para Western blot húmeda y semihúmeda

Fuente de poder

REACTIVOS

1. Solución de Lisis para extracción de células mononucleares (Lisis I y Lisis II; Solución lisis I ($MgCl_2$ 5Mm) y solución de lisis II ($MgCl_2$ 5mM + 0.1% NONIDET ND-40))
2. PBS Estéril y Agua Bidestilada
3. Solución de Hanks
4. Metanol y acetona

MATERIAL PARA SEROLOGÍA

Muestras de suero y plasma

Se trabajó con un lote de 100 muestras de suero y plasma de gato previamente obtenidos y mantenidos a $-20^{\circ} C$.

Antígeno vacunal. Se utilizó la proteína de la vacuna recombinante Leucogen® (Virbac) que contiene el antígeno de envoltura del FeLV responsable de la respuesta protectora inmune (p45 parte proteica de la glucoproteína gp70) del subtipo viral A.

EQUIPO DE LABORATORIO

Serología

Equipo para electroforesis y electrotransferencia vertical Marca Biorad: Kit que incluye cámaras, vidrios, membranas, fuente de poder.

Membrana de nitrocelulosa marca Gibco

Papel filtro 3 mm

Fibra Scotch bride

Multicarril plástico para evaluación de membranas

Agitador

Parafilm

BIOLOGÍA MOLECULAR

Termociclador

Campana de Flujo Laminar

Microcentrífuga

Micropipeta

Cámara de electroforesis horizontal Marca Life Technologies

Fuente de Poder

Transiluminador Luz UV

Cámara fotográfica Nikon.

REACTIVOS.

GEL SEPARADOR 12%:

Para 1 gel

1.675 ml Agua destilada

1.25 ml Tris base 1.5 M pH 8.8

50 μ l SDS stock 10%

2 ml Acrilamida-Bis (stock 30%)

25 μ l Persulfato de amonio 10% (100mg/ml)

2.5 μ l TEMED

GEL CONCENTRADOR 4%:

Para 1 gel

1.5 ml Agua destilada

0.625 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

25 μ l SDS stock 10%

0.325 ml Acrilamida-Bis (stock 30%)

12.5 μ l Persulfato de amonio 10% (100mg/ml)

2.5 μ l TEMED

BUFFER DE LISIS (100 μ l) (conservar a 4°C):

DMSO 1.25 ml

PMSF 0.21775

Deoxycholic acid (DOC) 0.1 g

RIPA 9.8 ml

BUFFER DE MUESTRA 2x:

Tris HCl pH 6.8 (0.08 M) 3.5 ml 0.5 M

SDS (2%) 4ml 10%

glycerol (10%) 2ml

DTT (Dithiothreitol) (0.1 M) 0.308 gr

Azul de bromofenol

Llevar a 10 ml con agua bidestilada.

BUFFER DE CORRIDA 5x p.H 8.3 (Usar a 1x):

Tris base 1.5 M p.H 8.8 7.5 g

Glicina 36 g

SDS 2.5 g

Agua bidestilada Aforar a 500 ml

BUFFER DE TRANSFERENCIA:

Metanol 150 ml

Electrodo buffer 10x 150 ml

Agua bidestilada 450 ml

SDS 0.075 gr

BUFFER DE BLOQUEO:

PBS 20 ml

Leche (5%) 1 gr

BUFFER DE LAVADO:

PBS 500ml

Tween 20 (0.2%) 1 ml

PBS TWEEN (0.1%):

PBS 500 ml

Tween 0.5 ml

BUFFER DE DILUCIÓN:

Buffer de lavado 20 ml

Leche (5%) 1 gr

REVELADOR:

Diaminobencidina (0.05%) 0.010 gr

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (0.05%) 10 ml

PBS 15 ml

BUFFER DEL ANTÍGENO pH 9.6:

Na₂CO₃ (0.015 M) 1.59 g

NaHCO₃ (0.0033 M) 2.93 g

Agua bidestilada Aforar a 50 ml

Ajustar pH a 9.6

SUSTRATO:

Solución A 5ml

Solución B 5 ml

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 4 μ l

OPD 4 mg

SOLUCIÓN DE PARO:

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 55.17 ml

Agua destilada 994.83 ml

ANEXO 2.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES. Método descrito por Clara Gorodezky 1991.

Obtención de DNA a partir de sangre periférica: Lisis y obtención de núcleos

1. Vaciar 20 mL de sangre a un tubo marcado de 50 mL.
2. Centrifugar a 3,000 rpm/ 4800g (durante 15 minutos a 4°C y separar el plasma
3. Con una pipeta pasteur desechable transferir cuidadosamente la capa de células blancas a otro tubo (no importa pasar también algunos eritrocitos).
4. Agregar solución de lisis 1 hasta llenar el tubo, agitar suavemente.
5. Centrifugar a 4,800,000 (ponerlo en g) durante 15 minutos a 4°C y desechar cuidadosamente el sobrenadante.
6. Repetir los pasos 3 y 4 hasta que queden las células blancas libres de eritrocitos (generalmente con 2 lisis es suficiente)
7. Al paquete de células blancas se les agrega solución de lisis II, se agita para desprender el paquete. Se completa el volumen del tubo con la solución de lisis II.
8. Centrifugar a 4800grpm durante 15 minutos a 4°C. Desechar cuidadosamente el sobrenadante. En el fondo del tubo se encuentra el pellet de núcleos. Después de este paso, pueden congelarse los núcleos a -20°C o -80°C o continuar la extracción por cualquiera de los métodos descritos. En el caso de congelar, se puede hacer directamente en los mismos tubos en los que se ha trabajado. No se debe descongelar hasta el momento en que se realice la extracción del DNA. También es importante señalar que la extracción se puede hacer a partir de sangre total o de medula ósea.

REACTIVOS

Solución de LISIS I

MgCl₂ 5Mm

Solución de LISIS II

MgCl₂ 5Mm

NONIDET (NP-40) 0.1%

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

Para determinar la proteína se utilizó el micrométodo Bradford. Para lo cual se preparó una solución estándar de proteína de 10 mg/mL de gammaglobulina (γGB) para realizar una dilución 1:10 30 μL/270 μL de Con la solución de trabajo se hicieron las siguientes diluciones mostradas en la tabla 6 las cuales se trabajaron por pares.

Cuadro 10. Diluciones realizadas para determinar la proteína.

μg	μl YGB de 1mL/mL	μL SS
0	0	80
	0	80
1	4	76
	4	76
2	8	72
	8	72
4	16	64
	16	64
8	32	48
	32	48
16	64	16
	64	16

Se realizó una dilución de 1:25 de la vacuna en SS (4 µL vacuna en 96 µL SS) realizando al mismo tiempo una dilución de la solución Bradford 1:5 (1.2 mL sol. Bradford en 4.8 mL SS). Posteriormente se hicieron diluciones 1:10, 1:50 y 1:70 de la vacuna con SS. Se utilizó una placa de 96 pozos para colocar 20 µL de muestra problema y 180 µL de solución Bradford; posteriormente, se realizó la lectura de la curva de proteína a 570 nm de densidad óptica. Se guardaron a 4°C las alícuotas para utilizarlas posteriormente.

De esta curva se realizaron los cálculos y se determinó que el antígeno vacunal tiene 6.6 µg/20 µL de proteína.

Método de Electroforesis de antígeno vacunal y transferencia de proteínas (Western blot).

Para la extracción de proteínas. Extracción de proteínas: 1. Añadir la muestra del antígeno vacunal a partes iguales (400 µL de buffer de lisis más buffer de muestra (200+200) y 400 µL de antígeno vacunal de FeLV.

2. Homogenizar y guardar en refrigeración hasta su uso, por lo menos una hora antes.

3. Preparar el gel de poliacrilamida: Montar los geles. Espesor del gel 1 mm (estándar, Biorad 461502)

4. Sacar del refrigerador: el TEMED (mantener en hielo), tris Base, la acrilamida al 30% y PSA. Y preparar en un tubo de precipitados la siguiente mezcla.

PROCEDIMIENTO ELECTROFORESIS

Gel separador (12%)	1 GEL	2 GELES
Agua destilada mL	1.675 mL	3.350
Tris Base 1.5 M pH 8.8	1.25 mL	2.5 mL
SDS Stock 10%	50 μ L	100 μ L
Acilamida-BIS (Stock 30%)	2 mL	4 mL
*PSA 10% (100 mg/mL)	25 μ L	50 μ L
*TEMED	2.5 μ L	5 μ L

Se aísla de la presión atmosférica y se agrega inmediatamente isopropanol.

5. Una vez polimerizado, quitar el agua de la parte superior, lavar bien con pipeta y agua destilada en fregadero y secar bien con papel filtro sin tocar el gel, cuidando que no se rompa.

6. En otro tubo de precipitados preparar la siguiente mezcla.

GEL CONCENTRADOR (4%)		
Agua destilada	1.5 mL mL	3
Tris HCL 0.5 M pH 6.8	0.625 mL mL	1.250
SDS Stock 10%	25 μ L μ L	50
Acilamida-BIS (Stock 30%)	0.325 mL mL	0.650
*PSA 10% (100 mg/mL)	12.5 μ L μ L	25
*TEMED	2.5 μ L	5 μ L

Se coloca el peine de inmediato, evitando que se formen burbujas.

7.- Determinar la concentración de proteínas para cargar por carril.

8.- Montar el gel en la cámara y utilizar en la parte interna buffer de corrida nuevo hasta llenarlo y en la parte externa usado (hasta 2 veces) por arriba del electrodo. Para geles de 0.75 mm llenar la cámara externa con buffer de corrida

5.- Antes de cargar las muestras agregar el volumen a cargar con igual volumen de buffer desnaturizante. Si al comenzar la corrida, la muestra se asienta o se derrama un poco, agregar un poco más de muestra.

