

**Universidad Católica de Santa María**

**Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**



**Identificación por PCR y Electroforesis de la Etiología del virus de la  
Leucemia Felina, Arequipa 2024**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Carpio Lazo, Gianella**

**ORCID: 0009-0006-1779-0442**

para optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista

Asesor:

**Dr. Fernández Fernández, Fernando Alberto**

**ORCID: 0000-0001-6910-157X**

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**TITULACIÓN CON TESIS**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 11 de Octubre del 2025

**Dictamen: 013721-C-EPMVZ-2025**

Visto el borrador del expediente 013721, presentado por:

**2019221002 - CARPIO LAZO GIANELLA**

Titulado:

**IDENTIFICACIÓN POR PCR Y ELECTROFORESIS DE LA ETIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA  
LEUCEMIA FELINA, AREQUIPA 2024**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**29327492 - VALDEZ NUÑEZ VERONICA ROCIO  
DICTAMINADOR**



**40688434 - AGUILAR BRAVO HERBERT MISHAELF  
DICTAMINADOR**



**40214416 - DELGADO FERNANDEZ RONNIE CHRISTIAN  
DICTAMINADOR**



# IDENTIFICACIÓN POR PCR Y ELECTROFORESIS DE LA ETIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA FELINA, AREQUIPA 2024

## INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	15%	4%	5%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	3%
2	<a href="https://eprints.ucm.es">eprints.ucm.es</a> Fuente de Internet	2%
3	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
4	<a href="https://repositorio.ucsm.edu.pe">repositorio.ucsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="https://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="https://es.wikipedia.org">es.wikipedia.org</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="https://patents.google.com">patents.google.com</a> Fuente de Internet	1%
8	Giovana Biezus, Thierry Grima de Cristo, Gabriela Bassi das Neves, Mariana da Silva Casa et al. "Phylogenetic identification of feline leukemia virus A and B in cats with progressive infection developing into	<1%

*Dedicatoria*

Dedicada a mis padres Imelda y Héctor, llegamos aquí gracias a ustedes.

A Micho, en memoria a aquella promesa hace 10 años.



### *Agradecimientos*

A Dios por darme el regalo más hermoso “la vida”, te agradezco cada mañana que compruebo que mi existencia no es tan efímera.

A mi mamá, gracias por siempre impulsarme a avanzar y no rendirme, y por ser una gran figura a seguir, la persona más resiliente que conozco.

A mi papá, gracias por siempre apoyarme en todo y por esforzarte tanto para que yo pueda ser la persona que soy ahora.

A y Mocca por no dejarme sola en este proceso y encontrarme hace tantos años.

A mis hermanas y familia, tengo que agradecerles por inspirarme, por su apoyo, mojitos, aliento y sonrisas.

A mi asesor el Dr. Fernandez, por su guía constante y siempre brindarme su tiempo, paciencia y conocimientos.

Al doctor Bernabe por su paciencia y disposición y al “Laboratorio ADN Uchumayo” por ayudarme a expandir mis conocimientos y guiarme este proceso.

A “Vet Mundo” por brindarme de brazos abiertos su apoyo y a todas las personas tan asombrosas que conocí ahí.

A todos los animales que me conocí en mi vida que solo me confirmaban que estaba yendo por el camino correcto y me motivan a ser cada día mejor en esta carrera.

Y a todas las personas maravillosas que me crucé en el camino que me ayudaron a formar mi mentalidad actual y quien quiero ser.

*Epígrafe*



El sol saldrá y lo intentaremos de nuevo.

|-/

## RESUMEN

Esta tesis se clasificó como un estudio no experimental, descriptivo y analítico, realizado en la ciudad de Arequipa siendo la población de muestreo por conveniencia.

Para la ejecución del presente trabajo se tomaron muestras de cuatro gatos positivos al virus de la leucemia felina (FeLV) y se realizaron procesos de extracción de ADN, amplificación mediante PCR, análisis por electroforesis y secuenciación molecular. El objetivo general fue realizar la identificación molecular de la etiología del virus, con énfasis en diferenciar genéticamente las cepas presentes en Arequipa, Perú.

Entre los materiales utilizados se incluyeron equipos de laboratorio como termocicladores, centrífugas, cámara de flujo laminar, cámara de electroforesis, así como reactivos específicos y kits de extracción de ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos demostraron una alta calidad en las secuencias amplificadas (de entre 1700 y 2500 pb), con un 100% de cobertura y más del 98% de identidad respecto a cepas referenciales del NCBI. La electroforesis en gel de agarosa confirmó la presencia del producto amplificado, validando la efectividad de los protocolos moleculares aplicados. En el análisis filogenético, las cepas G1 y G2 mostraron divergencias significativas respecto al clado tradicional de FeLV-A, lo que sugiere la posible presencia de linajes emergentes con relevancia clínica y epidemiológica. Por otro lado, las cepas G3 y G4 presentaron una alta similitud con cepas clásicas del subtipo FeLV-A, indicando un grado de conservación genética mayor. Las conclusiones destacaron la eficacia de las técnicas moleculares utilizadas para detectar e identificar variantes del virus, validando la especificidad de los cebadores En-LT, RB-53 y RB-59 y protocolos. Asimismo, se recomienda implementar vigilancia molecular permanente en poblaciones felinas locales, actualizar los métodos diagnósticos para FeLV incluyendo variantes emergentes, evaluar la eficacia de las vacunas actuales frente a nuevas cepas y fomentar la investigación sobre recombinación viral. Este estudio refuerza el uso de herramientas moleculares para el diagnóstico específico y temprano de FeLV, lo que puede contribuir a un manejo clínico más eficaz en medicina veterinaria.

**Palabras claves:** FeLV (Virus de la Leucemia Felina), PCR y Electroforesis, Análisis filogenético.

## ABSTRACT

This thesis was classified as a non-experimental, descriptive, and analytical study conducted in the city of Arequipa, with a convenience sample population.

For the purposes of this study, samples were taken from four cats that tested positive for feline leukemia virus (FeLV), and processes of DNA extraction, PCR amplification, electrophoresis analysis, and molecular sequencing were performed. The overall objective was to perform molecular identification of the etiology of the virus, with an emphasis on genetically differentiating the strains present in Arequipa, Peru.

The materials used included laboratory equipment such as thermocyclers, centrifuges, laminar flow chambers, electrophoresis chambers, as well as specific reagents and nucleic acid extraction kits. The results obtained demonstrated high quality in the amplified sequences (between 1700 and 2500 bp), with 100% coverage and more than 98% identity with reference strains from the NCBI. Agarose gel electrophoresis confirmed the presence of the amplified product, validating the effectiveness of the molecular protocols applied. In the phylogenetic analysis, strains G1 and G2 showed significant divergences from the traditional FeLV-A clade, suggesting the possible presence of emerging lineages with clinical and epidemiological relevance. On the other hand, strains G3 and G4 showed high similarity to classic strains of the FeLV-A subtype, indicating a higher degree of genetic conservation. The conclusions highlighted the effectiveness of the molecular techniques used to detect and identify variants of the virus, validating the specificity of the primers En-LT, RB-53 and RB-59 and protocols. It is also recommended to implement permanent molecular surveillance in local feline populations, update diagnostic methods for FeLV including emerging variants, evaluate the efficacy of current vaccines against new strains, and encourage research on viral recombination. This study reinforces the use of molecular tools for the specific and early diagnosis of FeLV, which can contribute to more effective clinical management in veterinary medicine.

**Keywords:** FeLV (Feline Leukemia Virus), PCR and Electrophoresis, Phylogenetic Analysis.

## ÍNDICE

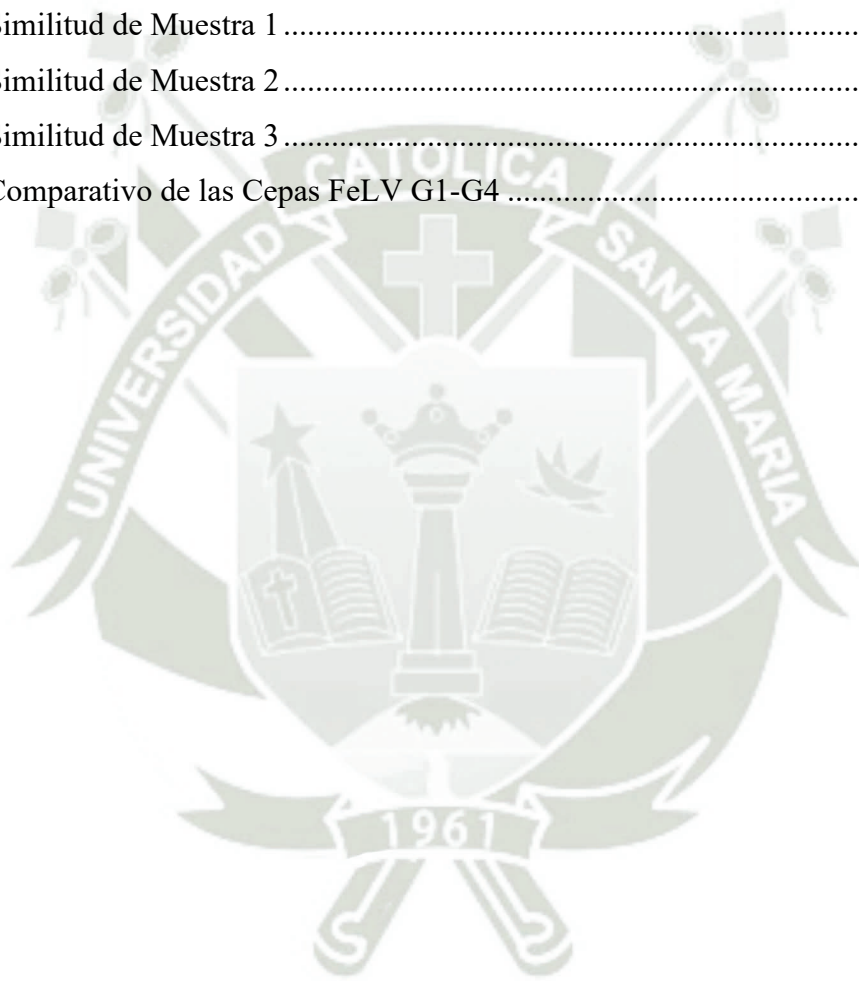
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
EPIGRAFE	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	2
1. CONTEXTUALIZACION DEL PROBLEMA .....	2
1.1.Enunciado del Problema.....	2
1.2.Descripción del problema.....	2
1.3.Justificación del trabajo .....	2
1.3.1.Aspecto general.....	2
1.3.2.Aspecto tecnológico .....	2
1.3.3.Aspecto social .....	2
1.3.4.Aspecto económico .....	3
1.3.5.Importancia .....	3
1.4.Objetivos.....	3
1.4.1.Objetivos generales .....	3
1.4.2.Objetivos específicos .....	3
1.5.Hipótesis .....	3
CAPÍTULO II .....	4
2.MARCO TEÓRICO .....	4
2.1.Análisis bibliográfico .....	4
2.1.1.Aspecto Generales del Gato .....	4
2.1.2.Enfermedades Retrovirales en Gatos .....	6
2.1.3.Leucemia Felina .....	10
2.1.4.Procedimientos de Diagnostico.....	16
2.1.5.Técnicas Moleculares.....	17
2.2.Antecedentes de investigación .....	25
2.2.1.Análisis de tesis.....	25
2.2.2.Análisis de trabajos de investigación .....	27
CAPÍTULO III .....	31

3.MATERIALES Y METODOS .....	31
CAPÍTULO IV .....	37
4.RESULTADOS Y DISCUSION.....	37
4.1. Extracción del ADN.....	37
4.2. Aplicación de Técnica de PCR .....	37
4.3. Aplicación de la Técnica de Electroforesis y Peso Molecular, y Bioinformática de las Secuencias Moleculares del Virus de la Leucemia Felina.....	38
4.4. Discusión .....	51
CAPÍTULO V .....	54
CONCLUSIONES .....	54
CAPÍTULO VI.....	55
RECOMENDACIONES .....	55
CAPÍTULO VII.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	56



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de los virus de la familia Retroviridae.....	6
Tabla 2. Proteínas codificadas por los genomas. ....	10
Tabla 3. Subtipo FeLV y sus receptores .....	12
Tabla 4. Subtipo Posibles errores diagnósticos con las diferentes técnicas .....	21
Tabla 5. Descripción de los primers utilizados y tamaño de los amplicones generados para la identificación de los subtipos FeLV-A y FeLV-B .....	25
Tabla 6. Similitud de Muestra 1 .....	40
Tabla 7. Similitud de Muestra 2 .....	43
Tabla 8. Similitud de Muestra 3 .....	46
Tabla 9. Comparativo de las Cepas FeLV G1-G4 .....	51



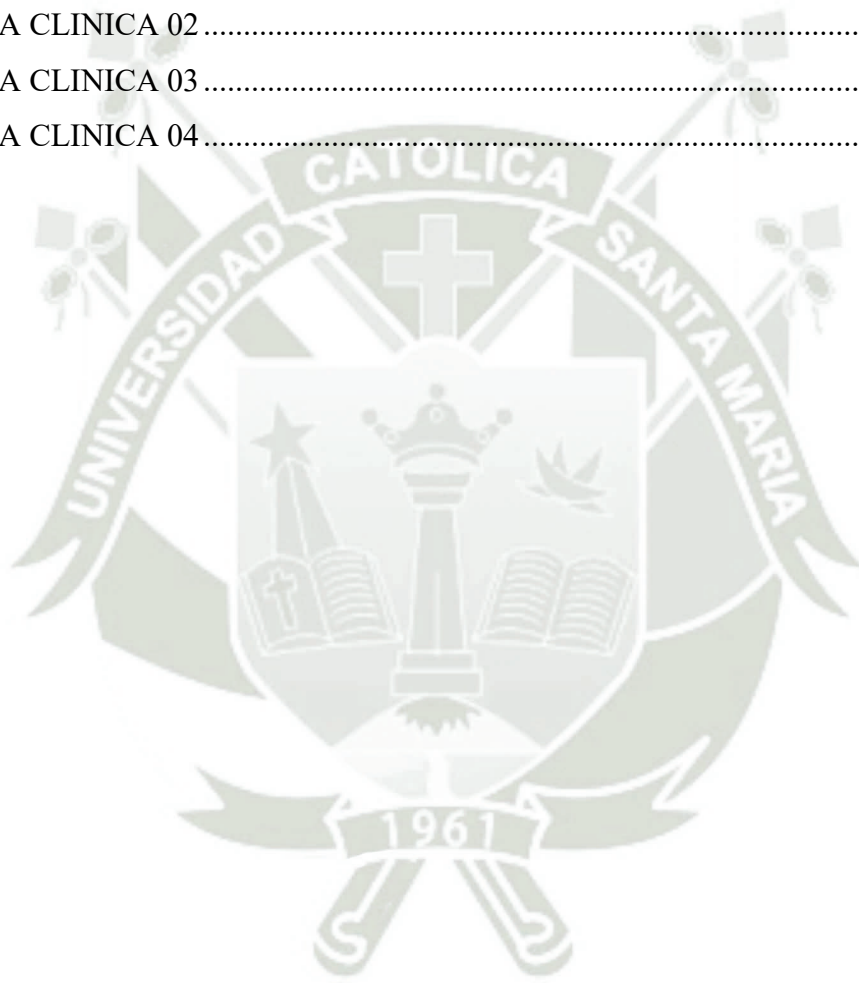
## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de vida del retrovirus.....	9
Figura 2 y 3. Morfología y genoma proviral de FeLV.....	11
Figura 4. Posibles resultados de la infección con FeLV .....	15
Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	18
Figura 6. Principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	19
Figura 7. Geles de agarosa luego de la PCR cuyas muestras se ordenaron según el aumento de brillo determinado.....	22
Figura 8. Orientación de los cebadores de PCR en relación con el ADN diana. ....	23
Figura 9. Primers para la detección del virus de Leucemia Felina .....	24
Figura 10. Región del genoma del virus de Leucemia Felina usado para el diseño del primer .....	24
Figura 11. Extracción del ADN de 4 gatos mediante PCR.....	37
Figura 12. Extracción .....	37
Figura 13. En-LT.....	38
Figura 14. PCR (primera parte), primer En-LT .....	39
Figura 15. PCR (segunda parte), primers RB-53 y RB-59.....	39
Figura 16. Árbol Filogénico Muestra 1 .....	41
Figura 17. Árbol Filogénico Muestra 2.....	44
Figura 18. Árbol Filogénico Muestra 3 .....	47
Figura 19. Árbol Filogénico Muestra 4.....	49
Figura 20. Sangre de Numbit .....	61
Figura 21. Sangre de Kike.....	61
Figura 22. Sangre de Ares .....	61
Figura 23. Sangre de Gatito.....	62
Figura 24 y 25. Se colocan en un Eppendorf 300 µl de sangre, se repite por cada muestra .....	62
Figura 26. Buffer RBC Lysis .....	62
Figura 27. Eppendorf con Pellet de muestra .....	63
Figura 28. Buffer Lysis JCBO, SDS 10 % y Proteinasa K .....	63
Figura 29. Fenol Cloroformo .....	63
Figura 30. Eppendorf con fase fenólica, fase proteica y fase soluble de la muestra.....	64
Figura 31. Enzima RNAsa .....	64
Figura 32. Eppendorf con sobrenadante.....	64