6. Cargar los geles siempre poniendo un marcador de peso molecular. Page Ruler Fermentas 8 μ l

7.- Correr a 100 V por gel durante 2 horas 30 minutos (aumentar el voltaje si es necesario). Se coloca 160 μ L de muestra antígeno vacunal inicial, se corre 10 minutos y se agregan los 320 μ L restantes en los pocillos correspondientes.

Transferencia de proteínas a membranas e inmunoblot.

Transferir en frío con mosquita en agitación y un recipiente helado por 1 hora y 20 minutos.

4.- Una vez obtenida la membrana con las proteínas lavado 5 veces con PBS TWEEN por 5 minutos

5.- Bloquear con leche al 5 % a 37°C en agitación y/o toda la noche a 4°C.

6.- Al finalizar la incubación se lavó 5 veces en agitación con buffer de lavado y se dejó secar en el agitador.

7.- Una vez seca, se cortó en tiras de 3 mm que se colocaron en carriles para procesarse por separado

- 8.- Preparar las muestras a evaluar (descongelación previa), colocar el anticuerpo primario (suero de muestra) en buffer de dilución 1:50 es decir 980 μL de buffer dilución más 20 μL de muestra de suero en agitación 1 hora a 37°C.
- 9.- Lavar 4 veces con PBS-T durante 5 min en cada una y una última con PBS solo.
- 10.- Agregar el 2° anticuerpo acoplado a HRP (1:1000; 8 μL de Anticuerpo cabra anti gato y 8 mL de buffer dilución) e incubar 1 hora a 37°C en agitación.
- 11.- Lavar 4 veces con PBS-T durante 5 min. Y 1 sola vez con PBS.
- 12.- Finalmente, adicionar el reactivo de revelado de diaminobencidina (0.05%) pesando 0.010 g de DAB más 10 μL de Peróxido de hidrógeno y disuelto en 15 mL de PBS (Homogenizar y filtrar) .
- 13.- Poner a secar y determinar la presencia de banda en 70kDa por seropositiva.

Figura 21. Inmunolectrotransferencia (western blot)

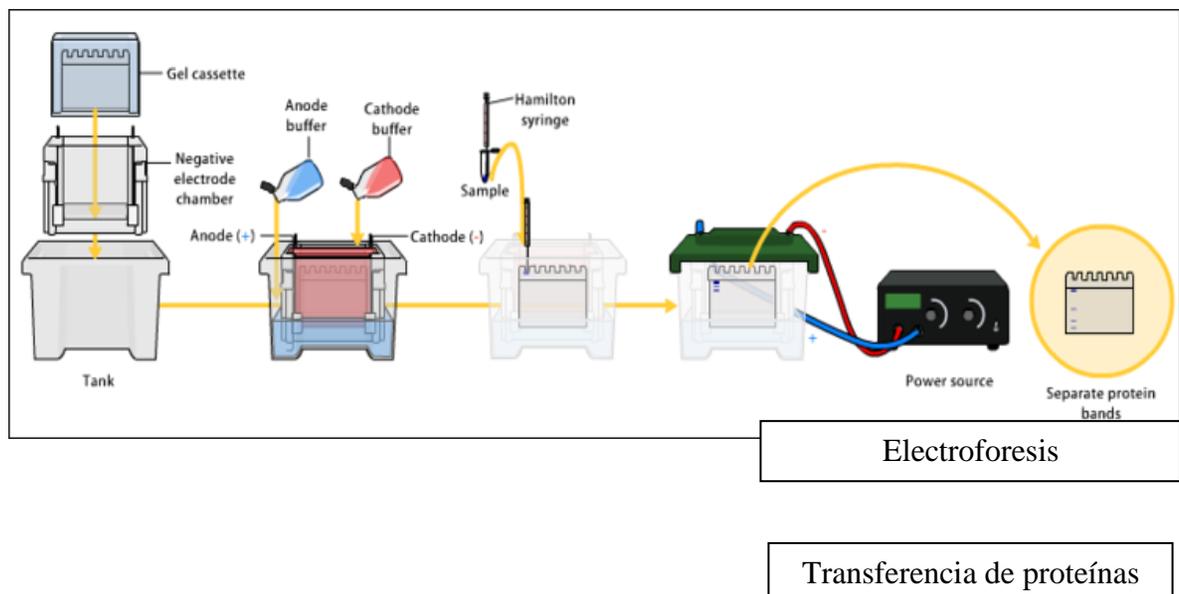
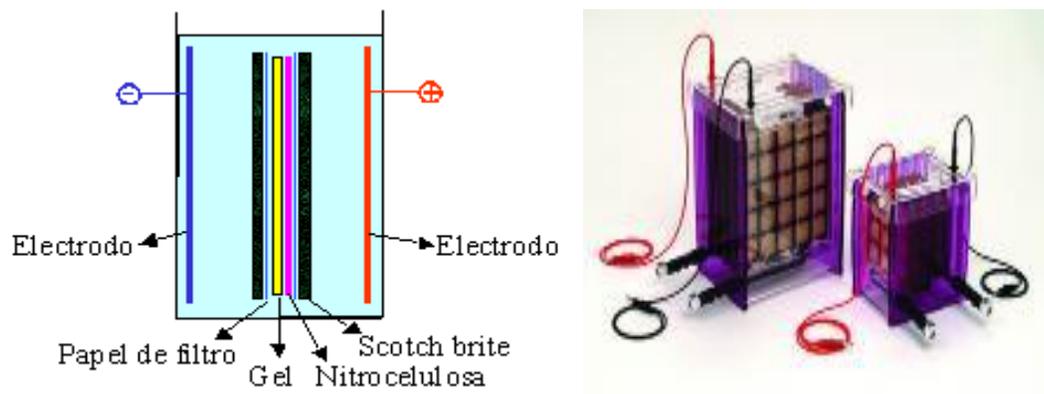


Figura 22. Transferencia de proteínas (Armado y estructura)



ELISA INDIRECTA

Para organizar los sueros problema , se sensibilizaron placas Nunc F Maxisorp® de 96 pozos con 50 μL de antígeno del virus del Leucemia viral felina a una concentración de 6.6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ de proteína/pozo, disuelto en buffer del antígeno (figura 21).

Figura 23. Placa ELISAI



Cuadro 11 .Parámetros estadísticos de absorbancia del grupo seropositivo

N	100
MEDIA	1.512
DESVEST	0.997
CV	65.93
EEM	0.10

Sin embargo, al dividir la absorbancia de cada grupo por edades, observamos el CV menor a 50%, lo cual indica confianza en la prueba y que a pesar de que el CV de la población total es de 66%, al dividirlo por edades el parámetro indica que dentro de los grupos la variación es mínima. Se observan en las tablas 6- (Apéndice) los resultados de los parámetros estadísticos esenciales de las absorbancias en los grupos por

Cuadro 12. Densidad óptica del suero y plasma evaluados en gatos de 6-11 meses.

GATO	POSITIVOS
	ABSORBANCIA
1	3.291
2	3.335
3	2.135
4	2.456
5	2.865
6	1.336
8	1.802
9	2.276
10	3.476
11	1.986
12	3.378
13	1.219
14	1.764
15	3.476
16	1.557
17	2.077
18	1.819
19	1.655
20	3.196
21	1.057
22	3.476
23	2.798

Cuadro 13 .Densidad óptica del suero y plasma evaluados en gatos de 1-3 años.

1-3 años		POSITIVOS		NEGATIVOS	
GATO	ABSORBANCIA	GATO	ABSORBANCIA	GATO	ABSORBANCIA
2	2.837	9	0.933		
6	1.944	10	0.397		
8	2.356	31	0.831		
21	1.457	45	0.991		
23	2.818	47	0.076		
26	2.428	67	0.529		
28	1.516	64	0.838		
29	1.938	68	0.626		
30	1.970	69	0.523		
43	2.537	70	0.554		
46	1.293	71	0.625		
48	1.266	72	0.759		
49	2.388	73	0.472		
50	1.478	84	0.406		
51	1.516	86	0.523		
52	1.287	87	0.483		
53	2.545	96	0.179		
55	2.478	97	0.873		
56	1.916				
57	3.077	N	18		
58	1.657	MEDIA	0.590		
59	1.800	DESVEST	0.249		
60	2.564	coef variac	42.20		
61	1.734	ee	0.06		
62	3.476				
63	2.307				
65	3.122				
66	1.557				
76	1.534				
79	1.566				
100	1.990				

Cuadro 14. Densidad óptica del suero y plasma evaluados en gatos de 4-8 años.

4-8 años		POSITIVOS		NEGATIVOS	
GATO	ABSORBANCIA	GATO	ABSORBANCIA	GATO	ABSORBANCIA
4	1.635	80	0.532		
32	1.596	82	0.759		
33	1.876	89	0.023		
35	1.179	94	0.458		
98	1.307	95	0.542		
N	5	N	5		
MEDIA	1.519	MEDIA	0.463		
DESVEST	0.277	DESVEST	0.270		
coef variac	18.25	coef variac	58.40		
ee	0.12	ee	0.12		

Cuadro 15. Densidad óptica del suero y plasma evaluados en gatos de 9-12 años.

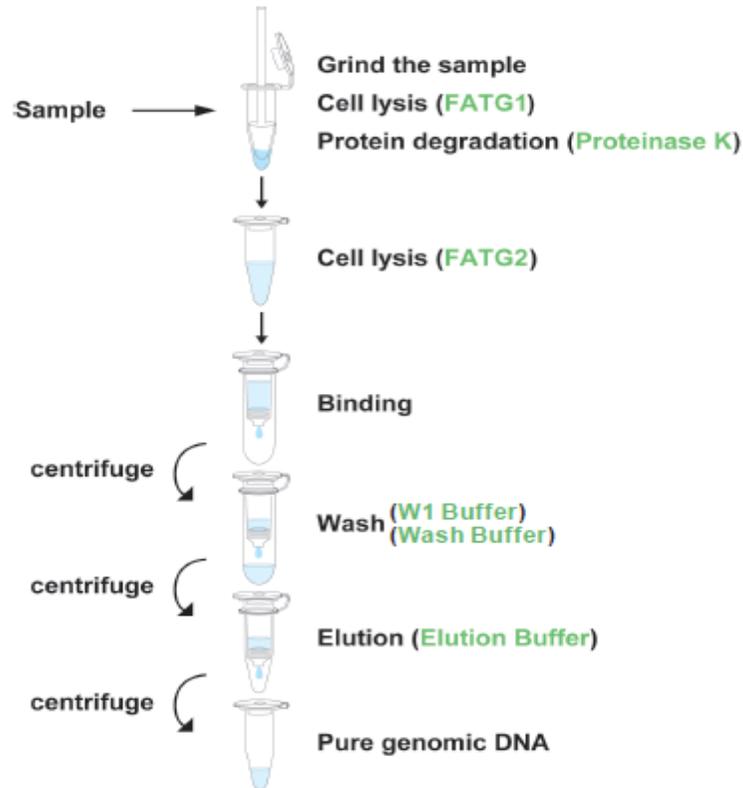
9-12 años		POSITIVOS	
GATO	ABSORBANCIA	GATO	ABSORBANCIA
11	1.418		
16	1.557		
18	1.819		
22	3.476		
N	4		
MEDIA	2.067		
DESVEST	0.954		
coef variac	46.13		
ee	0.48		
ic	0.93		
lcs	3.002		
lci	1.133		
valor max	3.476		
valor min	1.418		

Cuadro 16. Densidad óptica del suero y plasma evaluados en gatos >13 años.

>13 años	POSITIVOS		NEGATIVOS	
GATO	ABSORBANCIA	GATO	ABSORBANCIA	
25	3.091	93	0.867	
37	1.088	85	0.141	
		88	0.234	
		91	0.138	
N	2	N	4	
MEDIA	2.090	MEDIA	0.345	
DESVEST	1.416	DESVEST	0.351	
coef variac	67.78	coef variac	101.76	
ee	1.00	ee	0.18	
ic	1.96	ic	0.34	
lcs	4.052	lcs	0.689	

ANEXO 2.Extracción de DNA.

Figura 24. Protocolo para extracción de ADN Invitrogen®



PASO 1. Para células en crecimiento o suspensión: transferir el tubo completo con células a tubo Eppendorf y centrifugue a 4800 g por 15 minutos.

Remueva por completo y cuidadosamente el sobrenadante.

1. Agregar 200 μL de buffer FATG1 y homogenizar la muestra de tejido y completar con el micropestillo.

PASO 2: LISIS

1. Agregar 20 μL de Proteínasa K (10 mg/mL) a la mezcla de la muestra obtenida. Mezcle generosamente por agitación.

2. Incubar hasta 60°C hasta que el tejido se lise completamente: en las células por 15 minutos.
3. Centrifugación breve del tubo para remover los residuos por dentro de la tapa
4. Agregar 200 µL de buffer FATG2 a la mezcla de la muestra y mezclar a fondo con el vórtex pulsado e incubar a 70°C por 10 minutos.
5. Centrifugar brevemente el tubo para remover los residuos dentro de la tapa. Si existe material insoluble presente, centrifugar a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

PASO 3: UNIÓN AL DNA

7. Agregar 200 µL de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar a fondo con vórtex.
8. Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas por dentro del tubo que quedan en el interior de la tapa.
9. Colocar una mini columna de FATG en un tubo colector, transferir la mezcla de la muestra (incluyendo cualquier precipitado) cuidadosamente a la columna.
10. Centrifugar por 1 minuto y desechar el flujo a través de ella, después colocar la columna de FATG en un tubo nuevo.

PASO 4. LAVADO

11. Lavar la columna de FATG con 500 µL de buffer W1, centrifugar 1 minuto y desechar el restante. Asegurar que el etanol añadido al buffer W1 fue añadido por primera vez.

12. Lavar la columna FATG con 750 μL de buffer de lavado y centrifugar 1 minuto, desechar el restante y centrifugar la columna adicionalmente por 3 minutos para secarla misma.

PASO 5. ELUCIÓN DEL DNA (HOMOGENIZACIÓN)

13. Colocar la columna de FATG en el tubo de elución y añadir 50-2 100 μL de buffer de elución o agua desionizada (pH 7.5-8.5) al centro de la membrana de la columna FATG, esperar 3 minutos.

14. Centrifugar por 2 minutos para eluir el DNA total en un volumen final de 25 μL .

Repetir el paso 16 por 3 ocasiones.

15. Conserve el DNA total a 4°C o -20°C. Para una elución efectiva, asegurarse que la solución de elución sea colocada en el centro de la membrana y se absorba por completo. El volumen estándar de elución (50-150 μL) es de 200 μL . Si la muestra de tejido tiene baja cantidad de células, reduzca el volumen de elución para incrementar la concentración de DNA.

TÉCNICA DE PCR. Se utilizaron las siguientes condiciones:

Cuadro 17 .Gen *pol*/ producto esperado 790 nucleótidos

Reactivos	Concentración inicial requerida	Concentración final
Agua desionizada		
Buffer 10X	10X	1X
D´NTPS	10 mM	225 µM
Mg Cl ₂	30 Mm	1.5 mM
Primer Fw pol	10 µm	600 nM
Primer Rv pol	10 µm	600 nM
Taq polimerasa	5 U/µL	0.04 U
DNA		1000 ng

Reacción	Temperatur	Tiempo
Desnaturalización	94°C	5 minutos
Desnaturalización	94°C	1minuto
Alineación**	55°C	50 segundos
Extensión	72°C	50 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos

45 ciclos**

Cuadro 18. Gen *env* producto esperado de 508 nucleótidos

Reactivos	Concentración inicial requerida	Concentración final
Agua desionizada		
Buffer 10X	10X	1X
D´NTPS	10 mM	225 µM
Mg Cl ₂	30 Mm	1.5 mM
Primer Fw <i>env</i>	10 µm	600 nM
Primer Rv <i>env</i>	10 µm	600 nM
Taq polimerasa	5 U/µL	0.04 U
DNA		1000 ng

Reacción	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	5 minutos
Desnaturalización	94°C	1 minuto
Alineación**	54°C	45 segundos
Extensión	72°C	50 seegundos
Extensión final	72°C	10 minutos

45 ciclos*

ANEXO 3.

CROMATOGRAMAS. Chromas Versión 2.23 LTD®

Figura 25. Cromatograma para región *pol*

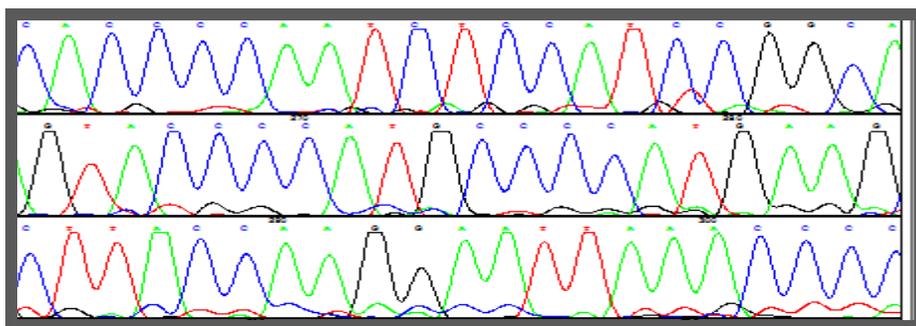
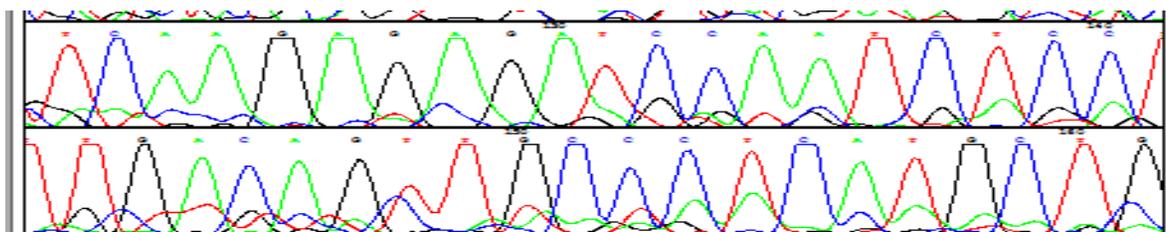


Figura 26. Cromatograma para región *env*



Cuadro 27. Números de acceso de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la base de datos del GenBank.