Figura 33. Acetato de Sodio .....	65
Figura 34. Isopropanol .....	65
Figura 35. Baño de Hielo .....	65
Figura 36. Eppendorf con pellet y Etanol Absoluto.....	66
Figura 37. Agua Libre de Nucleasas .....	66
Figura 38. Centrífuga .....	66
Figura 39. Tempblock Module Heater .....	67
Figura 40. Agua de PCR, Master Mix, Muestra de ADN extraído y Primer En-LT .....	67
Figura 41. En el Eppendorf “En-LT” se homogeniza con micropipeta. ....	67
Figura 42. Termociclador configurado para el Primer En-LT. ....	68
Figura 43. Agua de PCR, Master Mix y Primers RB-53 y RB-59.....	68
Figura 44. En los Eppendorf “RB-53” y “RB-59” se homogeniza con micropipeta. ....	69
Figura 45. Termociclador configurado para el Primer RB-53. ....	69
Figura 46. Termociclador configurado para el Primer RB-59. ....	70
Figura 47. Tae y vortex. ....	70
Figura 48 y 49. Disolución de agarosa en polvo se coloca en microondas y luego en molde.....	71
Figura 50. Se realiza perforación en el molde para los pozos.....	71
Figura 51, 52 y 53. Cámara de Electroforesis con el gel al 1.5% cubierto de TAE en la que se llenan los pozos con los resultados de la PCR. ....	71
Figura 54. Se enciende y configura el equipo de Electroforesis a 80 voltios. ....	72
Figura 55 y 56. Se coloca el gel en Cámara de Iluminación y se realiza la toma de imágenes con cámara digital. ....	72
Figura 57 y 58. Paciente Numbit positivo a Leucemia Felina. ....	74
Figura 59 y 60. Placas de Rx vista lateral, vista ventro-dorsal de Kike en la que se observa liquido libre en tórax.....	75
Figura 61. Prueba de Kike positivo a Leucemia Felina. ....	75
Figura 62 y 63. Placas de Rx vista lateral, vista ventro-dorsal de Ares. ....	76
Figura 64. Prueba de Ares positivo a Leucemia Felina.....	77
Figura 65. Placas de Rx vista lateral de Gatito. ....	78
Figura 66. Prueba de Gatito positivo a Leucemia Felina. ....	78

## ÍNDICE DE ANEXOS

MATERIALES Y EQUIPOS.....	61
Sangre recolectada en tubos de EDTA.....	61
Materiales y Equipos de Laboratorio para la Extracción de ADN de la Muestra.....	62
Materiales y Equipos de Laboratorio para la Ampliación del ADN.....	67
Materiales y Equipos de Laboratorio para Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% ....	70
HISTORIA CLINICA 01.....	73
HISTORIA CLINICA 02.....	75
HISTORIA CLINICA 03.....	76
HISTORIA CLINICA 04.....	78



## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la Leucemia Felina es una de las enfermedades virales más frecuentes que afectan a los felinos domésticos, la cual conlleva un riesgo elevado ya que se caracteriza por la anemia e inmunosupresión, siendo un riesgo para la salud y el bienestar de esta especie. Resulta complejo el tener un diagnóstico en una etapa temprana de la enfermedad y sobre todo si se cuenta con recursos tecnológicos limitados.

El presente trabajo tiene como objetivo principal el realizar la identificación molecular del agente etiológico del virus de la Leucemia Felina en la ciudad de Arequipa, aplicando técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y Electroforesis en gel de Agarosa, la cual resulta ser una prueba sensible y precisa para la detección del virus. Con la PCR lo que se busca es la amplificación de las secuencias de ADN en la que a través de la electroforesis se realizará la observación de estos fragmentos amplificados del ADN y se realizará una comparación en base al peso molecular.

Este trabajo tiene como finalidad el poder proporcionar una base científica en la que se puede generar futuros estudios, así como el tener mejores diagnósticos respecto a esta enfermedad conociendo la filogenia actual del virus de Leucemia Felina presente en Arequipa.

## CAPÍTULO I

### 1. CONTEXTUALIZACION DEL PROBLEMA

#### 1.1. Enunciado del Problema

Identificación por PCR y Electroforesis de la Etiología del Virus de la Leucemia Felina

#### 1.2. Descripción del problema

En la práctica diaria de la medicina en animales menores se requiere un diagnóstico adecuado de una enfermedad y por ende del patógeno para obtener mayor efectividad en el tratamiento. En la actualidad, es frecuente el hallar gatos positivos a leucemia felina en un periodo avanzado de la enfermedad, los test de uso común en veterinarias tan solo indican si son positivos al virus; el virus de leucemia felina varia en signos clínicos de acuerdo a los 4 subgrupos virales que posee siendo necesario el poder diferenciarlos para obtener una respuesta efectiva en control de estos. Resulta necesaria la identificación de la etiología del virus para poder distinguir cada subtipo, siendo este de mayor precisión. La identificación basada en PCR y electroforesis tiene una base genética por lo cual representa una ventaja en cuanto a la exactitud para hallar la etiología y su tiempo es relativamente corto siendo de 1 día, por lo que resulta ser competente tanto como un test rápido siendo de las pruebas inmunológicas de uso cotidiano.

#### 1.3. Justificación del trabajo

##### 1.3.1. Aspecto general

Resulta de importancia el realizar la identificación específica de la etiología del virus, siendo de gran utilidad la determinación en base a su secuencia molecular ya que esta se le puede considerar una prueba de laboratorio bastante específica al basarse en genética, una identificación tan precisa es beneficiosa para poder tener la subdivisión del virus de la leucemia felina.

##### 1.3.2. Aspecto tecnológico

Al realizar una identificación en base molecular es clave para poder comprender la función de los genes así como su genoma, esta prueba es bastante específica respecto a la taxonomía ya sea de una bacteria o virus entre otros, lo cual resulta de gran aporte en la actualización de la medicina, ya que permite realizar diversas investigaciones en las que se puede llegar a nuevas conclusiones respecto a las enfermedades que aquejan a la sociedad y se puede descubrir nuevos métodos, tratamientos o incluso nueva medicina.

##### 1.3.3. Aspecto social

El aplicar la identificación molecular para ampliar el conocimiento sobre la taxonomía y/o subtipos de un virus, resulta de importancia clínica en el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad, ya que al brindar una información más específica el profesional a base de su criterio el cual

debe ser fundamentado podrá generar un gran beneficio respecto a las decisiones o acciones que realice en basa a la información obtenida de la secuenciación molecular de los nucleótidos.

#### **1.3.4. Aspecto económico**

El costo y tiempo que se necesita para realizar una secuenciación molecular es una de las razones por las que no se aplica de manera cotidiana este modelo de diagnóstico, sin embargo, resulta una de las pruebas más precisas y sensitivas por lo cual el procedimiento resulta más largo que otros, pero sus resultados son confiables totalmente a diferencia de otro tipo de prueba de identificación por lo que se espera que en un futuro gracias a la tecnología se encuentre una forma más practica de aplicar este tipo de diagnóstico y se vuelva de uso cotidiano en laboratorios.

#### **1.3.5. Importancia**

La presente investigación resulta de importancia debido a que se aplicara la genética molecular para una identificación más precisa del agente etiológico del virus de la leucemia felina, lo cual brinda información crucial tal como determinar la virulencia, conocer la secuenciación molecular permite a su vez describir la relación filogénica, permitiendo tener más conocimiento epidemiológico sobre esta enfermedad.

### **1.4.Objetivos**

#### **1.4.1. Objetivos generales**

Realizar la identificación molecular de la Etiología del virus de la Leucemia Felina.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Extraer el ADN de la Etiología del virus de la Leucemia Felina.
- Aplicar técnica de PCR en la Etiología del virus de la Leucemia Felina.
- Aplicar técnica Electroforesis y el Peso Molecular en la Etiología del virus de la Leucemia Felina.

### **1.5.Hipótesis**

Dado que en Arequipa se encuentran evidencia clínica de Leucemia Felina es fiable que se pueda identificar su etiología con PCR y electroforesis.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Análisis bibliográfico

##### 2.1.1. Aspecto Generales del Gato

###### 2.1.1.1. Taxonomía

Dominio : Eucariota  
Reino : Animalia  
Filo : Chordata  
Clase : Mammalia  
Orden : Carnivora  
Familia : Felidae  
Género : Felis  
Especie : catus

(1)

El gato es un animal antiguo, y todavía existen algunos misterios y controversias sobre su origen hasta el presente. Sin embargo, a través del análisis en base a múltiples métodos de investigación tales como registros fósiles, genética y arqueología, los científicos han comenzado a descubrir el origen de esta especie. De acuerdo a su información la primera especie de felinos existieron en el Paleoceno aproximadamente hace unos 50 millones de años, estos se distribuían principalmente en los territorios de América del Norte y Europa. Las características más resaltantes de esta especie felina es que eran de un tamaño pequeño, solían habitar en árboles y su alimento principal se basaba en la ingestión de insectos, pequeños mamíferos y aves. Entre estos felinos, se denominó como la primera especie a los "Pseudaelurus", siendo estos pequeños, poseían afilados colmillos y garras, estaban adaptados para la caza de mamíferos pequeños (2). Pero como fue antes mencionado al tener ideas variadas respecto a su origen, algunos estudios sugieren que el origen de los gatos pueda remontarse al Cretácico tardío, hace unos 100 millones de años, siendo este origen aún más antiguo que el Paleoceno el cual tan solo es la mitad de tiempo de antigüedad (3).

Desde el origen de la especie felina hasta la diferenciación y evolución de las especies felinas actuales, su evolución de los gatos ha pasado principalmente por tres etapas:

- **Evolución Temprana:** Su origen temprano de las especies felinas se dio en el Paleoceno, se presume que aproximadamente 50 millones de años atrás. Las primeras especies felinas se les denominó "Pseudaelurus", estos eran de un pequeño tamaño, vivían en árboles y se alimentaban de una dieta carnívora (4). En el Oligoceno, hace alrededor de unos 35 millones de años, se fueron extendiendo con el tiempo a regiones como América del Norte, Europa, Asia y África (3).
- **Evolución Media:** Siendo el Mioceno, hace unos 25 millones de años, las especies felinas se dio una diferenciación importante siendo la aparición de grandes tigres dientes de sable de gran tamaño, colmillos

largos y adaptados para atacar a los grandes mamíferos y por otro lado aparecieron pequeñas especies de felinos caracterizados por ser de un tamaño corporal pequeño, adaptados para la caza de pequeñas especies (3).

- **Evolución Reciente:** A finales del Mioceno, siendo alrededor de 10 millones de años atrás, las especies de felinos modernos comenzaron a diferenciarse en variedad de subespecies y razas, tales como leones, tigres, pumas y gatos monteses. Se cree que en base a esta especie de gatos se origina uno de los ancestros de las especies de felinos actuales y estudios genéticos sobre los gatos monteses han demostrado que son una especie híbrida resultado del cruce entre gatos monteses africanos y europeos (3).

#### 2.1.1.2.Domesticación

En la actualidad respecto a la domesticación de los gatos se considera con mayor aceptación la teoría que sostiene la idea que estos se domesticaron a sí mismos. Según la historia predominante indica que al llegar la agricultura al Oriente Medio alrededor de 11 mil años atrás se dio el cultivo y almacenamiento de ciertos cereales tales como cebada y trigo, y con esto se atrajo la presencia de pequeños roedores, siendo estos las presas naturales del gato montés. Debido a la abundancia de alimentos en esta área, el montés empezó a invadir pueblos y aldeas neolíticas en las cuales los humanos empezaron a ver los beneficios de la presencia de este animal (5).

A través de este proceso, se empezaron a adaptar de forma gradual al estilo de vida del humano tal como ingerir sus alimentos (6). Al pasar el tiempo, sus etiología y morfología de los gatos en su estado salvaje cambiaron, siendo más dóciles con el humano. Al comparar los genomas de gatos en estado salvaje y gatos domesticados se encontraron ciertas variaciones genética al pasar por la domesticación, se puede tomar como ejemplo la relación de variedad de mutaciones genéticas que se relacionan con el comportamiento social y su dieta ya que se fueron adaptando a la forma de vivir del humano (3).

#### 2.1.1.3.Comportamiento Social

Se le considera una especie territorial siendo los machos los que tiene territorios más grandes a diferencia de las hembras de las cuales sus territorios suelen ser de menor tamaño (7). Al estar los gatos en constante limitación territorial se puede presentar la situación de peleas, lo cual termina por resultar en una exposición a diversos factores que desencadenan problemas en su salud, de igual manera en la actualidad es frecuente el encontrar más de un gato por persona, comportamiento impuesto por el humano, debido a que esta especie resulta más individualista, por ello para realizar el ingreso de un nuevo felino se requiere precauciones para evitar un problema social así como de salud en la población.

#### 2.1.1.4.Pruebas de Enfermedades

El realizar un plan sanitario preventivo en los animales de compañía resulta en el aumentar su calidad de vida debido a que se tiene una

prioridad por el bienestar animal y a la par se reduce la carga sanitaria animal. También se puede limitar la posibilidad de que se presenten enfermedades zoonóticas por contacto entre humanos con animales domésticos (8) (9).

La aplicación de vacunas resulta esencial ya que permite reducir la morbilidad y mortalidad causadas por enfermedades infecciosas (10).

El cumplir con el plan de vacunación, así como visitas anuales a la veterinaria son las medidas principales que se debe realizar para mantener saludables a los animales de compañía. La inmunización adecuada se basa en la aplicación de las vacunas primordiales que actúan en contra de las enfermedades infecciosas más frecuentes en gatos tales como leucemia felina (FeLV), panleucopenia, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), herpesvirus y calicivirus (11), dependiendo del país se considera la vacuna contra la rabia, al ser endémica (10) (9). En caso de ser requerido es recomendable la administración regular de productos que reduzcan o eliminen la presencia de endoparásitos tales como *Ancylostoma caninum*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y ectoparásitos como las garrapatas (12).

### 2.1.2. Enfermedades Retrovirales en Gatos

En la Familia *Retroviridae* podemos encontrar al virus de la leucemia felina (FeLV), así como el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV). Esta se puede subdividir en diversos géneros, por lo cual este virus se puede encontrar como agentes infecciosos de variedad de vertebrados, aunque también se le encontró en ciertos moluscos e insectos (13).

**Tabla 1. Géneros de los virus de la familia *Retroviridae*.**

Familia	Genero	Tipo de Especie	Virus Felino
<b>Retroviridae</b>	Alfaretrovirus	Virus de la leucosis aviar	
	Betaretrovirus	Virus del tumor mamario del ratón	
	Gammaretrovirus	Virus de la leucemia murina	Virus de la leucemia felina
	Deltaretrovirus	Virus de la leucemia Bovina	
	Epsilonretrovirus	Virus del sarcoma cutáneo de Walleye	
	Lentivirus	Virus de la inmunodeficiencia humana	Virus de la inmunodeficiencia felina
	Spumavirus	Espumavirus simio	Espumavirus felino

\*Tomado de Conde Bu (14)

### 2.1.2.1. Clasificación

Los retrovirus se pueden clasificar de acuerdo a su método de transmisión, siendo:

- **Retrovirus Exógeno:** Aquel capaz de ser altamente contagioso, se puede transmitir de forma horizontal ya sea como virus extracelular que tome como vía las partículas libres o a partir de células somáticas que se infecta mediante contacto célula-célula (14) (15). También se puede transmitir de forma vertical al embrión y existe la posibilidad de que se transmita por leche o por un mecanismo perinatal de la madre los nacidos (13).
- **Retrovirus Endógeno:** Secuencias del ADN retroviral ingresan en el ADN celular de la célula germinal, siendo esta la que se transmite de forma vertical por generaciones. Se les denomina provirus, estos al perder parte de su secuencia genética no podrán replicarse, pero al poseer algo que se le podría denominar “biblioteca génica” esta información que posee la intercambia con virus exógenos y estos al mutar generan una forma vírica patógena. Esto resulta en copias de genomas del retrovirus en células exógenas que se integran al genoma del hospedador (16). La infección del retrovirus que se da de las células germinales o las creadoras de éstas dan lugar a un provirus que se hereda de forma vertical en el genoma del hospedero. En ciertos casos que no se tiene explicación actualmente los retrovirus endógenos (ERV) pueden propagarse de forma más profunda en el genoma y se extiende en la población, dando como resultado grandes familias de repeticiones que se intercalan en el genoma del hospedero (17).

En estudios previos lograron descubrir que todos los retrovirus simples tales como retrovirus alfa, beta, gamma y épsilon tienen la capacidad de ser endógenos en el huésped. Los retrovirus complejos tales como retrovirus, lentivirus y espumavirus, de estos el único capaz de volverse endógeno en las diversas especies que lo hospedan vendría a ser el espumavirus (13).

En los felinos los que son transmitidos exógenamente son el gammavirus el cual genera a la leucemia felina y el lentivirus el cual es también denominado el virus de la inmunodeficiencia felina. A diferencia de estos, el espumavirus no es patógeno a pesar de ser transmisible, de hecho, se llegó a comprobar que no hay una correlación entre la presencia de los anticuerpos del virus con alguna enfermedad en clínica (13). El gammavirus (FeLV) es el retrovirus con mayor patogenicidad, capaz de generar enfermedades con inmunosupresión o degenerativas, así como proliferativas debido a que al asociarse con la célula puede derivar en un caso oncogénico directamente. El virus lentivirus (FIV) puede desencadenar un síndrome de inmunodeficiencia clásica, los cuales poseen un curso crónico, no es tan agresivo y no tiene alguna asociación directa oncológica (18).

### 2.1.2.2. Estructura Genética y Proteínas

Los retrovirus están conformados por (13):

- **Envoltura:** Al poseer una bicapa lipídica en la membrana celular resulta ser más frágil a su entorno, esta es conformada por dos glicoproteínas de origen vírico, superficie y transmembrana siendo de proyección poco definida, 8nm que rodean la envoltura, la transmembrana se une a la superficie con la envoltura de la célula.
- **Matriz:** Cumple la función de darle estabilidad a la partícula vírica, y está formada por la proteína MA.
- **Cápsida:** Conformada mayormente por proteínas de la cápsida, en la cual su interior se encuentra rodeado por las proteínas de la nucleocápsida, se ubica a el ARN y las proteínas que poseen acción enzimática tales como la proteasa, retrotranscritasa y la integrasa, en ciertos virus se llega a obtener la dUTPasa.

El virus infeccioso cuenta con tres genes capaces de codificar sus proteínas siendo estos (19) (20):

- **Gen gag:** Cuenta con información requerida para codificar las proteínas estructurales del interior del virus, aquí tenemos a las proteínas MA, cápsida, nucleocápsida y algunas otras que cuya función es inespecífica.
- **Gen pol (polimerasa):** Capaz de codificar las proteínas de actividad enzimática tal como la proteasa, integrasa, retrotranscriptasa y en ciertos virus se incluye la dUTPasa, siendo todas estas primordiales para que se realice la replicación vírica.
- **Gen env (envoltura):** S encarga de codificar a aquellas proteínas que se insertaron por la envoltura siendo conformada por los peplómeros de superficie y de la transmembrana.

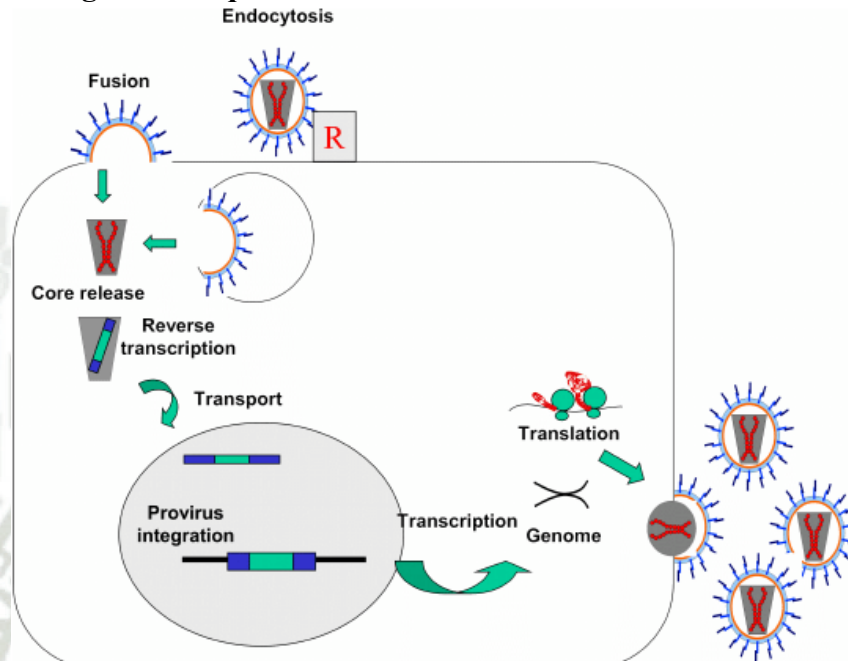
El retrovirus posee como característica la velocidad de mutación, esto es debido a que la retrotranscriptasa no posee una función exonucleasa (reparadora) y se apoya en su elevada frecuencia de error al momento de incorporarse los nucleótidos, a la par se puede generar recombinaciones con algunos genomas distintos (19).

### 2.1.2.3. Infección y Replica Vírica

Primero se dará la unión de la proteína vírica con el receptor de cuya célula se va infectar, lo que permite que en esta ingrese el virus. Se libera el ARN vírico en el citoplasma y debido a la acción de la enzima RT vírica se va a crear a partir de la cadena simple de ARN una cadena doble de ADN, siendo que esta doble cadena ingresa al núcleo de la célula y a través de la acción de la Integrasa se adhiere a la molécula de ADN de la célula. Finalmente, a esta secuencia vírica integrada en el ADN de la célula se le denomina Provirus. Este tendrá la función de un molde para la producción de ARNm (el cual se traduce a proteínas) así como de ARN vírico (genómico). Al formarse las poliproteínas, el ensamblaje ocurre por

debajo de la membrana celular y se van a liberar los viriones por gemación (13).

**Figura 1. Esquema del ciclo de vida del retrovirus.**



\*Tomado de Dufait (21).

El ciclo de vida de los retrovirus, incluidos los lentivirus, se muestra como un mecanismo de varios pasos, que comienza con la unión del virión al receptor celular (R), lo que lleva a la fusión directa o endocitosis. Luego, se libera el núcleo interno y las dos moléculas de ARN experimentan una transcripción inversa como se indica, terminando con una sola molécula de ADNc. Luego, el núcleo se transporta al núcleo (en el caso de los lentivirus) y el ADNc se integra en el cromosoma celular. El genoma integrado (provirus) experimenta transcripción, produciendo más copias del genoma de ARN (y también ARNm empalmados), que también se traducen en proteínas estructurales y enzimáticas. Luego, estos se ensamblan en viriones que brotan de las células infectadas. (21)

En el momento en el que la célula con el provirus que se integre se divide, siendo las células hijas las que reciben el ADN del virus integrado junto con el material genético propio de la célula, de modo que la infección es constante y sólo se puede eliminar al destruirse todas las células que lo posean. Debido a esto resulta complicado los tratamientos que se aplican en las infecciones a causa de retrovirus, ya que tienen que cumplir con la función de restringir toda la formación de partículas víricas que resulten infectivas y evitar así nuevas infecciones y además de ello deberían destruir las células afectadas (22)

### 2.1.3. Leucemia Felina

El virus de la leucemia felina es un retrovirus de la familia Oncovirinae. Como retrovirus, el FeLV es un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, que depende de un intermediario de ADN bicatenario (es decir, la etapa de provirus) en su ciclo de vida para la replicación (23). Es un gammaretrovirus que fue descrito por primera vez como una partícula similar a un virus que se asocia con la leucemia (linfosarcoma). La infección por FeLV puede ser capaz de generar citopenias, inmunodeficiencia y neoplasia en gatos si esta en la fase progresiva de esta (24) (25).

El genoma del virus de leucemia felina está conformado por 3 genes:

- Gen envoltura (env): En la envoltura se poseen proteínas (gp70 y p15E) que se relacionan con procesos tales como la unión al receptor celular, la penetración y formación de sincitios; esto debido a su posición externa, ya que son las primeras que son reconocidas por el sistema inmune, lo que induce anticuerpos neutralizantes. La glucoproteína gp70 específicamente en el subgrupo de FeLV, FeLV-T, se relaciona con procesos de inmunodeficiencia al tener tropismo por receptores de los linfocitos T. De igual manera, el p15E al parecer podría estar relacionada con procesos de inmunosupresión de igual forma (26).
- Gen antígeno específico (gag): Variedad de tests diagnósticos se basan en la detección de la proteína de la cápsida (p27) ya que es usada como un indicativo de infección vírica, esto debido a que se produce en exceso siendo así la más abundante. Las proteínas internas, de igual forma manera que las de superficie resultan ser muy inmunógenas, ya que los anticuerpos que formados no son neutralizantes (15).
- Gen polimerasa (pol): Es aquel que se encarga de codificar para la transcriptasa inversa, la proteasa y la integrasa.

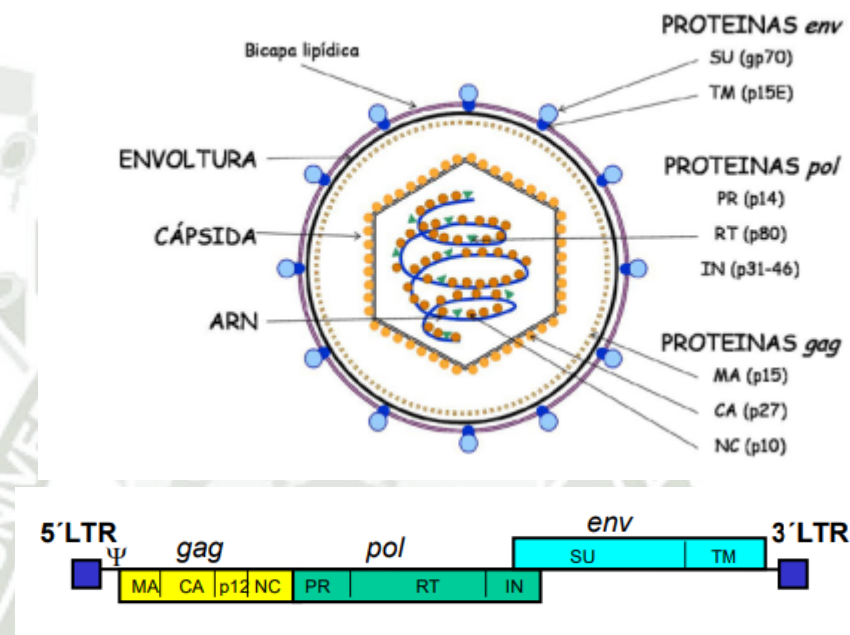
**Tabla 2. Proteínas codificadas por los genomas.**

Gen Codificador	Iniciales de Proteína	Nombre - Función	FeLV
<i>env</i>	SU	Superficie	gp70
	TM	Transmembrana	p15e
<i>gag</i>	MA	Matriz	p15
	CA	Cápside	p27
	P12	Desconocida	p12
	NC	Nucleocápside	p10
<i>pol</i>	PR	Proteasa	p14
	IN	Integrasa	p46
	RT	Transcriptasa inversa	p80
	dUTPasa		-

\*Tomado de Conde, Beatriz Unzeta (14).

Morfológicamente es similar a cualquier otro retrovirus, difiere en que posee una cápside icosaédrica, y posee viriones, con una medida de 105-125 nm y escasas proyecciones hacia la superficie; estas son partículas del tipo C lo que indica que antes de la gemación no se observan las partículas víricas (25).

**Figura 2 y 3. Morfología y genoma proviral de FeLV.**



\*Tomado de Collado Alcalá (13).

### 2.1.3.1. Subdivisión de FeLV

A pesar de la existencia de al menos seis subtipos: FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-T y los recientemente descritos FeLV-D y FeLV-TG35 (27). Se basan en la existencia de 4 subtipos, siendo diferenciadas mediante su espectro celular del huésped, se definen tomando en cuenta la célula hospedadora ya que son similares inmunológicamente:

- **Subtipo A:** Este se replica de forma exclusiva en las células del gato (ecotrópico) y puede estar el virus solo o combinarse con el subtipo B y/o C siendo más patógeno de esta forma. Responsable de la transmisión del virus, se le asocia a las enfermedades proliferativas como no proliferativas y debido a que es más estable la gp70 que en otros subtipos, este virus ingresa a la célula por el transportador de tiamina 1 (22). De forma individual no tiene la capacidad de producir enfermedad. Solo el FeLV-A puede transmitirse horizontalmente entre gatos domésticos, aunque suele presentar patogenicidad reducida si no se recombina (18) Produce neoplasia hematopoyética (linfoma de células T) está en el 100% de los gatos virémicos pero como se indica es levemente patógeno y citopatógeno, sin embargo, es altamente contagioso (28).

- **Subtipo B:** Puede infectar y se puede replicar en las células de variedad de especies, se cree su origen se basa en la recombinación parcial o total del gen *env* y las secuencias endógenas, debido a esto pierde su capacidad replicativa. Al parecer penetra en la célula a través de receptores que se relacionan con la familia de las moléculas transportadoras del fosfato, Pit 1 y Pit 2 (22). Produce enfermedades linfoproliferativas y mieloproliferativas y al combinarse con el subtipo A se hace virulento, pero no es contagioso (28).
- **Subtipo C:** De igual forma que el tipo B, este es capaz de infectar las células de variedad de especies. Se cree que se origina a partir de mutaciones del tipo A en el dominio de la unión al receptor, este virus no se puede replicar. Se une al transportador aniónico de los eritroblastos (FLVCR1) así como otras células que están involucradas en la estimulación de la hematopoyesis por las citoquinas, como los macrófagos (22) Genera anemia no regenerativa por aplasia pura de células rojas, no se replica y no es transmisible, y se suele aislar con poca frecuencia (28).
- **Subtipo T:** Son de un marcado carácter T-linfotrópico, lo que induce en una inmunosupresión que resulta grave. Sus propiedades citopáticas y patogénicas de FeLV-T terminan por adquirir mutaciones (14). Es altamente citopático y con tropismo importante por las células T, esta genera inmunosupresión (linfopenia, neutropenia) (28).

Los demás subtipos se forman a partir de mutaciones del FeLV-A o recombinación con secuencias provirales endógenas, por ejemplo, enFeLV, una secuencia endógena, análoga al FeLV, y adquirida durante la evolución del gato doméstico (18).

**Tabla 3. Subtipo FeLV y sus receptores**

Subtipo FeLV	Receptor	Función del Receptor	
FeLV-A	FeTHTR1	Proteína transportadora de tiamina	Presente en todos los gatos con FeLV; se transmite exógenamente
FeLV-B	FePit1 o FePit2	Proteína transportadora de fosfato inorgánico	Resultados de la recombinación del FeLV-A y secuencias de retrovirus endógenos felinos relacionados con FeLV; puede acelerar el desarrollo del linfoma o mejorar la neuropatogenicidad.
FeLV-C	FLVCR	Proteína transportadora de hemo	Surge de mutaciones puntuales en el gen <i>env</i> de FeLV-A; asociado con anemia no regenerativa.

\*Tomado de Sykes, Jane E.; Hartmann, Katrin (29).

### 2.1.3.2. Epidemiología

El FeLV se va a eliminar en gran cantidad por la saliva, al igual que también se puede encontrar en las heces, la orina y la leche. El FeLV resulta inestable en el medio ambiente y, por lo tanto, se cree que la transmisión generalmente requiere un contacto íntimo, agresivo o amigable entre gatos positivos y gatos no infectados. El contacto indirecto con la saliva o las heces de gatos infectados con FeLV pueden ser suficientes para transmitir la infección (por ejemplo, al compartir platos de comida o la caja de arena). Además, el FeLV se puede transmitir verticalmente de la madre con el virus a las crías (24).