Número de acceso	Nombre de la secuencia y país
AY364319	En FELV GGAG USA
AY364318	En FELV AGTT USA
M18246	Genotipo T SUIZA
M18247	FELV-FAIDS USA
AB674444	ERVDC-10 JAPÓN
AB060732	Japon 33 JAPON
AB672612	pJ7E2 SUIZA
AF052723	FeLV Rickard A USA
EU030001	RD114 Sc3c USA
JF957361	2518 Glasgow SUIZA
JF93190	Gamma retrovirus 1 KOREA
JF93191	Gamma retrovirus 2 KOREA
JF93192	Gamma retrovirus 3 KOREA
JF93193	Gamma retrovirus 4 KOREA
JF93194	Gamma retrovirus 5 KOREA
JF93195	Gamma retrovirus 6 KOREA
JF93196	Gamma retrovirus 7 KOREA
JF93198	Gamma retrovirus 9 KOREA
JF93199	Beta retrovirus 1 KOREA
JF93197	Gamma retrovirus 8 KOREA
L06140	Recombinante B/C KOREA
L06140.1	CATFELV P KOREA
JO3448	Subtipo B USA
AF403716	E5.14 SUIZA
JF939197	Gamma 8 No funcional USA
V01172	Gardner-Arnstein FeLV B UK
X00188	Gardner-Arnstein FeLV -B UK
JF957363	4314 USA

1. **Aguado, S.** 2009. Revisión bibliográfica del diagnóstico de Leucemia Viral felina. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura.
2. **al., M. e.** 2008. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *Journal of General Virology*. **89**: 2799-2805.
3. **????al., M. F. e.** 2007. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio Janeiro, Brazil. . *Vet Parasitol* **147**:9-15.
4. **???al., N. P. N. e.** 2004. Review Human endogenous retroviruses: Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol*.**138**.
5. **????al., R. e.** 2003. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Retrovirus Testing and Management. . *Journal of Feline Medicine and Surgery* **5**: **3**.
6. **???al., S. e.** 2013 Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in *silico* data analysis *Journal of General Virology*. **94**:1587–1596.
7. **????al., S. e.** 2012. Identification of novel subgroup A variants with enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus. *Retrovirology*. **9**:**48**.

8. **Alvárez, M.** 2011. Estudio serológico de las enfermedades virales en felinos domésticos de la ciudad de Nayarit. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Morelia. Tesis de Licenciatura
9. **Alvira R, M. H.** 1993. Hallazgos serológicos de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia viral felina (VIF) en gatos de la ciudad de Santafé de Bogotá .Tesis de pregrado.
10. **Arjona A, E. E., Soto I, Barquero N, Martin D, Gómez L.** 2002. Estudio seroepidemiológico de la leucemia e inmunodeficiencia felinas en Madrid ; Med Vet **17(3)**::75-83.
11. **Ayala M, T. T., Castillo C, Gerardi G, Hernández J, Benedito J.** 1998. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida del gato causado por el Virus de Inmunodeficiencia Felina. ; , p. 5-12., Arch Med Vet, vol. 30(1).
12. **Bandecchi P, D. O. M., Magi M, Palamidessi A, Prati M** 2006. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. Vet Rec **158**:555-557.
13. **Beatty, A. e. a.** 2011. Markers of feline leukaemia virus infection or exposure in cats from a region of low seroprevalence. Journal of Feline Medicine and Surgery **13**:927-933.
14. **Benavides H, M. R.** 1996-1999. Presente y futuro de la leucemia viral felina y del virus de inmunodeficiencia adquirida felina en Santa Fe de Bogotá. Colombia. Tesis de Maestría.
15. **Brock, D.** 1988. Clínica y Diagnóstico Microbiológico. Biología de Microorganismos. Prentice Hall. p. 488-489, vol. 13.

16. **Campos, T. P. R.** 2011. México: Las mascotas en nuestros hogares. Encuesta nacional, Consulta Mitofsky.
17. **Cardénas, G.** 2005. Frecuencia y factores de riesgo de lesiones mamarias en perros y gatos con diagnóstico citológico de la Ciudad de México. Universidad Michoacana de San Nicolas Hidalgo, México. UNAM. FMVZ. Tesis de licenciatura.
18. **Carrión, L.** 2012. Evaluación de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina utilizando la proteína gp70 (epítoto p45). México. UNAM. FES Cuautitlán. Tesis de Licenciatura.
19. **Chang-Fung-Martel, e. a.** 2013. A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb. *Journal of Feline Medicine and Surgery*.
20. **Cheng H, e. a.** 2006. Envelope Determinants for Dual-Receptor Specificity in Feline Leukemia Virus Subgroup A and T Variants. *Journal of virology* **Vol. 80, No. 4**:1619–1628
21. **Chhetri BK, B. O., Pearl LD, Bienzle D.** 2013. Comparison of the geographical distribution of FIV and FeLV infections in the USA (2000-2011). *BMC Veterinary Research*. **9:2**.
22. **Danner RM, G. D., Hess SC, Banko PC.** 2007. Evidence of feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, and *Toxoplasma gondii* in feral cats on Mauna Kea, Hawaii. *J Wildl Dis* **43**:315-318.
23. **Doménech A, M. G., Collado VM, Ballesteros N, Sanjosé L, Escolar E, Martin S, Gomez-Lucia E.** 2011. Use of recombinant interferon omega in feline retrovirois: from theory to practice. *Vet Immunol Immunopathol* **143(3-4)**:301-6.

24. **Driscoll, C. A. M., D.W.; O'Brien, S.J.** 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**:9971-9978.
25. **Elder, J. e. a.** 1983. Nucleotide Sequence of the Envelope Gene of Gardner-Armstein Feline Leukemia Virus B Reveals Unique Sequence Homologies with a Murine Mink Cell Focus-Forming Virust. *Journal of virology*, **vol. 46, no. 3**: 871-880.
26. **Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Version 3.5c. , University of Washington, Seattle.
27. **Fonseca, A.** 2007. Diagnóstico Inmunohistoquímico de Leucemia viral felina en tejidos de gatos con linfosarcoma. UNAM, Mexico.FMVZ. Tesis de licenciatura.
28. **Fujino Yasuhito , O. K., Tsujimoto Hajime** 2008. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. **123**. p.138–143.
29. **Gleich SE, K. S., Hartmann K.** 2009. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg* **11**:985-992.
30. **Hall, T. A., et al.** 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. p. 95-98, vol. **41**.
31. **Hardy WD Jr, Z. E.** 1991. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc.* **199(10)**:1365-73.

32. **Hedges, S. B.** 1992 The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol.* **9** (2):366-369.
33. **Hellard E, F. D., Santin-Janin H, Tarin B, Badol V, Coupier C, Leblanc G, Poulet H, Pontier D:** . 2011. When cats' ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Prev Vet Med* **101**:250-264.
34. **Herring I P., T. G., Toth TE , Champagne ES, Pickett SJ and Haines DM.** 2001. Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Veterinary Ophthalmology.***42**: 119–126.
35. **Hofmann-Lehmann Regina, H. J. B., Gruber Sabine , Boretti Felicitas, Sigrist Brigitte, and a. H. Lutz.** 2001. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of General Virology* **82**: 1589–1596.
36. **Jackson L, H. M., Taylor F.** 1996. 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* **8**:25-30.
37. **James, R.** 2003. Report of the American Association of feline practitioners and Academy of feline Medicine Advisory Panel on Feline Retrovirus Testing and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* **5**:3.
38. **Jiménez S, M. W.** 2003. Manejo, restricción química, valoración hematológica y aproximación al diagnóstico de retrovirus felinos en cinco especies de félicos silvestres en cautiverio Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Licenciatura.

39. **Kanafany, G.** 2005. Frecuencia del virus de Leucemia viral felina en tres laboratorios de la ciudad de México del año 2002 al 2005. UNAM. FMVZ México. Tesis de licenciatura
40. **Katrin, H.** 2012. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review *Viruses* **4**:2684-2710.
41. **Kessler MR, T. D.** 1999. Effects of density and cage size on stress in domestic cats (*Felis Sylvestris catus*) housed in animal shelters and boarding catteries. *Anim Welf* **8**:259-267.
42. **Landis JR, K. G. (ed.).** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. , vol. 33.
43. **Levy J, S. M., Lachtara J, Crawford C.** 2006. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factor for seropositivity. . *J Am Vet Med Assoc* **228(3)**:371-6.
44. **Levy LS G. O., Alvarez-Hernandez X., et al.** 2013. The surface glycoprotein of feline Leukemia Virus Isolate FeLV-945 Is a determinant of Altered Pathogenesis in the presence or Absence of the Unique Viral Long Terminal Repeat. *Journal of general Virology*. **11030-13**:108-117.
45. **Lickey A, K. M., Patton S, Ramsay E. .** 2005. Serologic survey of domestic felids in the Petén region of Guatemala. . *J Zoo Wildl Med*. **36(1)**:121-3.
46. **Lieber M M, S. C. J., Todaro G J, Benveniste R E, Callahan R, and Coon H G.** 1975. Isolation from the asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72(6)**:2315–2319.