La transmisión del FeLV-A resulta principalmente del contacto directo con secreciones salivales, a través de lamidos, acicalamiento mutuo y compartir sus platos de agua y comida. Otras vías de transmisión podrían ser por mordeduras, transfusiones de sangre, ingesta de la leche de una gata positiva y cabe la posibilidad de ser por pulgas (29).

La infección por FeLV normalmente comienza en la mucosa de la orofaringe. Posteriormente, la replicación viral se da en las amígdalas adyacentes, así como los ganglios linfáticos locales. Resulta en la propagación del virus por todo el organismo debido a los linfocitos y monocitos infectados en el tejido linfoide siendo esta la viremia primaria. Seguida por la replicación en médula ósea, lo que implica la infección en los precursores de neutrófilos y plaquetas, lo que da el inicio a la viremia secundaria y por consecuente una infección sistémica (29).

El virus sobrevive mal fuera del gato y se inactiva fácilmente con desinfectantes, jabón y desecación, debido a que su bicapa lipídica no es de resistencia.

Los gatos adultos tienen más probabilidad de infectarse con FeLV que los menores de 6 meses, pero la edad media de los gatos infectados con FeLV es de 3 años, que es menor que la del FIV. Esto refleja (29):

- El mayor grado de patogenicidad es del FeLV que el FIV y su capacidad de reducir significativamente la esperanza de vida.
- El fenómeno de la resistencia que se relaciona con la edad al FeLV, por el cual la exposición de gatos no mayores a 4 meses de edad al virus tiene muchas más probabilidades de provocar una infección progresiva que la exposición de adultos.

### 2.1.3.3. Signos Clínicos y Patogenia

La infección por FeLV puede variar bastante y depende en gran parte por la cepa del virus involucrada, la vía de inoculación y factores influyentes en la función inmune del huésped, tales como la genética, la edad, coinfecciones, estrés y el tratamiento con medicamentos que generen inmunosupresión. Después de la exposición oronasal, se replica en el tejido linfoide oral y después circula en unos pocos monocitos y linfocitos dentro de la sangre periférica. Algunos llegan a desarrollar signos

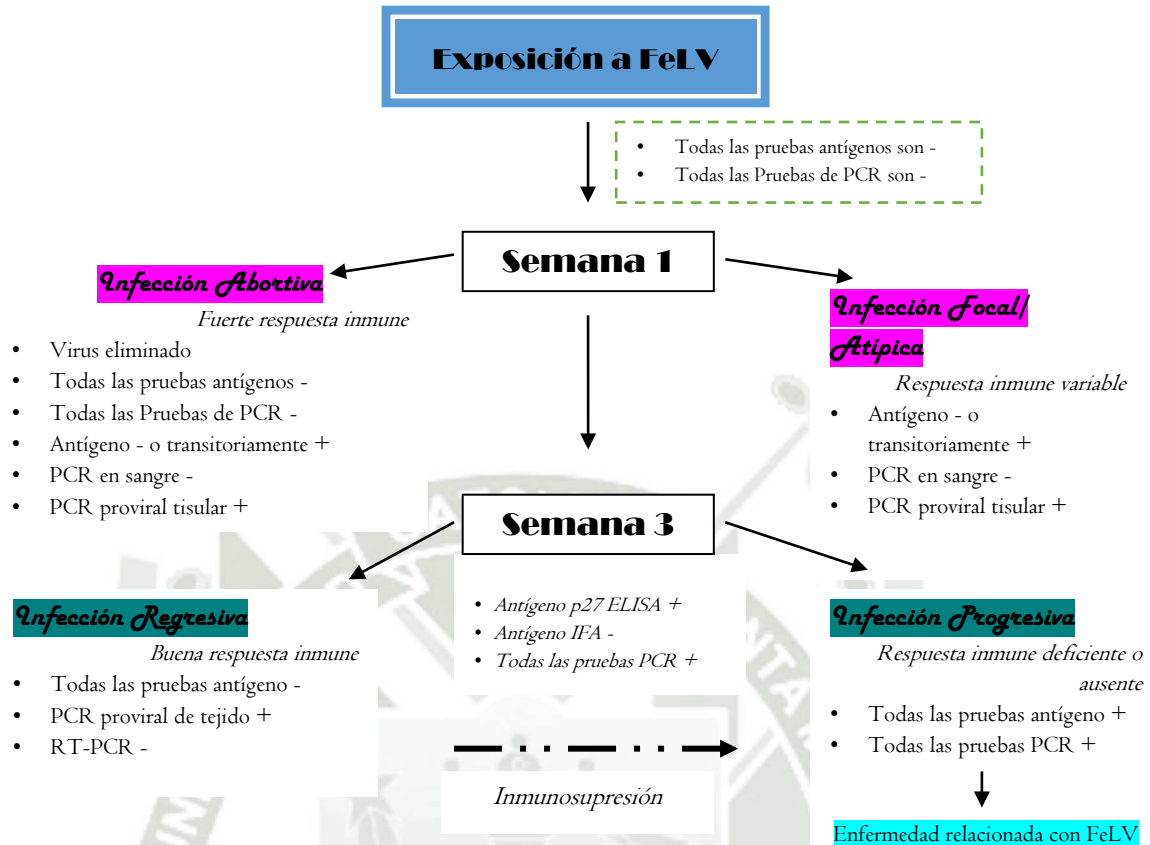
sistémicos, tales como fiebre, letargo y/o linfadenopatía, durante este período (29).

El antígeno viral suele detectarse 30 días o más post infección. La fase aguda de FeLV, se produce entre 2 y 6 semanas después de la infección, rara vez es detectada, pero suele caracterizarse por fiebre leve, malestar, linfadenopatía y citopenia. El organismo no puede generar una respuesta inmunitaria ideal por lo que pueden infectarse de forma regresiva o progresiva. Los gatos infectados de forma progresiva se vuelven persistentemente virémicos y desarrollan una enfermedad progresiva, que finalmente es mortal (23).

Una pequeña cantidad de los linfocitos infectados luego van a la médula ósea, es aquí donde el virus infecta las células precursoras que se terminan por dividirse rápidamente y, posteriormente, las células linfoides y epiteliales en todo el cuerpo. Esta infección de la médula ósea se considera un paso crítico en la patogénesis en la infección por FeLV. Una vez que se produce la infección de las células epiteliales a las glándulas salivales, el virus se eliminara en cantidades masivas en la saliva; pequeñas cantidades de virus también pueden eliminarse en la orina y las heces (29).

La oncogénesis se produce cuando el FeLV es insertado en el genoma celular del huésped, pudiendo ser cerca de un oncogén, dando lugar a la activación, o ya sea de forma directa en el propio oncogén para formar un subgrupo viral recombinante, como el FeLV-B, puede inducir a una nueva actividad neoplásica dada en cualquier célula en la que entre el virus recombinante (23).

Figura 4. Posibles resultados de la infección con FeLV



\*Tomado de Sykes, Jane E.; Hartmann, Katrin (29)

- **Infección Regresiva.** En ciertos casos de gatos infectados su sistema inmunológico es capaz de suprimir la replicación viral en unas pocas semanas luego de haberse dado la infección, antes de que se produzca una infección en la médula ósea resultando significativo ya que de ser así el ADN proviral estaría en el genoma de la célula huésped, pero al no darse no se producirse la producción y eliminación del virus. Esto puede suceder después de que se dé el período inicial de la viremia, o esta puede nunca detectarse (30).

La infección regresiva llega a persistir a lo largo de la vida y este se puede reactivar con inmunosupresión, tal como podría ocurrir durante el embarazo o después del tratamiento con medicamentos inmunosupresores (31).

- **Infección Abortiva.** no se produce viremia después de la infección y el virus no se puede detectar utilizando ningún método. Los gatos con infecciones abortivas han estado expuestos a dosis bajas de FeLV y, aunque no desarrollan viremia, desarrollarán anticuerpos contra el virus (32).
- **Infección Progresiva.** Se desarrolla cuando la infección llega a afectar médula y cuando se excede la capacidad del sistema inmunológico del hospedero para poder suprimir aquella replicación viral se da la

destrucción celular por el virus, por lo que se obtiene viremia persistente (29).

## 2.1.4. Procedimientos de Diagnóstico

### 2.1.4.1. Prueba Viroológica

- **Cultivo y aislamiento del virus:**

Se considera como el procedimiento “gold estándar” para identificar la infección progresiva en los gatos infectados por FeLV, el aislamiento del virus mediante cultivos celulares, pero esta resulta una prueba difícil por la técnica y no es considerada como una prueba de realización habitual (33).

### 2.1.4.2. Pruebas Serológicas

- **ELISA**

Durante las consultas este es el test de elección como rutinario. Este método es capaz de detectar el antígeno viral siendo “la proteína p27” de la cápside del virus la cual resulta soluble en suero o plasma. De esta forma dará un resultado positivo, en la fase de viremia, es decir, antes de que el virus llegue a afectar a la médula ósea por lo que el paciente puede tener o bien una viremia transitoria o una permanente, todo depende de que tras la viremia inicial se puedan recuperar o no. Resulta un test muy fiable, pero sus limitaciones se basan en la especificidad diagnóstica debido a que es menor del 100 % esto significa que el valor predictivo positivo es de un 80 % y su valor predictivo negativo es del 96-100 % (14).

Cuando se utilizan las pruebas ELISA como pruebas de detección, es recomendable que se confirmen los resultados positivos de la prueba debido a es baja la prevalencia de la infección en gatos sanos y existe mayor posibilidad de que se produzcan resultados falsos positivos (29).

- **Prueba de Inmunocromatografía**

Su principio es el mismo que ELISA, aunque este test requiere menor cantidad de muestra y es capaz de revelar la presencia de anticuerpos. La sensibilidad y especificidad es igual que en el ELISA, es decir cercana al 100 %. Detecta anticuerpos contra el VIF, así como antígeno p27 de FeLV esto mediante la muestra de sangre del felino; esto permite que al realizar la misma prueba se pueda determinar si es positiva a alguna una de ellas o si se da una coinfección (34) (35).

- **Inmunofluorescencia indirecta (IFA)**

El primer método dado en 1973, este permitía detectar la infección por FeLV en campo, se basaba en observar granulocitos, linfocitos, y plaquetas de gatos virémicos que portaran la proteína p27; pero la prueba tiene una baja especificidad, por lo que es considerada una herramienta que permite la detección en fase de viremia persistente la cual se da entre las 2 a 12 semanas postinfección o incluso más y por

ello su función es más como una prueba confirmatoria de un test de viremia (13).

Los resultados se interpretan (29):

- Los gatos positivos de IFA tienen infección de la médula ósea y, con raras excepciones, casi siempre se infectan progresivamente.
- Los gatos que dan negativo en los ensayos de IFA pueden estar en una fase virémica transitoria que puede dar lugar a una infección progresiva o regresiva, o pueden tener una infección progresiva pero la sensibilidad de la IFA es demasiado baja para detectarla.

### **2.1.5. Técnicas Moleculares**

La PCR se utiliza comúnmente como un estándar de referencia. Aunque la PCR está más ampliamente disponible en los laboratorios de diagnóstico comerciales que el aislamiento del virus, algunas infecciones se pasan por alto, posiblemente debido a la variación de la secuencia viral y al bajo número de copias en circulación (36)

#### **2.1.5.1. Principio de la PCR**

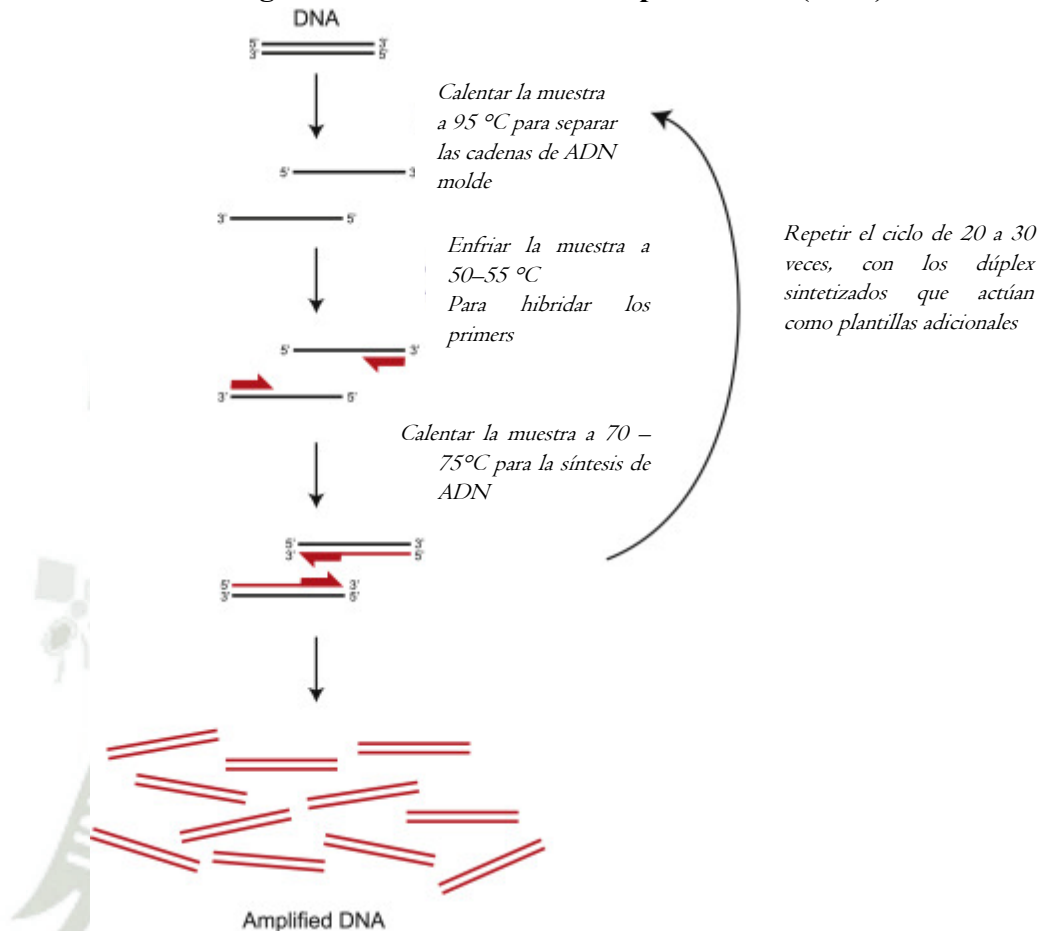
La PCR se puede definir como una reacción que tiene como objetivo una molécula específica y es capaz de duplicarla sintetizando nuevas moléculas de ADN, siendo esta el complemento exacto del ADN. Esta prueba utiliza un conjunto de proteínas llamadas polimerasas para duplicar el ADN objetivo, las polimerasas son enzimas y su trabajo es unir los bloques de construcción individuales del ADN para formar secuencias moleculares. Los suministros necesarios para que estas polimerasas funcionen son un ADN objetivo específico en forma de nucleótidos y basado en adenina (A), citosina (C), timina (T) o guanina (G). Se necesita un Primer o también llamado fragmento de ADN pequeño para unir los bloques de construcción del ADN, y también, básicamente, una molécula de ADN más larga como plantilla para el ADN objetivo y para diseñar nuevas cadenas de ADN (37).

Para que se lleve a cabo la PCR se requiere (38):

- Template ADN
- Forward primer
- Reverse primer
- Nucleotidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
- ADN polimerasa termoestable
- Buffer
- Magnesio (necesario para la actividad enzimática).

Los Primers se sintetizan in vitro utilizando lo que se llama el método de "fase sólida". En este método, las cadenas cortas de ADN se sintetizan añadiendo monómeros activados a una cadena de ADN en crecimiento unida a un soporte insoluble (39).

**Figura 5. Reacción en cadena polimerasa (PCR).**



\*Tomado de Carter, Matt (39).

El ADN bicatenario se calienta a 95 °C para separar las hebras. A continuación, la temperatura se reduce a unos 50-55 °C para permitir que los cebadores se hibriden con sus secuencias complementarias en las hebras de ADN separadas. La temperatura se eleva a unos 70-75 °C para que la ADN polimerasa Taq pueda añadir nucleótidos al extremo 3' en crecimiento del cebador. Este ciclo se repite 20-30 veces hasta que la secuencia de ADN se amplifica exponencialmente (39).

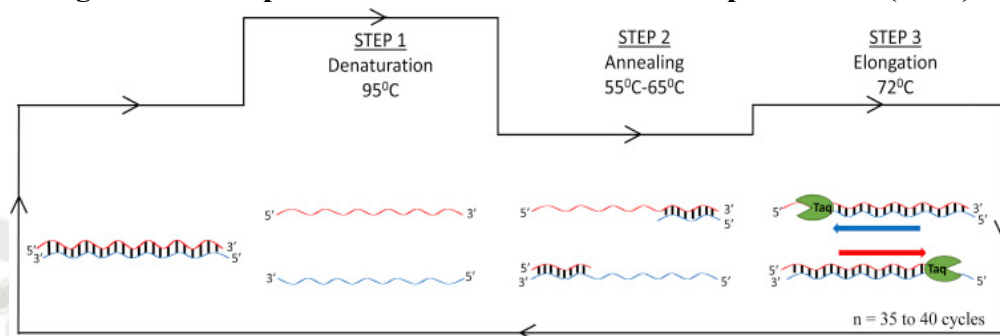
El principio de la PCR se basa en el ciclo térmico, que explota la termodinámica de las interacciones de los ácidos nucleicos. Cada ciclo de PCR comprende tres pasos de temperatura diferentes que se pueden dividir en 3 pasos cruciales (37):

- El primer paso se llama **desnaturalización**, en este paso, dos cadenas de ADN de doble hélice (dsDNA) se cambian a dos cadenas simples de ADN (ssDNA) que se forman a una temperatura de calor de 95 °C.
- El segundo paso se llama **annealing**, que básicamente es la unión de primers a la plantilla de ADN monocatenario del proceso anterior para el inicio de la formación de pares de bases de nitrógeno, que se produjo a una temperatura de 55-60 °C.

- El último paso llamado **extensión o elongación**. En este paso, las bases de nitrógeno se extienden y forman por las polimerasas a partir de las plantillas de ADN a una temperatura de 72 °C.

Se debe repetir estos pasos, normalmente entre 30 y 40 ciclos, para que la secuencia de ADN diana resultante se amplificará exponencialmente, lo que dará como resultado final miles de millones de copias del amplicón (40).

**Figura 6. Principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**



\*Tomado de Overbergh, L (40).

Basándose en este principio simple, una reacción clásica de amplificación por PCR constará de tres fases en el tiempo (40):

- **Amplificación exponencial:** Se basa en que cada ciclo, la cantidad de producto será duplica (dando una eficiencia de reacción del 100%). La reacción es muy sensible y específica.
- **Fase lineal (nivelación):** La reacción es más lenta, debido a la disminución de la actividad del ADN polimerasa Taq y al consumo de reactivos como dNTP y primers.
- **Fase de meseta:** La reacción finalizó y no se van a sintetizar más ácidos nucleicos por el agotamiento de los reactivos y la ADN polimerasa Taq.

La ADN polimerasa realizó su trabajo en la reacción de PCR secuenciando de manera enzimática una nueva cadena de dsADN en base a los bloques de construcción del ADN. Los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) se unirán a los iones de magnesio (Mg) que afectan la concentración de iones para que sean efectivos. Los dNTP son las moléculas que forman las unidades estructurales del ARN y el ADN cuando se unen. La concentración de este ion efectivo es necesaria para la reacción de polimerización que utiliza el ssADN como plantilla (37).

La optimización del proceso de PCR es necesaria para obtener los resultados óptimos de PCR, siendo que varios factores estrechamente relacionados con las condiciones optimizadas para la PCR, como el tipo de ADN polimerasa, la temperatura, la concentración, el tampón de PCR y el tiempo (37).

### 2.1.5.2. PCR para detección del ADN del Provirus

Esta es la prueba más sensible y específica y puede ser dar una respuesta certera en las muestras que la detección mediante antígeno p27 no den resultados claros, de modo que si da un resultado positivo este realmente es positivo al diagnóstico de FeLV pero si el resultado es negativo, no indica que sea absoluto. Se puede realizar mediante tejidos orgánicos de todo tipo (14). Se clasifican la infección mediante los resultados obtenidos, siendo:

- **Latencia:** ELISA es negativo y PCR de ADN positivo en sangre y en médula
- **Viremia:** ELISA es positivo y PCR de ADN positivo
- **Discordantes:** PCR en el tejido afectado es positivo y el resto de las pruebas son negativas

Los ensayos de PCR para el ADN proviral se pueden utilizar en sangre, capas leucocíticas, médula ósea o tejidos de gatos que dan negativo en la prueba del antígeno FeLV. El uso de muestras de médula ósea o de tejido, en lugar de sangre completa, puede aumentar la sensibilidad para la detección del ADN proviral (29).

### 2.1.5.3. PCR para la detección del virus ARN

Para el diagnóstico de FeLV se tiene el nuevo enfoque basado en la detección del virus ARN. El ARN que se encuentra ya sea en sangre entera, plasma, suero, saliva o heces, se excreta y luego es transcrito mediante ARN polimerasa en ADN el cual se amplifica por PCR, la cual permite detectar y cuantificar el virus en ausencia de la célula. De ser positivos los resultados de PCR (14):

- Indica la existencia de material genético proveniente del virus en el genoma del gato afectado.
- De ser la muestra de un gato que es clínicamente sano puede indicar que este, haya tenido la enfermedad y queda como rezago material genético del virus.

Esta prueba de PCR para ARN viral resulta más sensible que aquellas en base a los antígenos solubles. Con esto se entiende que altas cargas de ARN viral en sangre y saliva indican una infección progresiva, mientras que las cargas bajas indican una infección regresiva (41).

Otras variantes de la PCR que se utilizan son:

- **RT-PCR:** Se basa en detectar directamente el virión y no la forma provírica; esta prueba puede ser positiva varias semanas antes a diferencia de las pruebas de antígenos o antes de que el aislamiento del virus sea positivo (29).
- **PCR a tiempo real o cuantitativa:** Esta permite cuantificar el virus o los provirus en sangre, siendo un método más sensible útil para resolver casos

discordantes. Sin embargo, algunos estudios indican que la PCR no es capaz de distinguir si son animales virémicos o no (19).

**Tabla 4. Subtipo Posibles errores diagnósticos con las diferentes técnicas**

Técnica de Sangre	Falsos Positivos	Confirmación	Falsos Negativos	Confirmación
<b>ELISA</b>	Hemólisis de sangre completa Anticuerpos en sangre	Repetir test ELIS en plasma/suero o confimar por PCR/IFD Confrimar por PCR/IFD		
<b>IFD</b>	Frotis gruesos con alta fluorescencia de fondo	Repetir con frotis más finos o mediante PCR/ELISA/Cultiv o	Primeras semanas postinfección Neutropenia, linfopenia o trombocitopenia	Confirmar mediante cultivo, PCR, ELISA o repetir 3 semanas después Confirmar mediante PCR/cultivo
<b>PCR</b>	Contaminación de la muestra con material genético de otro gato	Repetir PCR o confirmar mediante IFD, ELISA/cultivo	Infección latente	Confirmar mediante IFD/PCR en MO o tejido sospechoso

\*Tomado de Palmero, M; Carballés, V (42).

#### 2.1.5.4. Electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa resulta ser un método relativamente fácil de usar, se aplica comúnmente para evaluar si la reacción de PCR tiene éxito. Se utilizan agentes intercalantes o colorantes para visualizar los fragmentos amplificados (43).

##### Principio:

El movimiento de un electrón libre a través de una solución esto bajo un campo magnético externo que genera influencia, siendo conocido como electroforesis. Los iones que cuelgan entre dos electrodos tienen una tendencia a ir en la dirección de los electrodos con cargas opuestas, por lo que (44):

- Debido a sus variadas movilidades electroforéticas, las moléculas con diferentes cargas generales comenzarán a separarse cuando se aplique una diferencia de potencial.
- Debido a que los diferentes tamaños moleculares darán como resultado fuerzas de fricción variables, incluso las moléculas con cargas comparables comenzarán a separarse.

- Como resultado, algunos tipos de electroforesis dependen casi por completo de las diversas cargas de las moléculas para separarlas, mientras que otros aprovechan las diferencias de tamaño de las moléculas (tamaño molecular).
- Sin embargo, las moléculas se habrán dividido en función de sus movilidades electroforéticas.
- Las muestras separadas se encuentran luego mediante autorradiografía o se tiñen con un tinte adecuado.

Los fragmentos del ácido nucleico se van a separar por su longitud a la par que se mueven en una matriz de agarosa. Al agregar el colorante o un agente intercalante tal como el bromuro de etidio (EtBr), se puede visualizar bajo luz ultravioleta estos fragmentos (45). Dado que el EtBr se intercala de manera dependiente de la concentración, debería permitir la evaluación del número de amplicones en una banda específica; además, debería permitir la comparación de la cantidad de productos de PCR de longitud similar en función de su brillo (43).

**Peso Molecular:** La evaluación del brillo de las bandas se puede realizar con un software de procesamiento de imágenes para generar perfiles de gráficos de carriles, encerrando los picos y midiendo las áreas de los picos. Para esta evaluación, se recomienda restar el fondo, las bandas del gel de agarosa se reorganizan al aumentar el brillo y, por lo tanto, representa una cuantificación relativa (43).

**Figura 7. Geles de agarosa luego de la PCR cuyas muestras se ordenaron según el aumento de brillo determinado**



\*Nota: A) Gel de agarosa original con fondo sustraído. B) Imagen virtual con bandas reordenadas digitalmente según el aumento de brillo. Tomado de Wittmeier, Patrick; Hummel, Susanne (43).

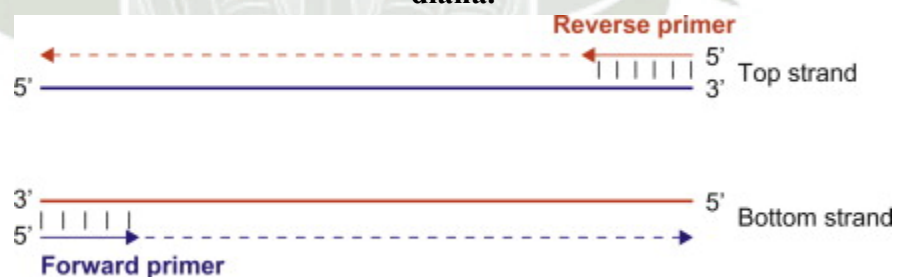
### 2.1.5.5. PRIMER FeVL

Los primers o también denominados cebadores son unas secuencias cortas de las moléculas de ácidos nucleicos siendo de entre 18 a 24 pares de bases (pbs) estos son utilizados para la amplificación de un gen específico o de un fragmento de ADN que se requiera, todo esto es mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (46). Los cebadores de PCR son un componente integral de la PCR. Los cebadores bien diseñados permiten que el sistema de PCR funcione con exactitud y precisión (47).

Son uno de los principales materiales para realizar una reacción de PCR, ya que de estos depende la especificidad, debido a que al complementarse a las dos cadenas de ADN de la secuencia molde, fijaran las coordenadas donde a partir de ahí se dará la reacción (46).

Los cebadores de ADN son secuencias cortas de una sola hebra complementarias a los extremos de la secuencia que se va a amplificar y están orientadas en direcciones opuestas. En otras palabras, los dos cebadores deben flanquear una región de ADN, con un cebador anillado a la hebra sentido y otro a la hebra antisentido, con los cebadores orientados uno hacia el otro. Ambos cebadores son necesarios para que se produzca la amplificación exponencial (38).

**Figura 8. Orientación de los cebadores de PCR en relación con el ADN diana.**



\*Nota: El cebador directo se va a unir al extremo 3' de la cadena inferior. Cuando se extiende el cebador directo, se crea una copia de la cadena superior. El cebador inverso se va a unir al extremo 3' en la cadena superior. Cuando se extiende el cebador inverso, se crea una copia de la cadena inferior. Si la cadena superior corresponde a la cadena con sentido, el cebador directo crea una copia de la cadena con sentido, aunque se una al extremo 3' de la cadena antisentido. Por convención, la secuencia de un gen se refiere a la cadena similar al ARNm. La plantilla utilizada por la ARN polimerasa durante la transcripción es la cadena antisentido de un gen. Esta convención facilita la conceptualización de los dominios de secuencia y su correlación con los motivos proteicos. Tomado de Carson, Susan (38).

A continuación, se puede observar distintas tablas en las que se indica de acuerdo a la PCR realizada, el cómo distribuyen los primers como Forward o Reverse.

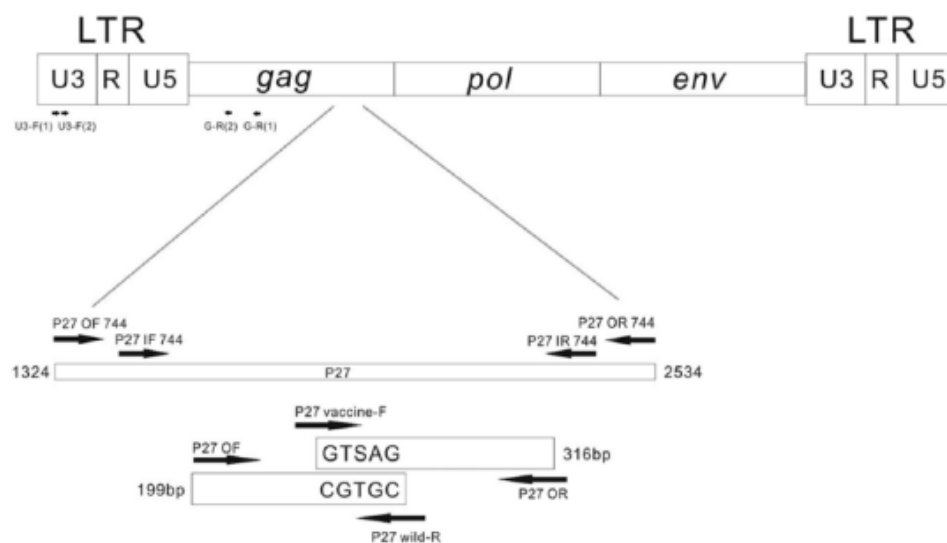
**Figura 9. Primers para la detección del virus de Leucemia Felina**

Primer name	Type	Sequence (5'-3')	Nucleotide position	Reference
FeLV-U3-F(1)	Forward outer	ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC	187–206	24
FeLV-G-R(1)	Reverse outer	GACCAGTGATCAAGGGTGAG	937–956	24
FeLV-U3-F(2)	Forward inner	GCTCCCCAGTTGACCAGAGT	225–244	24
FeLV-U3-R(2)	Reverse inner	GCTTCGGTACCAAACCGAAA	806–825	24
P27 OF 744	Forward outer	AAGGTGTTACCGCCTGATCCTTC	1324–1343	Current study
P27 OR 744	Reverse outer	TTCGTTAGTACTGAGTGCTGGGC	2515–2534	Current study
P27 IF 744	Forward inner	CCCTGCTGAAGAATCTCAAG	1473–1492	Current study
P27 IR 744	Reverse inner	GGCCAGAACTTTAGTCATCTC	2224–2244	Current study
P27 OF	Forward outer	ATCAACCAACCTGGGACGACTGCC	1640–1663	Current study
P27 OR	Reverse outer	GGGTGAACCCTTGTAGACCTTCTAGCC	2084–2110	Current study
P27 vaccine-F	ARMS inner	ACCCGTCCCAACTGGGATTTGTS	1795–1818	Current study
P27 wild-R	ARMS inner	TGCTCCCTACCTGCCGGCGCA	1818–1838	Current study

\* ARMS = amplification refractory mutation system. The nucleotide position number was based on the sequence of GenBank accession no. AF052723.

\*Tomado de Ho, Chia-Fang (48).

**Figura 10. Región del genoma del virus de Leucemia Felina usado para el diseño del primer**



\*Tomado de Ho, Chia-Fang (48).

En el estudio ejecutado por (49) para el primer fragmento del gen *env* de FeLV-A, se utilizó RB-59 como Primer Forward y PDR como Primer Reverse inverso para delimitar una región de 276 pb del gen. Para el segundo fragmento del gen *env* de FeLV-A, se utilizó SDF como Primer Forward, comenzando en 84 pb dentro de la región anterior, y se utilizó RB17 como Primer Reverse.