47. **Liem, B. P. e. a.** 2013. Clinical Findings and Survival in Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus. *J Vet Intern Med* **54**; **No. 2**.
48. **Ludwig L, S. S., Tanner W.** 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int* **45**:6802–6818.
49. **Lutz H, A. D., Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones e.a.** 2009. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* **11**:565-574.
50. **Lynn SR, P. R., Jen W-CH, Roy-Burman P.** 1993. Recombinant Feline Leukemia Virus Genes detected in Naturally occurring Feline Lymphosarcomas. *Journal of Virology*:3118-3124.
51. **McDougall, T. A.** 1994. Defective Endogenous Proviruses Are Expressed in Feline Lymphoid Cells: Evidence for a Role in Natural Resistance to Subgroup B Feline Leukemia Viruses. *Journal of Virology* **Vol. 68, No. 4**:2151-2160.
52. **Miyazawa, T., Jarrett O.** 1997. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Archives of Virology* **142**:323-332.
53. **Nakamura m, e. a.** 2010. Differential Diagnosis of Feline Leukemia Virus subgroups using Pseudotype Viruses Expressing Green Fluorescent Protein *J. Vet. Med. Sci.* **72(6)**:787–790.
54. **Norris J, e. a.** 2007. Prevalence of immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. *J Feline Med Surg* **9**:300-8.
55. **O'Brien SJ, e.a.** 2012. Review Emerging Viruses in the Felidae: Shifting Paradigm Viruses **4**: 236-257

56. **Oswald, J.** 1999. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology* **69** 99-107.
57. **Page, R. D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. p. 357-358, vol. 12 (4).
58. **Palmera ML, C. V. (ed.).** 2010. Enfermedades Infecciosas Felinas. vol. 1. Editorial Servet. Barcelona
59. **Pandey R, e. a.** 1991. Recombination between Feline Leukemia Virus Subgroup B or C and Endogenous env Elements Alters the In Vitro Biological Activities of the Viruses. *Journal of Virology*. **Vol. 12, No.57**:6495-6508.
60. **Polani Sagi, R. A. L.** 2010. Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology* **405** 397–407.
61. **Robert-Tissot C, e. a.** 2011. The innate antiviral immune system of the cat: Molecular tools for the measurement of its state of activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **143**.269– 281.
62. **Roca, A. e. a.** 2005. Insertional Polymorphisms of Endogenous Feline Leukemia Viruses. *Journal of virology* **Vol. 79, No. 7**:3979–3986
63. **Roca Alfred, I. e. a.** 2004. Genomically intact endogenous feline leukemia viruses of Recent origin. *Journal of virology* **vol. 78, no. 8**:4370–4375
64. **Saiki RK, e. a.** 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487.

65. **Saitou, N., Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4 (4)**:406-425.
66. **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol* **28**:2731–2739.
67. **Tandon Ravi, C. V., Pepin Andrea C., Riond Barbara, Mel L. Marina , McDonald Mike ,G. Doherr Marcus , Hans Lutz, Hofmann-Lehmann Regina.** 2008. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research.* **135**: 136–143.
68. **Thompson, J. D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, DG.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25 (24)**:4876-4882.
69. **Van der kuyl, A. e. a.** 1999. Discovery of a New Endogenous Type C Retrovirus (FcEV) in Cats: Evidence for RD-114 Being an FcEVGag-Pol/Baboon Endogenous Virus BaEVEEnv Recombinant *Journal of virology,* **Vol. 73, No. 10**:p. 7994–8002.
70. **Watanabe Shinya, T. H., Kyohei Kuse, Yuka Odahara , Haruyo Ochi, and Kazuo Nishigaki, Jumpei Ito.** 2013. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus Env gene. *PLOS One.*
71. **Willett, B. J., and Hosie, M.J.** 2012. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. *Veterinary Journal.*

72. **Winkler L, L. M., Flower L.** 1999. Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats: Seroepidemiological analysis. *J Clin Microbiol* **37**:2848-51.
73. **Wolfgang Seifarth, O. F. e.a.** 2005 Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Transcriptional Activity in Human Tissues with a Retrovirus-Specific Microarray *Journal of virology*:341–352.
74. **Yasuhito Fujino, K. O., Tsujimoto, FE.** 2008. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **123**:138–143.
75. **Yukari Anai, H. O., Shinya Watanabe, So Nakagawa, Maki Kawamura, Takashi Gojobori, Kazuo Nishigaki** 2012. Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *Journal of Virology* **86(16)**:8634-44.
76. **Zagal NE , e. a.** 2011. Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina. UNAM. FES Cuautitlán Mexico. Tesis de licenciatura.
77. **Zander, R. H.** 2004. Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and Bayesian posterior probability. *Phyloinformatics* **2**: 1-13.
78. **Zinsser L, H. M.** 1994. Diagnóstico Viral Rápido, 20ed. vol. 62.
79. 2010. Anexo población animal mundial.
<http://www.census.gov/ipc/www/popclockworld.htm>
<http://www.census.gov/population/international/>

80. **Bande, F., S. S. Arshad, L. Hassan, Z. Zakaria, N. A. Sopian, N. A. Rahman, and A. Alazawy.** Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. *BMC Vet Res* **8**:33.
81. **Coelho, F. M., M. R. Bomfim, F. de Andrade Caxito, N. A. Ribeiro, M. M. Luppi, E. A. Costa, M. E. Oliveira, F. G. Da Fonseca, and M. Resende.** 2008. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *J Gen Virol* **89**:2799-805.
82. **Driscoll, C. A., J. Clutton-Brock, A. C. Kitchener, and S. J. O'Brien.** 2009. The Taming of the cat. Genetic and archaeological findings hint that wildcats became housecats earlier--and in a different place--than previously thought. *Sci Am* **300**:68-75.
83. **Frederick, A., M. Caporale, M. Varela, R. Biek, B. Chessa, A. Alberti, M. Golder, M. Mura, Y.-p. Zhang, L. Yu, F. Pereira, J. DeMartini, K. Leymaster, T. Spencer, and M. Palmarini.** 2007. A Paradigm for Virus--Host Coevolution: Sequential Counter-Adaptations between Endogenous and Exogenous Retroviruses. *PLOS Pathogens*.
84. **Fromont, E., M. Artois, M. Langlais, F. Courchamp, and D. Pontier.** 1997. Modelling the Feline Leukemia Virus (FeLV) in Natural Populations of Cats (*Felis catus*) *Theor Popul Biol* **52**:60-70.
85. **Fromont, E., D. Pontier, and M. Langlais.** 2003. Disease propagation in connected host populations with density-dependent dynamics: the case of the Feline Leukemia Virus. *J Theor Biol* **223**:465-75.
86. **Ito, J., S. Watanabe, T. Hiratsuka, K. Kuse, Y. Odahara, H. Ochi, M. Kawamura, and K. Nishigaki.** 2013. Refrex-1, a Soluble Restriction Factor against Feline Endogenous and Exogenous Retroviruses. *J Virol* **87**:12029-40.

87. **Jarrett, O.** 1999. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet Microbiol* **69**:99-107.
88. **Kumar, V. e. a.** 1989. Nucleotide Sequence and Distinctive Characteristics of the env Gene of Endogenous Feline Leukemia Provirus. *Journal of virology* **Vol. 63 No.5**: 2379-2384.
89. **Lehle, L., S. Strahl, and W. Tanner.** 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**:6802-18.
90. **Levy, J., J. Richards, D. Edwards, T. Elston, K. Hartmann, I. Rodan, V. Thayer, M. Tompkins, and A. Wolf.** 2003. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management. *J Feline Med Surg* **5**:3-10.
91. **Mendes-de-Almeida, F., N. Labarthe, J. Guerrero, M. C. Faria, A. S. Branco, C. D. Pereira, J. D. Barreira, and M. J. Pereira.** 2007. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* **147**:9-15.
92. **Nelson, P.** 2004. Review Human endogenous retroviruses: Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol* **138**.
93. **Salud, O. P. d. I.** 2009. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Curso de gestión de calidad y buenas prácticas de laboratorio. , vol. 2^a Ed., Washington D.C.
94. **Song, N., H. Jo, M. Choi, J. Kim, S. Geuk, C.-M. Se-Yeoun, S. Kunho, and C. Park.** 2013 Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in silico data analysis *Journal of General Virology*. **94**:1587–1596. .

95. **Stewart, H., K. W. Adema, E. L. McMonagle, M. J. Hosie, and B. J. Willett.** 2012. Identification of novel subgroup A variants with enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus. *Retrovirology* **9**:48.
96. **Tandon, e. a.** 2008. Mini review. Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology* . **123**:129–133.
97. **Zhang, W., and Z. Sun.** 2008. Random local neighbor joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Phylogenet Evol* **47**:117-28.

20. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguado, S.** 2009. Revisión bibliográfica del diagnóstico de Leucemia Viral felina. Universidad michoácana de San Nicolás Hidalgo, México.
2. **al., M. e.** 2008. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. . *Journal of General Virology*. **89**: 2799-2805.
3. **al., M. F. e.** 2007. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio Janeiro, Brazil. . *Vet Parasitol* **147**::9-15.
4. **al., N. P. N. e.** 2004. Review Human endogenous retroviruses: Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol*

5. **al., R. e.** 2003. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Retrovirus Testing and Management. . *Journal of Feline Medicine and Surgery* **5: 3**.
6. **al., S. e.** 2013 Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in silico data analysis *Journal of General Virology*. **94:1587–1596**. .
7. **al., S. e.** 2012. Identification of novel subgroup A variants with enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus. . *Retrovirology* **9:48**
8. **Alvarez, M.** 2011. Estudio serológico de las enfermedades virales en felinos domésticos de la ciudad de Nayarit. Universidad michoacana de San Nicolas Hidalgo, Morelia.
9. **Alvira R, M. H.** 1993. Hallazgos serológicos de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia viral felina (VIF) en gatos de la ciudad de Santafé de Bogotá [tesis de pregrado].
10. **Arjona A, E. E., Soto I, Barquero N, Martin D, Gómez L. .** 2002. Estudio seroepidemiológico de la leucemia e inmunodeficiencia felinas en Madrid. ; . *Med Vet* **17(3):75-83**.
11. **Ayala M, T. T., Castillo C, Gerardi G, Hernández J, Benedito J. .** 1998. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida del gato causado por el Virus de Inmunodeficiencia Felina. ; , p. 5-12., *Arch Med Vet*, vol. 30(1):.
12. **Bandecchi P, D. O. M., Magi M, Palamidessi A, Prati M** 2006. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. *Vet Rec* **158:555-557**.
13. **Beatty, A. e. a.** 2011. Markers of feline leukaemia virus infection or exposure in cats from a region of low seroprevalence

Journal of Feline Medicine and Surgery **13:927-933**.
14. **Benavides H, M. R.** 1996-1999. Presente y futuro de la leucemia viral felina y del virus de inmunodeficiencia adquirida felina en Santa Fe de Bogotá.
15. **Brock, D.** 1988. Clínica y Diagnóstico Microbiológico. *Biología de Microorganismos.*, p. 488-489, vol. 13. Prentice Hall.