**Tabla 5. Descripción de los primers utilizados y tamaño de los amplicones generados para la identificación de los subtipos FeLV-A y FeLV-B**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Producto
<b>exFeLV provirus U3-LTR; gag</b>		
<b>U3-F (1)</b>	ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC	770 bp
<b>G-R (1)</b>	GACCAGTGATCAAGGGTGAG	
<b>U3-F (2)</b>	GCTCCCCAGTTGACCAGACT	600 bp
<b>G-R (2)</b>	GCTTCGGTACCAAACCGAAA	
<b>exFeLV provirus pol/env; LTR</b>		
<b>pol/env-F6A-F</b>	ACATATCGTCCTCCTGACCAC	2,372 bp (FeLV-A)
<b>LTR-F6A-R</b>	GAAGGTCGAACTCTGGTCAACT	2,432 bp (FeLV-B)
<b>FeLV-A</b>		
<b>RB59-F</b>	CAATGTAAAACACGGGGC	1,072 bp
<b>RB17-R</b>	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG	
<b>FeLV-B</b>		
<b>RB53-F</b>	CTCGATAACGGGAGCTAG	862 bp
<b>RB17-R</b>	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG	
<b>Primers for FeLV-A sequencing</b>		
<b>RB59-F</b>	CAATGTAAAACACGGGGC	276 bp
<b>PDR*</b>	CATTTTCCCTCACAGCTATTGTC	
<b>SDF**</b>	GAGAAGCTTGGTGGGAAG	884 bp
<b>RB17-R</b>	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG	

† Tomado de Biezus, Giovana (49).

Nota:

\*Position: 6519–6541 / Secuencia en GenBank KP728112.1

\*\*Position: 6454–6470 / Secuencia en GenBank KP728112.1

## 2.2. Antecedentes de investigación

### 2.2.1. Análisis de tesis

**Autor:** Autran Martínez, Marcela

**Título:** Uso de la Técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de leucemia viral felina y el análisis filogenético de los productos amplificados. México, D, F. 2014

**Metodología:**

- Se tuvo como población de estudio a 100 gatos.
- Se obtuvo la muestra de suero y plasma por venopunción de vena yugular o radial en tubos EDTA. Posteriormente centrifugadas, siendo el sobrenadante almacenado en tubos Eppendorf a -20°C.
- Se obtuvo células mononucleares de la sangre periférica, muestras recolectadas de sangre.

- Para la PCR, se buscó diseños de iniciadores en programas bioinformáticos y secuencias nucleotídicas de genomas del FeLV en la base de datos GeneBank siendo: ABO06732, AFO52723, M18247, AY364318, AY364319 y AB672613.
- Se realizó la extracción del ADN proviral con un kit comercial Favorprep.
- La estandarización de PCR se realizó para los 2 pares de iniciadores específicos que fueron diseñados para unirse a los genes pol y env del virus de leucemia felino.
- Mediante electroforesis se realizó la visualización de los productos amplificados en el gel de agarosa al 1.5%, se utilizó 100 pb, y posteriormente se observó en un transiluminador.
- Los productos finales de la PCR que fueron positivas se enviaron a la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la UNAM FES-Iztacala, para realizar la secuenciación y análisis filogénico.
- Con la finalidad de evaluar la eficacia de las técnicas serológicas estandarizadas y diseñadas, se evaluó las muestras por técnica de Elisa Indirecta, Western Blot, se utilizó como antígeno la proteína recombinante gp70.

**Resumen:**

Se obtuvo que el 82% de animales resultaron seropositivos a Elisa Indirecta y 89% a Western Blot, siendo que de los sueros el 14% fue negativo, y el 1% discordante entre ambas pruebas. La Elisa Indirecta obtuvo una sensibilidad del 87% con una especificidad de 88% sobre la prueba Western Blot; en cambio la PCR basada en la detección del ADN proviral a partir de las células mononucleares de la sangre periférica obtuvo una sensibilidad del 92% y una especificidad del 95%, demostrando así que la PCR es la técnica adecuada para el diagnóstico de Leucemia Felina

Se realizó la construcción del árbol filogénico para la región del gen pol, la cual ubicó las 17 secuencias con alta homología con secuencias descritas dentro del grupo de retrovirus endógeno felino y subgrupos recombinantes B/C. Para la región del gen env, se ubicó sus 38 secuencias se ubicaron como retrovirus endógenos con alta homología por el subgrupo endógeno enFeLVGGAT, enFeLVAAGG y CATFELV-P. Estas secuencias forman su propio grupo el cual es totalmente diferente a los que se reportan a nivel mundial. (50).

**Autor:** Leight Stimson, Erin

**Título:** Detección del Virus de la Leucemia Felina en la médula ósea mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

**Metodología:**

- Recolección de variedad de muestras sanguíneas y de médula ósea de 50 gatos, así como médula de un feto. De estos 11 eran criados en laboratorio, 13 de un albergue y 10 con el feto son atendido en el

Hospital Veterinario Docente, el resto se obtuvo de origen aleatorio. Se basaron en la sinología para su selección.

- Se extrajo las muestras de sangre a través de venopunción en la yugular y se recolectaron en tubos EDTA y tubos separadores de suero.
- Se les sedó con ketamina y diazepam y se hizo el mantenimiento con isoflurano para recolectar muestra de medula ósea del humero. En caso de eutanasia se esperó 3 min post mortem y se fracturó el humero para la extracción de la medula.
- Se realizó prueba de ELISA para detectar presencia del antígeno p27 libre.
- La extracción del ADN, las muestras de sangre se extraen mediante un kit comercial, mientras que las muestras de ADN de la medula ósea son a través de un protocolo tisular y cultivo celular FL74 siendo esta última el control positivo. Se confirma la presencia de ADN en gel de Agarosa al 1.5% mediante la Electroforesis y se observa y fotografía bajo luz UV.
- Los cebadores se diseñaron en una secuencia de 495 pb en la región LTR U3.
- La PCR se realizó en el termociclador, algunas muestras se repitió el proceso a mayor temperatura para evitar falsos negativos.
- Se realiza posteriormente la electroforesis y se observa con transiluminación UV. Se les consideró positivos si tenían una banda de 495 pb.
- La secuenciación de ADN se realizó mediante métodos estándar, comparando con la secuencia del gen 5' LTR-gag obteniendo una homología de 97.5%
- Se realiza estadística kappa para probar concordancia entre PCR de sangre y PCR de medula ósea.

#### **Resumen:**

Se tuvo como resultados que la PCR detecta el ADN proviral del FeLV tanto en la sangre como en la medula ósea de gatos infectados, sin embargo, no detecta si es una infección latente. Algunas muestras de medula no pudieron ser visualizadas y se cree se debió aplicar una PCR más sensible como la anidada. Ningún gato dio solo positivo a la PCR de medula ósea, lo que indica que se puede utilizar esta técnica para detectar el ADN proviral en la medula pero que ninguno de los gatos del estudio tuviese el ADN proviral solo en medula (51).

#### **2.2.2. Análisis de trabajos de investigación**

**Autor:** Banda Faruku, Sitio Suri Arshad

**Título:** Detección molecular, análisis filogenético e identificación de motivos de transcripción en el virus de la leucemia felina de gatos infectados de forma natural en Malasia

**Metodología:**

- **Animales y muestreo:** Se recogieron muestras sanguíneas heparinizadas de gatos presentados en el Hospital Universitario de Enseñanza Veterinaria, Universiti Putra Malaysia (UVH-UPM). Las muestras se analizaron para detectar si hay presencia del antígeno viral p27 de FeLV utilizando un kit de prueba disponible comercialmente. Estos gatos se dividieron en grupos con antígeno p27 positivo y antígeno p27 negativo.
- **Amplificación de ácidos nucleicos y PCR:** El ARN viral se extrajo del plasma de gatos p27-positivos, utilizando un kit de purificación de ARN viral de alta pureza (Roche, Alemania). Por otro lado, el ADN genómico se aisló de la sangre completa de gatos p27-negativos, utilizando kits de extracción de ADN QIAGEN.
- **Análisis secuencial y filogenético:** Para poder tener información sobre las características de las secuencias de FeLV de Malasia, se seleccionaron 29 muestras positivas por PCR anidadas (ARN  $n = 14$ ; ADN provirus  $n = 15$ ) y se purificaron utilizando un kit de purificación Accuprep (Bioneer, Daejeon, Corea). La secuenciación se llevó a cabo en base al segmento U3LTR-gag amplificado utilizando un kit de secuencia estándar ABI Big Dye terminator versión 3.1 (Applied Biosystem). Las secuencias obtenidas se analizaron para homología utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico NCBI

#### Resumen:

Se utilizó un ensayo de PCR anidada para determinar el estado del ARN viral y del ADN proviral de los gatos infectados naturalmente. Las muestras seleccionadas que fueron positivas para FeLV por PCR se sometieron a secuenciación, análisis filogenético y búsqueda de motivos. De las 39 muestras que fueron positivas para el antígeno p27 de FeLV, el 87,2% (34/39) se confirmaron positivas con PCR anidada. El ADN proviral de FeLV se detectó en 38 (97,3%) de las muestras negativas al antígeno p27. Se encontró que los aislamientos de FeLV de Malasia son muy similares con una homología del 91% al 100%. El análisis filogenético reveló que los aislamientos de FeLV de Malasia se dividieron en dos grupos, con una mayoría (86,2%) compartiendo similitud con FeLV-K01803 y menos aislamientos (13,8%) con la cepa FeLV-GM1. Se han descubierto diferentes motivos potenciadores, incluidos NF-GMa, Krox-20/WT11-del2, BAF1, AP-2, TBP, TFIIF-beta, TRF y TFIID, que aparecen de forma individual, duplicada, triplicada o en grupos de 5 en diferentes posiciones dentro de la región U3-LTR-gag. El presente resultado confirma la presencia de ARN viral de FeLV y ADN de provirus en gatos infectados de forma natural. Los aislamientos de FeLV de Malasia son muy similares y la mayoría de ellos están estrechamente relacionados con un aislamiento del Reino Unido. Este estudio proporciona la primera información basada en moléculas sobre FeLV en Malasia. Además, se han identificado diferentes motivos

potenciadores probablemente asociados con la patogénesis relacionada con FeLV.

Este estudio reveló la presencia de ARN viral FeLV y ADN proviral entre gatos malayos infectados naturalmente. Según la secuencia U3LTR-gag, los aislamientos de FeLV de Malasia están altamente conservados y más estrechamente relacionados con el aislamiento K01803 del Reino Unido en comparación con los aislamientos taiwaneses y otros de referencia. La presencia de múltiples potenciadores, algunos de los cuales se han relacionado con tumores inducidos por FeLV, puede contribuir al desarrollo de un pronóstico desfavorable en gatos malayos infectados naturalmente, aunque esto necesita más investigación (52).

**Autor:** Chia-Fang Ho, Kun-Wei Chan, Wei-Cheng Yang, Yu-Chung Chiang, Yang-Tsung Chung, James Kuo y Chi-Young Wang

**Título:** Desarrollo de un sistema de amplificación múltiple de mutación refractaria mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa para el diagnóstico diferencial de la vacuna del virus de la leucemia felina y las cepas salvajes

**Metodología:**

- Se inicia por la recolección y análisis de las muestras
- Se realiza el análisis inmunocromatográfico de P27
- Se aísla el ADN y ARN de glóbulos blancos
- Se da la reacción en cadena de la polimerasa, así como la transcripción inversa, PCR y clonación de secuencia
- Se procede con la transcripción in vitro del plásmido FeLV
- Se da el sistema de mutación refractaria a la amplificación RT-PCR y ARMS qRT-PCR combinado con análisis de fusión de alta resolución
- Se busca la sensibilidad y especificidad de ARMS RT-PCR y ARMS qRT-PCR
- Análisis filogenético

**Resumen:**

Se desarrolló un sistema de reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa y amplificación múltiple refractaria (ARMS RT-PCR) para poder realizar un diagnóstico diferencial de las cepas que se hayan en la vacuna y las de tipo salvaje del FeLV basándose en una mutación específica de la cepa de la vacuna (S) así como de la cepa de tipo salvaje (T) ubicada en el gen p27.

No se obtuvieron resultados tales como un falso positivo con los 6 patógenos no relacionados y 1 línea celular felina. Se identificaron correctamente doce cepas de FeLV Taiwán utilizando ARMS qRT-PCR combinado con HRMA. Estos genotipos de las cepas coincidieron con el del tipo salvaje de FeLV con al menos un 91,17 % de confianza. Se encontró un

mayor grado de polimorfismo de la secuencia en todo el gen p27 si se compara con la región de la repetición terminal larga.

En conclusión, este estudio describe la relación filogenética de las cepas de FeLV que se hallan en Taiwán y demuestra que el ensayo RT-PCR ARMS desarrollado se puede utilizar para poder detectar la replicación de una cepa de vacuna que no hayan sido inactivada adecuadamente (48).



## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización y Materiales

##### 3.1.1. Localización del Trabajo

###### 3.1.1.1. Espacial

El presente trabajo se realizó en la ciudad de Arequipa, mientras que la secuenciación molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular ADN Uchumayo.

###### 3.1.1.2. Temporal

El presente trabajo se realizó durante los meses de agosto 2024 a abril 2025.

##### 3.1.2. Materiales biológicos

- 4 Muestras de Sangre de Gatos positivo a Leucemia Felina.

##### 3.1.3. Materiales de laboratorio

- 24 Eppendorf
- Buffer RBC Lysis
- Buffer Lysis JCBO
- SDS 10%
- Proteinasa K
- Fenol Cloroformo
- Enzima RNAsa
- Acetato de Sodio
- Isopropanol
- Etanol Absoluto (grado molecular)
- Mastermix
- Primer En-LT
- Primer RB-53
- Primer RB-59
- Marcador
- Agua Libre de Nucleasas
- Agarosa en Polvo 5%
- Reactivo TAE
- SYBR Safe
- Loading Buffer

##### 3.1.4. Materiales de campo

- Cuaderno
- Lapicero
- Marcador indeleble

### 3.1.5. Equipos y Maquinarias

- Centrifuga
- Micropipeta
- Tempblock Module Heater
- Termociclador para la amplificación de ADN (PCR)
- Vortex
- Horno Microondas
- Refrigerador
- Equipo de Electroforesis
- Cámara de Iluminación
- Cámara digital

### 3.1.6. Otros materiales

- Guantes de látex estériles
- Mandil
- Barbijo

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Muestreo

#### 3.2.1.1. Universo:

Gatos positivos a leucemia que llegan a las veterinarias de Arequipa

#### 3.2.1.2. Tamaño de muestra:

4 Gatos (muestreo por conveniencia)

#### Criterio de inclusión de la muestra

- Gatos positivos a Leucemia felina por Prueba de Inmunocromatografía.
- Gato en fase progresiva de la enfermedad.
- Gato mayor a 1 año.

#### Criterio de exclusión de la muestra

- Gatos negativos a Leucemia felina por Prueba de Inmunocromatografía.
- Gato en fase regresiva o abortiva.
- Gato menor a 1 año.

#### 3.2.1.3. Procedimiento de muestreo:

**3.2.1.3.1.** Se realizó un examen clínico al felino, para ver que su sintomatología concuerde la fase progresiva de leucemia felina, es decir, se realiza un test de inmunocromatográfica al cual debe dar positivo, y de acuerdo a su caso clínico se indica a que fase pertenece.

**3.2.1.3.2.** Se realizó la toma de muestra sanguínea.

**3.2.1.3.3.** Se recolectó la muestra en un tubo de EDTA y se envía refrigerado al laboratorio para que se realice la extracción de ADN.

### 3.2.2. Métodos de evaluación

#### 3.2.2.1. Metodología de la experimentación

##### *Extracción de ADN de la muestra*

Existen diversas técnicas para la extracción de ADN, la que se aplicó en el laboratorio se basa en la separación de glóbulos blancos de los glóbulos rojos, debido a que el ADN se extrae de los blancos porque a diferencia de los rojos, no carecen de núcleo, además, se busca aislar al ADN eliminando toda proteína.

##### Fenol Cloroformo

- Se pone en un Eppendorf 300  $\mu$ l de sangre de muestra.
- Se adiciona 1 ml de Buffer RBC Lysis y esto se homogeniza moviendo.
- Se guarda en hielo y se pone en refrigeración por 10 minutos, pero a los 5 min se saca para mezclar y se vuelve a ingresar.
- Se centrifuga por 5min a G 3000 ó RPM 1800.
- Se extrae el sobrenadante y se deja Pellet (glóbulos blancos).
- Se le agrega 500  $\mu$ l de Buffer Lysis JCBO, 5  $\mu$ l de proteinasa K y 50  $\mu$ l de SDS 10%.
- Se coloca en Tempblock durante 1 hora a 55 °C, debido a que a esta temperatura la proteinasa K actúa.
- Se agrega FenolCloroformo 500  $\mu$ l y resuspender, se obtendrá aspecto lechoso.
- Se pone en centrifuga a 13 000 rpm durante 10 minutos.
- Se rotula otro Eppendorf de acuerdo a el número de muestra.
- Al salir tubo de centrifuga se observa 3 fases, fase fenólica, fase proteica y fase soluble, siendo la ultima la que se extrae para tener el ADN aislado.
- En este nuevo tubo se agrega 5  $\mu$ l de enzima RNAsa, la cual se extrajo de la refrigeradora y se centrifugo previamente durante 15 a 10 segundos a 5 000 rpm.
- Se coloca en Tempblock a 37 °C por 7 minutos.
- Se vuelve a agregar fenolcloroformo 500  $\mu$ l.
- Se centrifuga a 13 000 rpm durante 10 minutos.
- Se recupera el sobrenadante en otro Eppendorf previamente rotulado.
- Se le agrega 80  $\mu$ l de Acetato de Sodio, la cual se encarga de terminar de capturar la proteína, se mezcla por inversión.
- Adicionar 500  $\mu$ l de Isopropanol y se observa aspecto lechoso que se transforma en transparente.
- Se realiza un baño de hielo dejándolo 20 min en el congelador.
- Centrifugar por a 13 000 rpm durante 10 min.

- Se elimina Isopropanol y se queda el pellet, para hacer esto se debe embrocar una sola vez el líquido y secar en papel.
  - Al pellet que queda se le agrega Etanol Absoluto.
  - Centrifugar de nuevo a 13 000 rpm por 2 minutos.
  - Se embrocar y secar como previamente se indicó.
  - Se deja en el ambiente por 5 min, para que se evapore el Etanol.
  - Se pone en Tempblock por 40 segundos.
  - Se le coloca 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.
- Este proceso se realiza en las 4 muestras de sangre.

#### ***Ampliación del ADN***

- Centrifugar las muestras del ADN que se extrajo a 1 500 rpm durante 10 segundos.
  - Centrifugar el primer a 1 500 rpm durante 15 a 20 segundos.
  - Rotular Eppendorf “Primer En-LT”
  - Agregar 20  $\mu$ l de agua de PCR.
  - 20  $\mu$ l de Master Mix.
  - 2  $\mu$ l del Primer.
  - Se homogeniza todo pipeteando.
  - Se agrega 1  $\mu$ l de ADN centrifugado y se pipetea.
  - Se coloca en el Termociclador y se configura el equipo, buscando en la librería de protocolo el nombre de mi primer, se coloca el agua volumen, el cual es aproximadamente 40  $\mu$ l y se inicia, siendo la espera de aproximadamente 2 horas y 30 min. Se obtiene 2500 pares de bases (pb).
  - Se congela 5 min.
- Se realiza esto con las 4 muestras

Al ser una PCR Anidada, se vuelve a realizar una segunda PCR.

- Se rotula 2 Eppendorf de acuerdo al primer “RB-53” y “RB-59”
  - Se debe centrifugar los primer a 1 500 rpm durante 15 a 20 segundos.
  - En el Eppendorf “RB-53” se agrega 20  $\mu$ l de Agua de PCR, 20  $\mu$ l de MasterMix 20  $\mu$ l, 2  $\mu$ l del Primer RB-53 y 1  $\mu$ l del resultado de la primera PCR.
  - En el Eppendorf “RB-59” se agrega 20  $\mu$ l de Agua de PCR, 20  $\mu$ l de MasterMix 20  $\mu$ l, 2  $\mu$ l del Primer RB-59 y 1  $\mu$ l del resultado de la primera PCR.
- Se repite esto para las 4 muestras

- Se debe colocar los Eppendorf RB-53 en una maquina y los Eppendorf RB-59 en otra debido a que son diferentes las temperaturas, se espera 2 horas y 30 min. Se obtiene del primer RB-53 1000 pb y del primer RB-59 800 pb.
- Se congela durante 5 min.

#### ***Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%***

Gel de Agarosa:

- Se coloca 15 ml de TAE
- Se agrega 225 mg de Agarosa en Polvo 1.5% que es la adecuada para 80 pb a 4 kb.
- Se disuelve la agarosa con calor al ponerla 40 segundos a 1 minuto en el microondas.
- Se deja reposar 3 min.
- Se adiciona 1  $\mu$ l de SYBR Safe para dar algo de coloración.
- Se coloca en molde y se hace perforación para los pozos.
- Se espera 5 a 10 minutos para que enfríe.
- Refrigerar durante 10 a 5 minutos.

Cámara de Electroforesis

- Se coloca el gel de agarosa al 1.5% en la Cámara.
- Se coloca TAE hasta cubrir la agarosa
- Se coloca 10  $\mu$ l de Buffer Loading en cada casilla (En caso de extracción de ADN ya que requiere coloración).
- Se llena los pozos con 5  $\mu$ l de los resultados de la extracción de ADN, luego en la primera PCR y se repite para la segunda PCR anidada; 4  $\mu$ l del marcador en cada caso.
- Se enciende y configura la cámara a 80 voltios durante 30 minutos.

#### **3.2.2.2. Recopilación de la información**

##### **a. En el campo**

Se obtuvo muestras al recolectar un tubo de EDTA de 4 gatos.

##### **b. En el laboratorio**

Se obtuvo de las muestras la secuenciación molecular de cada muestra

##### **c. En la biblioteca**

Se realizó una recopilación de información respecto a la secuenciación molecular del virus de la leucemia felina.

##### **d. En otros ambientes generadores de la información científica**

Se obtuvo información de programas de bioinformática con bases de datos como GenBank.

### 3.3. Variables de respuesta

#### 3.3.1. Variables independientes

Agente etiológico causante de leucemia felina

#### 3.3.2. Variables dependientes

Secuenciación de nucleótidos que pertenece al genoma del agente etiológico de la leucemia felina.

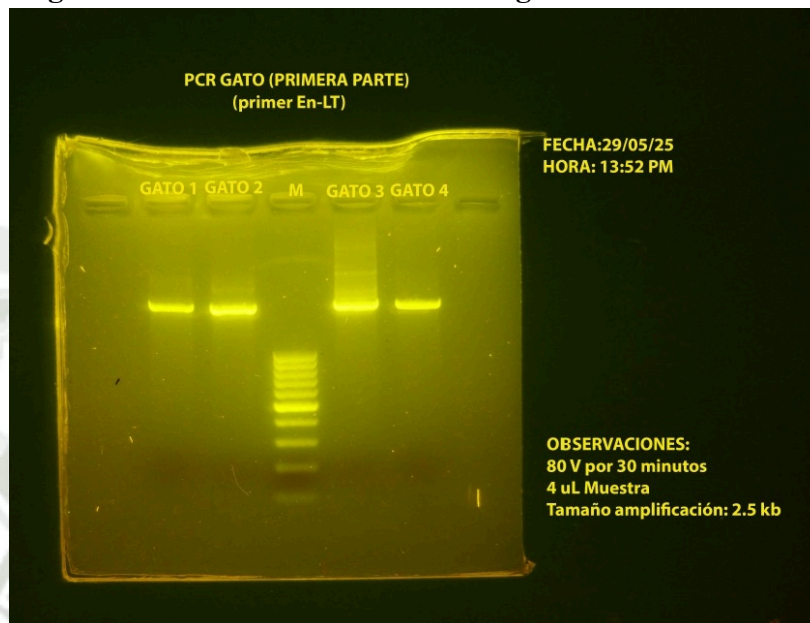


## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1. Extracción del ADN

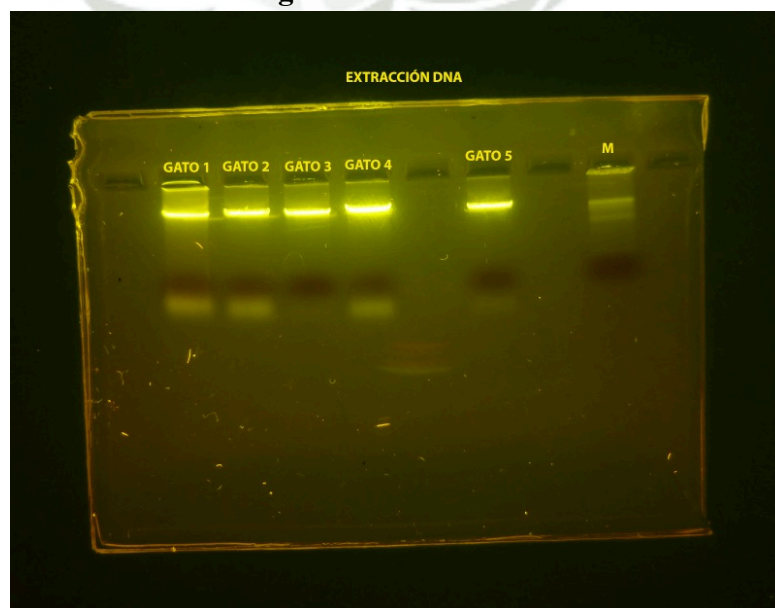
**Figura 11. Extracción del ADN de 4 gatos mediante PCR**



En el gel se observa que las cuatro muestras de suero analizadas contenían ADN del virus de la leucemia felina (FeLV), el cual fue correctamente amplificado mediante PCR, dando productos de 2.5 kilobases. La nitidez y uniformidad de las bandas reflejan que la extracción de ADN fue exitosa, sin inhibidores aparentes y con buen rendimiento. No se observan productos secundarios, lo que reafirma la especificidad de los primers utilizados.

#### 4.2. Aplicación de Técnica de PCR

**Figura 12. Extracción**



\*Nota: El gato 5 es una muestra control de ADN, no pertenece a las muestras positivas a Leucemia.

La imagen corresponde a una etapa crítica previa a la PCR, ya que la eficacia del proceso de amplificación depende directamente de:

- La pureza del ADN (sin contaminantes inhibidores).
- La integridad del ADN (para que los primers se unan eficientemente).
- La concentración adecuada (para evitar reacciones fallidas o sobrecarga).

Dado que todas las muestras (GATO 1 al 4) cumplen visualmente estos criterios, se puede asumir que la PCR aplicada posteriormente tendrá alta probabilidad de amplificación exitosa. Esto se confirmó en la figura 11 (banda de ~2.5 kb amplificada en todos los gatos), validando la especificidad de los primer En-LT y la sensibilidad del protocolo implementado.

La calidad e integridad del ADN extraído desde muestras de suero felino fue óptima, como lo demuestra la visualización nítida de bandas en todos los carriles del gel. Esto garantizó la efectividad de la amplificación por PCR del fragmento de 2.5 kb correspondiente al gen env del virus FeLV. Por tanto, el ensayo demuestra un flujo exitoso de diagnóstico molecular desde la extracción hasta la detección específica del ADN viral.

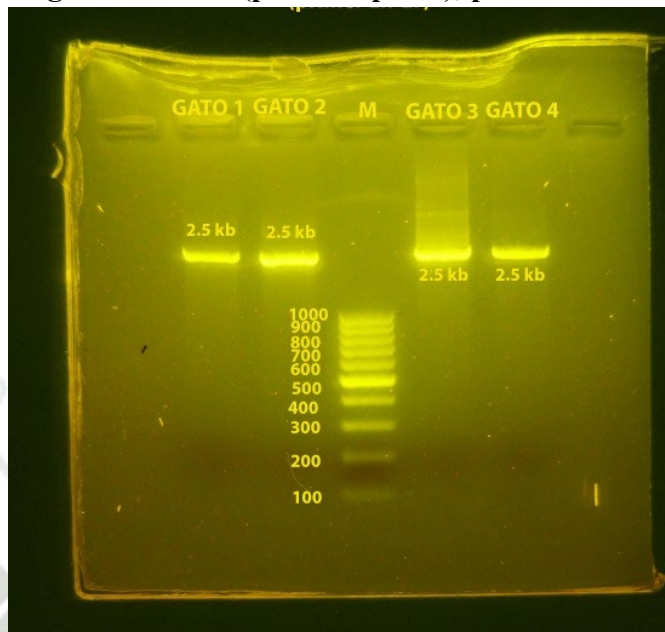
#### 4.3. Aplicación de la Técnica de Electroforesis y Peso Molecular, y Bioinformática de las Secuencias Moleculares del Virus de la Leucemia Felina

Electroforesis de las 4 cepas del Virus de la Leucemia Felina

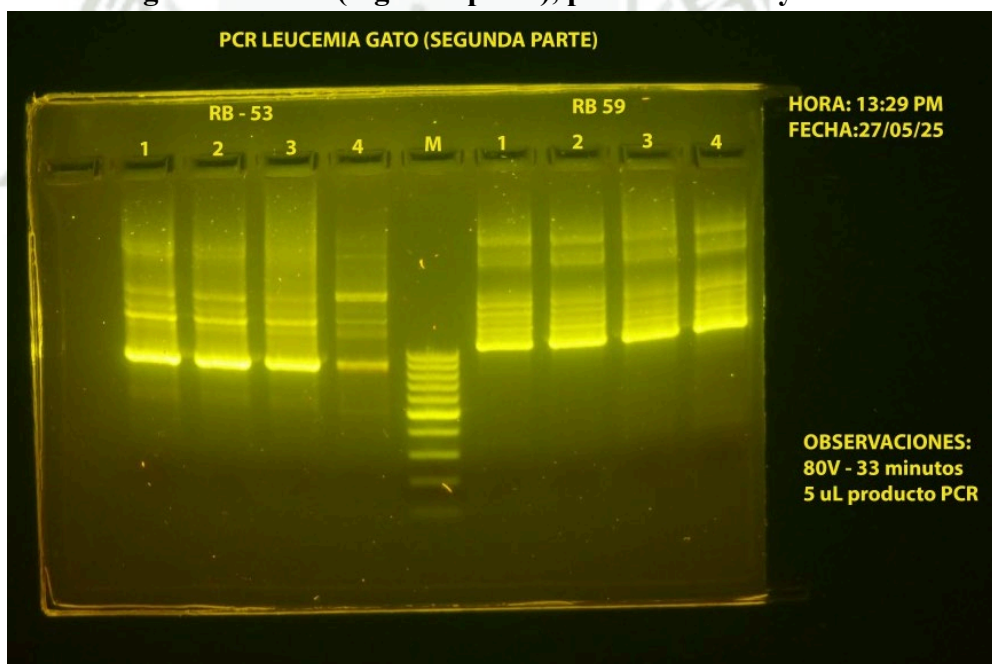
Figura 13. En-LT



**Figura 14. PCR (primera parte), primer En-LT**



**Figura 15. PCR (segunda parte), primers RB-53 y RB-59.**



La electroforesis en gel agarosa permitió validar visualmente los productos amplificados por PCR de las cuatro cepas del FeLV. Se confirma la presencia de ADN viral en todas las muestras, respaldando la posterior identificación molecular y análisis filogenético.