16. **Campos, T. P. R.** 2011. México: Las mascotas en nuestros hogares. Encuesta nacional, Consulta Mitofsky.
17. **Cardénas, G.** 2005. Frecuencia y factores de riesgo de lesiones mamarias en perros y gatos con diagnóstico citológico de la Ciudad de México. Universidad Michoacana de San Nicolas Hidalgo, México.
18. **Carrión, L.** 2012. Evaluación de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina utilizando la proteína gp70 (epítotope p45). . Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), , MEXICO.
19. **Chang-Fung-Martel, e. a.** 2013. A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb. . Journal of Feline Medicine and Surgery.
20. **Cheng H, e. a.** 2006. Envelope Determinants for Dual-Receptor Specificity in Feline Leukemia Virus Subgroup A and T Variants. . Journal of virology **Vol. 80, No. 4:**1619–1628
21. **Chhetri BK, B. O., Pearl LD, Bienzle D. .** 2013. Comparison of the geographical distribution of FIV and FeLV infections in the USA (2000-2011). . BMC Veterinary Research. **9:2.**
22. **Danner RM, G. D., Hess SC, Banko PC. .** 2007. Evidence of feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, and Toxoplasma gondii in feral cats on Mauna Kea, Hawaii. . J Wildl Dis **43:**315-318.
23. **Doménech A, M. G., Collado VM, Ballesteros N, Sanjosé L, Escolar E, Martin S, Gomez-Lucia E.** 2011. Use of recombinant interferon omega in feline retrovirois: from theory to practice. Vet Immunol Immunopathol **143(3-4):**301-6.
24. **Driscoll, C. A. M., D.W.; O'Brien, S.J. .** 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. Proc. Natl. Acad. Sci. **106:**9971-9978.
25. **Elder, J. e. a.** 1983. Nucleotide Sequence of the Envelope Gene of Gardner-Armstein Feline Leukemia Virus B Reveals Unique Sequence Homologies with a Murine Mink Cell Focus-Forming Virust. . Journal of virology, **vol. 46, no. 3:** 871-880
26. **Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Version 3.5c. , University of Washington, Seattle.

27. **Fonseca, A.** 2007. Diagnóstico Inmunohistoquímico de Leucemia viral felina en tejidos de gatos con linfosarcoma. UNAM, Mexico.
28. **Fujino Yasuhito , O. K., Tsujimoto Hajime** 2008. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis
Veterinary Immunology and Immunopathology . **123** 138–143.
29. **Gleich SE, K. S., Hartmann K. .** 2009. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg* **11**:985-992.
30. **Hall, T. A., et al.** 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. .. p. 95-98, vol. 41.
31. **Hardy WD Jr, Z. E.** 1991. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats.
J Am Vet Med Assoc. **199(10)**:1365-73.
32. **Hedges, S. B.** 1992 The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol.* **9 (2)**:366-369.
33. **Hellard E, F. D., Santin-Janin H, Tarin B, Badol V, Coupier C, Leblanc G, Poulet H, Pontier D: .** 2011. When cats' ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Prev Vet Med* **101**:250-264.
34. **Herring I P., T. G., Toth TE , Champagne ES, Pickett SJ and Haines DM.** 2001. Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Veterinary Ophthalmology*
42: 119–126.
35. **Hofmann-Lehmann Regina, H. J. B., Gruber Sabine , Boretti Felicitas, Sigrist Brigitte, and a. H. Lutz.** 2001. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats
Journal of General Virology **82**:1589–1596.
36. **Jackson L, H. M., Taylor F. .** 1996. 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* **8**:25-30.

37. **James, R.** 2003. Report of the American Association of feline practitioners and Academy of feline Medicine Advisory Panel on Feline Retrovirus Testing and Management. . *Journal of Feline Medicine and Surgery*. **5:3**.
38. **Jiménez S, M. W.** 2003. Manejo, restricción química, valoración hematológica y aproximación al diagnóstico de retrovirus felinos en cinco especies de félidos silvestres en cautiverio [tesis de pregrado]. . Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
39. **Kanafany , G.** 2005. Frecuencia del virus de Leucemia viral felina en tres laboratorios de la ciudad de México del año 2002 al 2005. UNAM, México.
40. **Katrin, H.** 2012. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review
Viruses **4:2684-2710**.
41. **Kessler MR, T. D.** 1999. Effects of density and cage size on stress in domestic cats (*Felis Sylvestris catus*) housed in animal shelters and boarding catteries. *Anim Welf* **8:259-267**.
42. **Landis JR, K. G. (ed.).** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. , vol. 33.
43. **Levy J, S. M., Lachtara J, Crawford C. .** 2006. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factor for seropositivity. . *J Am Vet Med Assoc* **228(3):371-6**.
44. **Levy LS., G. O., Alvarez-Hernandez X., et al.** 2013. The surface glycoprotein of feline Leukemia Virus Isolate FeLV-945 Is a determinant of Altered Pathogenesis in the presence or Absence of the Unique Viral Long Terminal Repeat
Journal of general Virology. **11030-13:108-117**.
45. **Lickey A, K. M., Patton S, Ramsay E. .** 2005. Serologic survey of domestic felids in the Petén region of Guatemala. . *J Zoo Wildl Med*. **36(1):121-3**.
46. **Lieber M M, S. C. J., Todaro G J, Benveniste R E, Callahan R, and Coon H G.** 1975. Isolation from the asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72(6):2315-2319**.
47. **Liem, B. P. e. a.** 2013. Clinical Findings and Survival in Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus. . *J Vet Intern Med* **54; No. 2**.
48. **Ludwig L, S. S., Tanner W.** 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases.

. Angew Chem Int **45**:6802–6818.

49. **Lutz H, A. D., Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC . .** 2009. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* **11**::565-574.
50. **Lynn SR, P. R., Jen W-CH, Roy-Burman P..** 1993. Recombinant Feline Leukemia Virus Genes detected in Naturally occurring Feline Lymphosarcomas. . *Journal of Virology*.:3118-3124.
51. **McDougall, T. A.** 1994. Defective Endogenous Proviruses Are Expressed in Feline Lymphoid Cells: Evidence for a Role in Natural Resistance to Subgroup B Feline Leukemia Viruses
Journal of Virology
Vol. 68, No. 4:2151-2160.
52. **Miyazawa, T., Jarrett O.** 1997. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Archives of Virology* **142**:323-332.
53. **Nakamura m, e. a.** 2010. Differential Diagnosis of Feline Leukemia Virus subgroups using Pseudotype Viruses Expressing Green Fluorescent Protein *J. Vet. Med. Sci.* **72(6)**:787–790.
54. **Norris J, e. a.** 2007. Prevalence of immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. *J Feline Med Surg* **9**:300-8.
55. **O'Brien SJ. *, Jennifer L. Troyer 2, Meredith A. Brown 3, Warren E. Johnson 1,, and M. E. R. a. J. P.-S. Agostinho Antunes 4.** 2012. Review Emerging Viruses in the Felidae: Shifting Paradigms
Viruses **4**: 236-257
56. **Oswald, J.** 1999. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology* **69** 99-107.
57. **Page, R. D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. , p. 357-358., vol. 12 (4).
58. **Palmera ML, C. V. (ed.).** 2010. Enfermedades Infecciosas Felinas. , vol. Editorial Servet. Barcelona

59. **Pandey R, e. a.** 1991. Recombination between Feline Leukemia Virus Subgroup B or Cand Endogenous env Elements Alters the In Vitro Biological Activities of the Viruses. *Journal of Virology*. **Vol. 12, No.57**:6495-6508. .
60. **Polani Sagi, R. A. L.** 2010. Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage
Virology **405** 397–407.
61. **Robert-Tissot C, e. a.** 2011. The innate antiviral immune system of the cat: Molecular tools for the measurement of its state of activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* . **143** 269– 281.
62. **Roca, A. e. a.** 2005. Insertional Polymorphisms of Endogenous Feline Leukemia Viruses. . *Journal of virology* **Vol. 79, No. 7**:3979–3986
63. **Roca Alfred, I. e. a.** 2004. Genomically intact endogenous feline leukemia viruses of Recent origin. . *Journal of virology* **vol. 78, no. 8**:4370–4375
64. **Saiki RK, e. a.** 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: **487**.
65. **Saitou, N., Nei, M. .** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. . *Mol Biol Evol.* **4 (4)**:406-425.
66. **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol* **28**:2731–2739.
67. **Tandon Ravi, C. V., Pepin Andrea C., Riond Barbara, Mel L.Marina , McDonald Mike ,G. Doherr Marcus , Hans Lutz, Hofmann-Lehmann Regina.** 2008. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats

Virus Research

135: 136–143.

68. **Thompson, J. D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.g. .** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. . *Nucleic Acids Res.* **25 (24)**:4876-4882.

69. **Van der kuyl, A. e. a.** 1999. Discovery of a New Endogenous Type C Retrovirus (FcEV) in Cats: Evidence for RD-114 Being an FcEVGag-Pol/Baboon Endogenous Virus BaEVEEnv Recombinant Journal of virology, **Vol. 73, No. 10**:p. 7994–8002
70. **Watanabe Shinya, T. H., Kyohei Kuse, Yuka Odahara , Haruyo Ochi, and Kazuo Nishigaki, Jumpei Ito.** 2013. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus Env gene. . PLOS One.
71. **Willett, B. J., and Hosie, M.J.** 2012. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. Veterinary Journal.
72. **Winkler L, L. M., Flower L. .** 1999. Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats: Seroepidemiological analysis. . J Clin Microbiol **37**:2848-51.
73. **Wolfgang Seifarth, O. F., 1† Udo Zeilfelder,1 Birgit Spiess,1 Alex D. Greenwood,2,3, and a. C. L.-M. s. Ru'diger Hehlmann, 2.** 2005 Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Transcriptional Activity in Human Tissues with a Retrovirus-Specific Microarray
Journal of virology:341–352.
74. **Yasuhito Fujino *, K. O., Hajime Tsujimoto.** 2008. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis
Veterinary Immunology and Immunopathology **123**:138–143.
75. **Yukari Anai, H. O., Shinya Watanabe, So Nakagawa, Maki Kawamura, Takashi Gojobori, Kazuo Nishigaki** 2012. Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. Journal of Virology **86(16)**:8634-44.
76. **Zagal NE , e. a.** 2011. Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina. . UNAM Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Mexico.
77. **Zander, R. H.** 2004. Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and Bayesian posterior probability. . PhyloInformatics **2**: 1-13.
78. **Zinsser L, H. M. (ed.).** 1994. Diagnóstico Viral Rápido, 20ed. ed, vol. 62.

20. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AGUADO, S.** 2009. Revisión bibliográfica del diagnóstico de Leucemia Viral felina. Universidad michoácana de San Nicolas Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura.
2. **AL., M. E.** 2008. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *Journal of General Virology*. **89**: 2799-2805.
3. **AL., M. F. e.** 2007. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio Janeiro, Brazil. . *Vet Parasitol* **147**:9-15.
4. **AL., N. P. N. e.** 2004. Review Human endogenous retroviruses: Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol*.**138**.
5. **AL., R. E.** 2003. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Retrovirus Testing and Management. . *Journal of Feline Medicine and Surgery* **5**: 3.
6. **AL., S. E.** 2013 Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in *silico* data analysis *Journal of General Virology*. **94**:1587–1596.
7. **AL., S. E.** 2012. Identification of novel subgroup A variants with enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus. *Retrovirology*. **9**:48.

8. **ALVÁREZ, M.** 2011. Estudio serológico de las enfermedades virales en felinos domésticos de la ciudad de Nayarit. Universidad michoácana de San Nicolas Hidalgo, Morelia. Tesis de Licenciatura
9. **ALVIRA R, M. H.** 1993. Hallazgos serológicos de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia viral felina (VIF) en gatos de la ciudad de Santafé de Bogotá .Tesis de pregrado.
10. **ARJONA A, E. E., SOTO I, BARQUERO N, MARTIN D, GÓMEZ L.** 2002. Estudio seroepidemiológico de la leucemia e inmunodeficiencia felinas en Madrid. ; . Med Vet **17(3)::**75-83.
11. **AYALA M, T. T., CASTILLO C, GERARDI G, HERNÁNDEZ J, BENEDITO J.** 1998. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida del gato causado por el Virus de Inmunodeficiencia Felina. ; , p. 5-12., Arch Med Vet, vol. 30(1).
12. **BANDECCHI P, D. O. M., MAGI M, PALAMIDESSI A, PRATI M** 2006. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. Vet Rec **158:**555-557.
13. **BEATTY, A. E. A.** 2011. Markers of feline leukaemia virus infection or exposure in cats from a region of low seroprevalence. Journal of Feline Medicine and Surgery **13:**927-933.
14. **BENAVIDES H, M. R.** 1996-1999. Presente y futuro de la leucemia viral felina y del virus de inmunodeficiencia adquirida felina en Santa Fe de Bogotá. Colombia. Tesis de Maestría.
15. **BROCK, D.** 1988. Clínica y Diagnóstico Microbiológico. Biología de Microorganismos. Prentice Hall. p. 488-489, vol. 13.

16. **CAMPOS, T. P. R.** 2011. México: Las mascotas en nuestros hogares. Encuesta nacional, Consulta Mitofsky.
17. **CARDÉNAS, G.** 2005. Frecuencia y factores de riesgo de lesiones mamarias en perros y gatos con diagnóstico citológico de la Ciudad de México. Universidad Michoacana de San Nicolas Hidalgo, México. UNAM. FMVZ. Tesis de licenciatura.
18. **CARRIÓN, L.** 2012. Evaluación de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina utilizando la proteína gp70 (epítipo p45). México. UNAM. FES Cuautitlán. Tesis de Licenciatura.
19. **CHANG-FUNG-MARTEL, E. A.** 2013. A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb. *Journal of Feline Medicine and Surgery*.
20. **CHENG H, E. A.** 2006. Envelope Determinants for Dual-Receptor Specificity in Feline Leukemia Virus Subgroup A and T Variants. *Journal of virology* **Vol. 80, No. 4**:1619–1628
21. **CHHETRI BK, B. O., PEARL LD, BIENZLE D.** 2013. Comparison of the geographical distribution of FIV and FeLV infections in the USA (2000-2011). *BMC Veterinary Research*. **9:2**.
22. **DANNER RM, G. D., HESS SC, BANKO PC.** 2007. Evidence of feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, and *Toxoplasma gondii* in feral cats on Mauna Kea, Hawaii. *J Wildl Dis* **43**:315-318.
23. **DOMÉNECH A, M. G., COLLADO VM, BALLESTEROS N, SANJOSÉ L, ESCOLAR E, MARTIN S, GOMEZ-LUCIA E.** 2011. Use of recombinant interferon omega in feline retrovirogenesis: from theory to practice. *Vet Immunol Immunopathol* **143(3-4)**:301-6.

24. **DRISCOLL, C. A. M., D.W.; O'BRIEN, S.J.** 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**:9971-9978.
25. **ELDER, J. e. a.** 1983. Nucleotide Sequence of the Envelope Gene of Gardner-Armstein Feline Leukemia Virus B Reveals Unique Sequence Homologies with a Murine Mink Cell Focus-Forming Virust. *Journal of virology*, **vol. 46, no. 3**: 871-880.
26. **FELSENSTEIN, J.** 1993. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Version 3.5c. , University of Washington, Seattle.
27. **FONSECA, A.** 2007. Diagnóstico Inmunohistoquímico de Leucemia viral felina en tejidos de gatos con linfosarcoma. UNAM, Mexico.FMVZ. Tesis de licenciatura.
28. **FUJINO YASUHITO , O. K., TSUJIMOTO HAJIME** 2008. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. **123**. p.138–143.
29. **GLEICH SE, K. S., HARTMANN K.** 2009. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg* **11**:985-992.
30. **HALL, T. A., et al.** 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. p. 95-98, vol. 41.
31. **HARDY WD JR, Z. E.** 1991. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc.* **199(10)**:1365-73.

32. **HEDGES, S. B.** 1992 The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol.* **9 (2):**366-369.
33. **HELLARD E, F. D., SANTIN-JANIN H, TARIN B, BADOL V, COUPIER C, LEBLANC G, POULET H, PONTIER D:** . 2011. When cats' ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Prev Vet Med* **101:**250-264.
34. **HERRING I P., T. G., TOTHT E , CHAMPAGNE ES, PICKETT SJ AND HAINES DM.** 2001. Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Veterinary Ophthalmology.***42:** 119–126.
35. **HOFMANN-LEHMANN REGINA, H. J. B., GRUBER SABINE , BORETTI FELICITAS, SIGRIST BRIGITTE, AND A. H. LUTZ.** 2001. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of General Virology* **82:** 1589–1596.
36. **JACKSON L, H. M., TAYLOR F.** 1996. 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* **8:**25-30.
37. **JAMES, R.** 2003. Report of the American Association of feline practitioners and Academy of feline Medicine Advisory Panel on Feline Retrovirus Testing and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* **5:3.**
38. **JIMÉNEZ S, M. W.** 2003. Manejo, restricción química, valoración hematológica y aproximación al diagnóstico de retrovirus felinos en cinco especies de félidos silvestres en cautiverio Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Licenciatura.

39. **KANAFANY, G.** 2005. Frecuencia del virus de Leucemia viral felina en tres laboratorios de la ciudad de México del año 2002 al 2005. UNAM. FMVZ México. Tesis de licenciatura
40. **KATRIN, H.** 2012. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review *Viruses* **4**:2684-2710.
41. **KESSLER MR, T. D.** 1999. Effects of density and cage size on stress in domestic cats (*Felis Sylvestris catus*) housed in animal shelters and boarding catteries. *Anim Welf* **8**:259-267.
42. **LANDIS JR, K. G.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. , vol. 33.
43. **LEVY J, S. M., LACHTARA J, CRAWFORD C.** 2006. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factor for seropositivity. . *J Am Vet Med Assoc* **228(3)**:371-6.
44. **LEVY LS G. O., ALVAREZ-HERNANDEZ X., et al.** 2013. The surface glycoprotein of feline Leukemia Virus Isolate FeLV-945 Is a determinant of Altered Pathogenesis in the presence or Absence of the Unique Viral Long Terminal Repeat. *Journal of general Virology*. **11030-13**:108-117.
45. **LICKEY A, K. M., PATTON S, RAMSAY E.** 2005. Serologic survey of domestic felids in the Petén region of Guatemala. . *J Zoo Wildl Med*. **36(1)**:121-3.
46. **LIEBER M M, S. C. J., TODARO G J, BENVENISTE R E, CALLAHAN R, AND COON H G.** 1975. Isolation from the asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72(6)**:2315–2319.

47. **LIEM, B. P. e. a.** 2013. Clinical Findings and Survival in Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus. *J Vet Intern Med* **54**; **No. 2**.
48. **LUDWIG L, S. S., TANNER W.** 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int* **45**:6802–6818.
49. **LUTZ H, A. D., BELÁK S, BOUCRAUT-BARALON C, EGBERINK H, FRYMUS T, GRUFFYDD-JONES e.a.** 2009. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* **11**:565-574.
50. **LYNN SR, P. R., JEN W-CH, ROY-BURMAN P.** 1993. Recombinant Feline Leukemia Virus Genes detected in Naturally occurring Feline Lymphosarcomas. *Journal of Virology.*:3118-3124.
51. **MCDUGALL, T. A.** 1994. Defective Endogenous Proviruses Are Expressed in Feline Lymphoid Cells: Evidence for a Role in Natural Resistance to Subgroup B Feline Leukemia Viruses. *Journal of Virology* **Vol. 68, No. 4**:2151-2160.
52. **MIYAZAWA, T., JARRETT O.** 1997. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Archives of Virology* **142**:323-332.
53. **NAKAMURA M, e. a.** 2010. Differential Diagnosis of Feline Leukemia Virus subgroups using Pseudotype Viruses Expressing Green Fluorescent Protein *J. Vet. Med. Sci.* **72(6)**:787–790.
54. **NORRIS J, e. a.** 2007. Prevalence of immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. *J Feline Med Surg* **9**:300-8.
55. **O'BRIEN SJ, e.a.** 2012. Review Emerging Viruses in the Felidae: Shifting Paradigm Viruses **4**: 236-257

56. **OSWALD, J.** 1999. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology* **69** 99-107.
57. **PAGE, R. D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. p. 357-358, vol. 12 (4).
58. **PALMERA ML, C. V.** 2010. *Enfermedades Infecciosas Felinas*. vol. 1. Editorial Servet. Barcelona
59. **PANDEY R, e. a.** 1991. Recombination between Feline Leukemia Virus Subgroup B or C and Endogenous env Elements Alters the In Vitro Biological Activities of the Viruses. *Journal of Virology*. **Vol. 12, No.57**:6495-6508.
60. **POLANI SAGI, R. A. L.** 2010. Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology* **405** 397–407.
61. **ROBERT-TISSOT C, e. a.** 2011. The innate antiviral immune system of the cat: Molecular tools for the measurement of its state of activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **143**.269– 281.
62. **ROCA, A. e. a.** 2005. Insertional Polymorphisms of Endogenous Feline Leukemia Viruses. *Journal of virology* **Vol. 79, No. 7**:3979–3986
63. **ROCA ALFRED, I. e. a.** 2004. Genomically intact endogenous feline leukemia viruses of Recent origin. *Journal of virology* **vol. 78, no. 8**:4370–4375
64. **SAIKI RK, e. a.** 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487.
65. **SAITOU, N., NEI, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4 (4)**:406-425.

66. **TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol* **28**:2731–2739.
67. **TANDON RAVI, C. V., PEPIN ANDREA C., RIOND BARBARA, MEL L.MARINA, MCDONALD MIKE ,G. DOHERR MARCUS , HANS LUTZ, HOFMANN-LEHMANN REGINA.** 2008. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research*. **135**: 136–143.
68. **THOMPSON, J. D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, DG.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25 (24)**:4876-4882.
69. **VAN DER KUYL, A. e. a.** 1999. Discovery of a New Endogenous Type C Retrovirus (FcEV) in Cats: Evidence for RD-114 Being an FcEVGag-Pol/Baboon Endogenous Virus BaEVEEnv Recombinant *Journal of virology*, **Vol. 73, No. 10**:p. 7994–8002.
70. **WATANABE SHINYA, T. H., KYOHEI KUSE, YUKA ODAHARA , HARUYO OCHI, AND KAZUO NISHIGAKI, JUMPEI ITO.** 2013. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus Env gene. *PLOS One*.
71. **WILLETT, B. J., AND HOSIE, M.J.** 2012. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. *Veterinary Journal*.
72. **WINKLER L, L. M., FLOWER L.** 1999. Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats: Seroepidemiological analysis. *J Clin Microbiol* **37**:2848-51.

73. **WOLFGANG SEIFARTH, O. F. e.a.** 2005 Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Transcriptional Activity in Human Tissues with a Retrovirus-Specific Microarray *Journal of virology*:341–352.
74. **YASUHITO FUJINO, K. O., TSUJIMOTO, FE.** 2008. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **123**:138–143.
75. **YUKARI ANAI, H. O., SHINYA WATANABE, SO NAKAGAWA, MAKI KAWAMURA, TAKASHI GOJOBORI, KAZUO NISHIGAKI** 2012. Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *Journal of Virology* **86(16)**:8634-44.
76. **ZAGAL NE , e. a.** 2011. Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Leucemia Viral Felina. UNAM. FES Cuautitlán Mexico. Tesis de licenciatura.
77. **ZANDER, R. H.** 2004. Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and Bayesian posterior probability. *PhyloInformatics* **2**: 1-13.
78. **ZINSSER L, H. M.** 1994. Diagnóstico Viral Rápido, 20ed. vol. 62.
79. 2010. Anexo población animal mundial.
<http://www.census.gov/ipc/www/popclockworld.htm>
<http://www.census.gov/population/international/>
80. **BANDE, F., S. S. ARSHAD, L. HASSAN, Z. ZAKARIA, N. A. SAPIAN, N. A. RAHMAN, AND A. ALAZAWY.** Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. *BMC Vet Res* **8**:33.

81. **COELHO, F. M., M. R. BOMFIM, F. DE ANDRADE CAXITO, N. A. RIBEIRO, M. M. LUPPI, E. A. COSTA, M. E. OLIVEIRA, F. G. DA FONSECA, AND M. RESENDE.** 2008. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *J Gen Virol* **89**:2799-805.
82. **DRISCOLL, C. A., J. CLUTTON-BROCK, A. C. KITCHENER, AND S. J. O'BRIEN.** 2009. The Taming of the cat. Genetic and archaeological findings hint that wildcats became housecats earlier--and in a different place--than previously thought. *Sci Am* **300**:68-75.
83. **FREDERICK, A., M. CAPORALE, M. VARELA, R. BIEK, B. CHESSA, A. ALBERTI, M. GOLDBERGER, M. MURA, Y.-P. ZHANG, L. YU, F. PEREIRA, J. DEMARTINI, K. LEYMASTER, T. SPENCER, AND M. PALMARINI.** 2007. A Paradigm for Virus–Host Coevolution: Sequential Counter-Adaptations between Endogenous and Exogenous Retroviruses. *PLOS Pathogens*.
84. **FROMONT, E., M. ARTOIS, M. LANGLAIS, F. COURCHAMP, AND D. PONTIER.** 1997. Modelling the Feline Leukemia Virus (FeLV) in Natural Populations of Cats (*Felis catus*) *Theor Popul Biol* **52**:60-70.
85. **FROMONT, E., D. PONTIER, AND M. LANGLAIS.** 2003. Disease propagation in connected host populations with density-dependent dynamics: the case of the Feline Leukemia Virus. *J Theor Biol* **223**:465-75.
86. **ITO, J., S. WATANABE, T. HIRATSUKA, K. KUSE, Y. ODAHARA, H. OCHI, M. KAWAMURA, AND K. NISHIGAKI.** 2013. Refrex-1, a Soluble Restriction Factor against Feline Endogenous and Exogenous Retroviruses. *J Virol* **87**:12029-40.
87. **JARRETT, O.** 1999. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet Microbiol* **69**:99-107.

88. **KUMAR, V. E. A.** 1989. Nucleotide Sequence and Distinctive Characteristics of the env Gene of Endogenous Feline Leukemia Provirus. *Journal of virology* **Vol. 63 No.5**: 2379-2384.

89. **LEHLE, L., S. STRAHL, AND W. TANNER.** 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**:6802-18.

90. **LEVY, J., J. RICHARDS, D. EDWARDS, T. ELSTON, K. HARTMANN, I. RODAN, V. THAYER, M. TOMPKINS, AND A. WOLF.** 2003. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management. *J Feline Med Surg* **5**:3-10.

91. **MENDES-DE-ALMEIDA, F., N. LABARTHE, J. GUERRERO, M. C. FARIA, A. S. BRANCO, C. D. PEREIRA, J. D. BARREIRA, AND M. J. PEREIRA.** 2007. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* **147**:9-15.

92. **NELSON, P.** 2004. Review Human endogenous retroviruses: Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol* **138**.

93. **SALUD, O. P. D. L.** 2009. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Curso de gestión de calidad y buenas prácticas de laboratorio. , vol. 2^a Ed., Washington D.C.

94. **SONG, N., H. JO, M. CHOI, J. KIM, S. GEUK, C.-M. SE-YEOUN, S. KUNHO, AND C. PARK.** 2013 Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in silico data analysis *Journal of General Virology*. **94**:1587–1596. .

95. **STEWART, H., K. W. ADEMA, E. L. MCMONAGLE, M. J. HOSIE, AND B. J. WILLETT.** 2012. Identification of novel subgroup A variants with

enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus. *Retrovirology* **9**:48.

96. **TANDON, e. a.** 2008. Mini review. Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology* . **123**:129–133.
97. **ZHANG, W., AND Z. SUN.** 2008. Random local neighbor joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Phylogenet Evol* **47**:117-28.