**Bioinformática de las Secuencias Moleculares del Virus de la Leucemia Felina**

**a. Identificación de la Muestra 1**

**Query ID**

lcl|Query\_4014753

**Descripción**

G1\_Feline Leucemia Virus FFF1-R y F TRIM QUALITY: 20

**Tipo de Molécula**

ADN

**Query Length**

1848

**b. Similitud de las Muestras con las 10 primeras secuencias registradas en el Genbank**

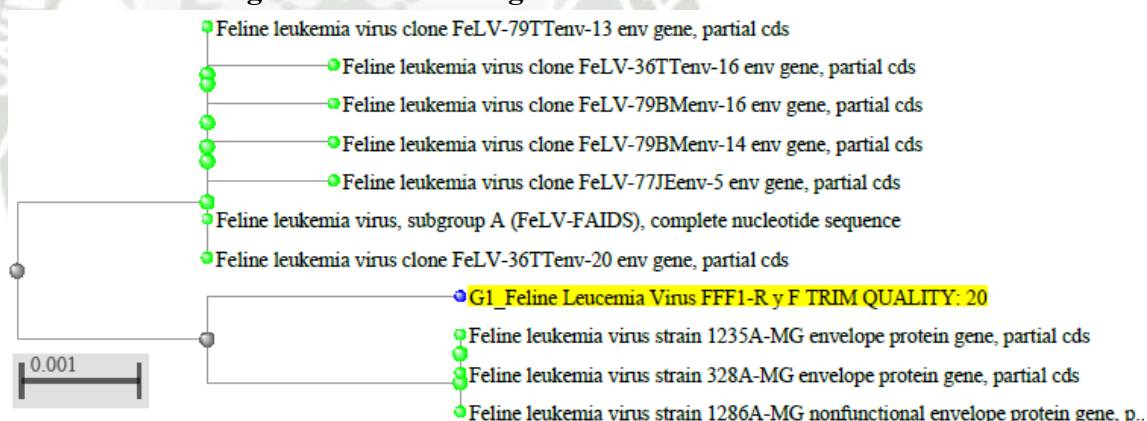
**Tabla 6. Similitud de Muestra 1**

<b>G1_Feline Leucemia Virus FFF1-R y F TRIM QUALITY: 20</b>						
<b>Select for downloading or viewing reports</b>	<b>Description</b>	<b>Scientific Name</b>	<b>Total Score</b>	<b>Query Cover</b>	<b>Per. Ident</b>	<b>Acc. Len</b>
Select seq EU629218.1	Feline leukemia virus strain 1235A-MG envelope protein gene, partial cds	Feline leukemia virus	3357	100%	99.57%	1072
Select seq EU629217.1	Feline leukemia virus strain 328A-MG envelope protein gene, partial cds	Feline leukemia virus	3352	100%	99.57%	1072
Select seq EU629219.1	Feline leukemia virus strain 1286A-MG nonfunctional envelope protein gene, partial sequence	Feline leukemia virus	3357	100%	99.57%	1072
Select seq U03218.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79TTenv-13 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3346	100%	99.46%	1236
Select seq M18247.1	Feline leukemia virus, subgroup A (FeLV-FAIDS), complete nucleotide sequence	Feline leukemia virus	3346	100%	99.46%	8440
Select seq U03163.1	Feline leukemia virus clone FeLV-36TTenv-20 env	Feline leukemia virus	3346	100%	99.46%	1236

	gene, partial cds					
Select seq U03162.1	Feline leukemia virus clone FeLV-36TTenv-16 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3335	100%	99.36%	1236
Select seq U03195.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79BMenv-16 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3335	100%	99.36%	1236
Select seq U03194.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79BMenv-14 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3335	100%	99.36%	1236
Select seq U03192.1	Feline leukemia virus clone FeLV-77JEenv-5 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3335	100%	99.36%	1236

c. **Árbol Filogénico de la Muestra 1**

**Figura 16. Árbol Filogénico Muestra 1**



**Conclusión: Análisis Filogenético del FeLV**

El análisis filogenético del virus de la leucemia felina (FeLV), basado en la secuencia evaluada, revela una estrecha relación genética con cepas previamente reportadas en regiones geográficas específicas, lo que sugiere un posible origen común o una ruta reciente de diseminación viral. La ubicación de la cepa analizada dentro de un clado bien definido evidencia su pertenencia al subtipo FeLV-A, el cual se caracteriza por su alta transmisibilidad y menor patogenicidad inicial, pero que puede dar origen a subtipos más agresivos mediante recombinación genética, como FeLV-B y FeLV-C. La baja distancia filogenética con cepas de referencia indica una evolución conservada, mientras que la presencia de ramificaciones específicas sugiere la existencia de variantes emergentes que podrían representar riesgos clínicos relevantes en poblaciones felinas locales. Este estudio destaca la importancia de la vigilancia molecular y

el análisis filogenético continuo como herramientas clave para la comprensión de la dinámica evolutiva y epidemiológica del FeLV (53) (54) (55).

**d. Secuencia de la Muestra 1**

GCCATAATTCGATTAAGACACAAAATCAGAGGTCCAATTGA  
GCACCGCCATGGAAATGCATGGGGTGAGTCCAGTGTTACAGG  
CCCAATAGGTGCCATTGGGGGCGGCTAGATAGTGCGCCCTGT  
ATGTCCTGTTGCGTCTTATTGCACAAAGCCTGGTGGGTCTTA  
GGAACAGTCCCTATGCATAGTCCTTGCCCTGATACTTCAGATA  
TGGTCAGCTTGTGTTGCGGACTAGATAGGCAGGATGGGGGAG  
GGTTTGGTTGGTTGCTGTAGTTACCTAAGATTGCAATCCCTTCG  
TAATAGGGTGGTTCGAGAAACCAGGCAGAGCCAACAGTCTTTA  
GTTTTGTTGGGGTCGGTGGCATTAAAGGCTAGGTATGTCCCTT  
GTACTAAATTTATTAACCTATCTCCGGTCCCAATCCGTTTGGG  
ACCCACGGTGGTGGGGGCAACAGACCTTGGGGCGCTTTCATTC  
GTTTGGGGCCTCTGGGTCCCACTTTGGACCCTGTTTGAGATT  
GTCGGGATGGGGGTTTTTGATCAGGTAAGACTAGGTTTGGTCC  
CATTGCCTGAGGCGGCGTAATGGTTGACACCTGCCGGGACAC  
CGTGAATAAGGCAATAGGGTCATATCCTGTACGGTATAGTCGC  
AATCCCCACATCTTAGGTCCGTCCCAAGAGGCTTGTCTCCCCT  
TCTGGGTGAACTGCAAATCAGGGGGTTGCATTTTCCCTCACA  
GTTATTGTCTGACTACTCCCTCTTTTTACTGTGATATAGTCCC  
ATGAGGAGGAGGGCTTCCACCAAGCTTCTCCGGTGGTTTCACA  
TCCCCATGCGGCACAAAACCCATCTTGTGCCCTCCACAATGT  
GTTCCCTTTGGCCCCAGCGAGGGGGCATGTCCGGGGCAGACG  
TAAAAGGGGTATGTCTGTTGCTGTTTTTTTCTAGTAAACTACA  
GATAGAAAAACAGCAACAGACATACCCCTTTTACGTCTGCC  
CCGGACATGCCCCCTCGCTGGGGCCAAAGGGAACACATTGTG  
GAGGGGCACAAGATGGGTTTTGTGCCGCATGGGGATGTGAAA  
CCACCGGAGAAGCTTGGTGGAAGCCCTCCTCCTCATGGGACTA  
TATCACAGTAAAAAGAGGGAGTAGTCAGGACAATAACTGTGA  
GGGAAAATGCAACCCCCTGATTTTGCAGTTCACCCAGAAGGG  
GAGACAAGCCTCTTGGGACGGACCTAAGATGTGGGGATTGCG  
ACTATACCGTACAGGATATGACCCTATTGCCTTATTCACGGTG  
TCCCGGCAGGTGTCAACCATTACGCCGCCTCAGGCAATGGGA  
CCAAACCTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCCATCCCAGCAAT  
CTCAAACAGGGTCCAAAGTGGCGACCCAGAGGCCCCCAAACGA  
ATGAAAGCGCCCCAAGGTCTGTTGCCCCACCACCGTGGGTCC  
CAAACGGATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAATTTAGTACA  
AGGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAAAC  
TAAAGACTGTTGGCTCTGCCTGGTTTCTCGACCACCTATTAC  
GAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACACTACAGCAACCAACAAAAC  
CCTCCCCCATCCTGCCTATCTAGTCCGCAACACAAGCTGACCA  
TATCTGAAGTATCAGGGCAAGGACTATGCATAGGGACTGTTCC  
TAAGACCCACCANGCTTTGTGCAATAAGACGCAACAGGGACA  
TACAGGGGCGCACTATCTAGCCGCCCCCAATGGCACCTATTGG

GCCTGTAACACTGGACTCACCCCATGCATTTCCATGGCGGTGC  
TCAATTGGACCTCTG

**e. Identificación de la Muestra 2**

**Query ID**

lcl|Query\_6243631

**Descripción**

G2\_Feline Leukemia Virus G2 FFF-R TRIM QUALITY: 20

**Tipo de Molecula**

ADN

**Query Length**

1752

**f. Similitud de las Muestras con las 10 primeras secuencias registradas en el Genbank**

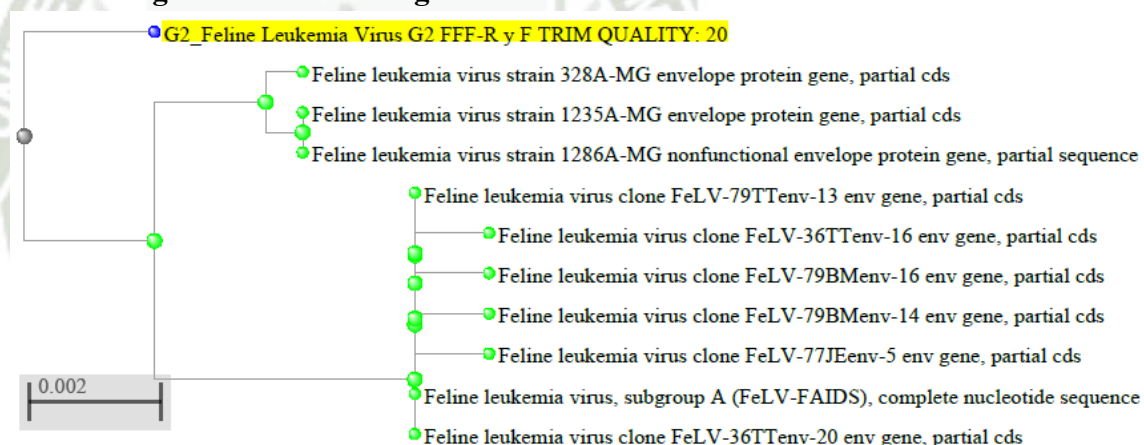
**Tabla 7. Similitud de Muestra 2**

<b>G2 Feline Leukemia Virus G2 FFF-R y F TRIm QUALITY: 20</b>						
<b>Select for downloading or viewing reports</b>	<b>Description</b>	<b>Scientific Name</b>	<b>Total Score</b>	<b>Query Cover</b>	<b>Per. Ident</b>	<b>Acc. Len</b>
Select seq EU629217.1	Feline leukemia virus strain 328A-MG envelope protein gene, partial cds	Feline leukemia virus	3161	100%	99.33%	1072
Select seq EU629218.1	Feline leukemia virus strain 1235A-MG envelope protein gene, partial cds	Feline leukemia virus	3156	100%	99.22%	1072
Select seq EU629219.1	Feline leukemia virus strain 1286A-MG nonfunctional envelope protein gene, partial sequence	Feline leukemia virus	3154	100%	99.22%	1072
Select seq U03218.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79TTenv-13 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3150	100%	99.10%	1236
Select seq M18247.1	Feline leukemia virus, subgroup A (FeLV-FAIDS), complete nucleotide sequence	Feline leukemia virus	3150	100%	99.10%	8440
Select seq U03163.1	Feline leukemia virus clone FeLV-36TTenv-20 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3150	100%	99.10%	1236

Select seq U03162.1	Feline leukemia virus clone FeLV-36TTenv-16 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3139	100%	98.99%	1236
Select seq U03195.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79BMenv-16 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3139	100%	98.99%	1236
Select seq U03194.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79BMenv-14 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3139	100%	98.99%	1236
Select seq U03192.1	Feline leukemia virus clone FeLV-77JEenv-5 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	3139	100%	98.99%	1236

g. **Árbol Filogénico de la Muestra 2**

**Figura 17. Árbol Filogénico Muestra 2**



**Conclusión: Análisis Filogenético del FeLV**

El análisis filogenético del virus de la leucemia felina (FeLV), basado en la secuencia evaluada, revela una estrecha relación genética con cepas previamente reportadas en regiones geográficas específicas, lo que sugiere un posible origen común o una ruta reciente de diseminación viral. La ubicación de la cepa analizada dentro de un clado bien definido evidencia su pertenencia al subtipo FeLV-A, el cual se caracteriza por su alta transmisibilidad y menor patogenicidad inicial, pero que puede dar origen a subtipos más agresivos mediante recombinación genética, como FeLV-B y FeLV-C. La baja distancia filogenética con cepas de referencia indica una evolución conservada, mientras que la presencia de ramificaciones específicas sugiere la existencia de variantes emergentes que podrían representar riesgos clínicos relevantes en poblaciones felinas locales. Este estudio destaca la importancia de la vigilancia molecular y el análisis filogenético continuo como herramientas clave para la

comprensión de la dinámica evolutiva y epidemiológica del FeLV (53) (54) (55).

**h. Secuencia de la Muestra 2**

GTACACATATTCGGGTTGATGGTAAGTNCACCTCTGGGCCATAA  
TTCGATTAAGACACAAAAATCAGAGGTCCAATTGAGCACCCGC  
CATGGAAATGCATGGGGTGAGTCCAGTGTTACAGGCCCAATA  
GGTGCCATTGGGGGCGGCTAGATAGTGCGCCCTGTATGTCCT  
TGTTGCGTCTTATTGCACAAAGCCTGGTGGGTCTTAGGAACAG  
TCCCTATGCACAGTCCTTGCCCTGATACTTCAGATATGGTCAG  
CTTGTGTTGCGGACTAGATAGGCAGGATGGGGGAGGGTTTGT  
TGGTTGCTGTAGTTACCTAAGATTGCAATCCCTTCGTAATAGG  
GTGGTTCGAGAAACCAGGCAGAGCCAACAGTCTTTAGTTTTGTT  
GGGGTCGGTGGCATTAAAGGCTAGGTATGTCCTTGTACTAAA  
TTTATTAACCTATCTCCGGTCCCAATCCGTTTGGGACCCACGG  
TGGTGGGGGCAACAGACCTTGGGGCGCTTTCATTTCGTTTGGGG  
CCTCTGGGTCGCCACTTTGGACCCTGTTTGAGATTGTCGGGAT  
GGGGGTTTTTGATCAGGTAAGACTAGGTTTGGTCCCATTGCCT  
GAGGCGGCGTAATGGTTGACACCTGCCGGGACACCGTGAATA  
AGGCGATAGGGTCATATCCTGTACGGTATAGTCGTAATCCCCA  
CATCTTAGGTCCGTCCCAAGAGGCTTGTCTCCCCTTCTGGGTG  
AACTGCAAAATCAGGGGGTTGCATTTTCCCTCACAGTTATTGT  
CCTGACTACTCCCTCTTTTTACTGTGATATAGTCCCATGAGGA  
GGAGGGCTTCCACAAGCTTCTCCGGTTGTTTCACATCCCCATG  
CGGCAAACCTGCAGATAGAAAAACAGCAACAGACATAACCCT  
TTTACGTCTGCCCCGGACATGCCCCCTCGCTGGGGCCAAAGGG  
AACACATTGTGGAGGGGCACAAGATGGGTTTTGTGCCGCATG  
GGGATGTGAAACAACCGGAGAAGCTTGGTGGAAAGCCCTCCTC  
CTCATGGGACTATATCACAGTAAAAAGAGGGAGTAGTCAGGA  
CAATAACTGTGAGGGAAAATGCAACCCCTGATTTTGCAGTTC  
ACCCAGAAGGGGAGACAAGCCTCTTGGGACGGACCTAAGATG  
TGGGGATTACGACTATAACCGTACAGGATATGACCCTATCGCCT  
TATTCACGGTGTCCCGGCAGGTGTCAACCATTACGCCGCCTCA  
GGCAATGGGACCAAACCTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCC  
ATCCCGACAATCTCAAACAGGGTCCAAAGTGGCGACCCAGAG  
GCCCCAAACGAATGAAAGCGCCCCAAGGTCTGTTGCCCCAC  
CACCGTGGGTCCCAAACGGATTGGGACCGGAGATAGGTTAAT  
AAATTTAGTACAAGGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGA  
CCCCAACAAAATAAAGACTGTTGGCTCTGCCTGGTTTCTCGA  
CCACCCTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACACTACAGCA  
ACCAAACAACCCCTCCCCATCCTGCCTATCTAGTCCGCAACA  
CAAGCTGACCATATCTGAAGTATCAGGGCAAGGACTGTGCAT  
AGGGACTGTTCCCTAAGACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGA  
CGCAACAAGGACATACAGGGGCGCACTATCTAGCCGCCCCCA  
ATGGCACCTATTGGGCCTGTAACACTGGACTCACCCCATGCAT  
TTCCAT

**i. Identificación de la Muestra 3**

**Query ID**

lcl|Query\_7162841

**Descripción**

G3\_Feline Leukemia Virus G3 FFF2-R y F TRIM QUALITY: 20

**Tipo de Molécula**

ADN

**Query Length**

1701

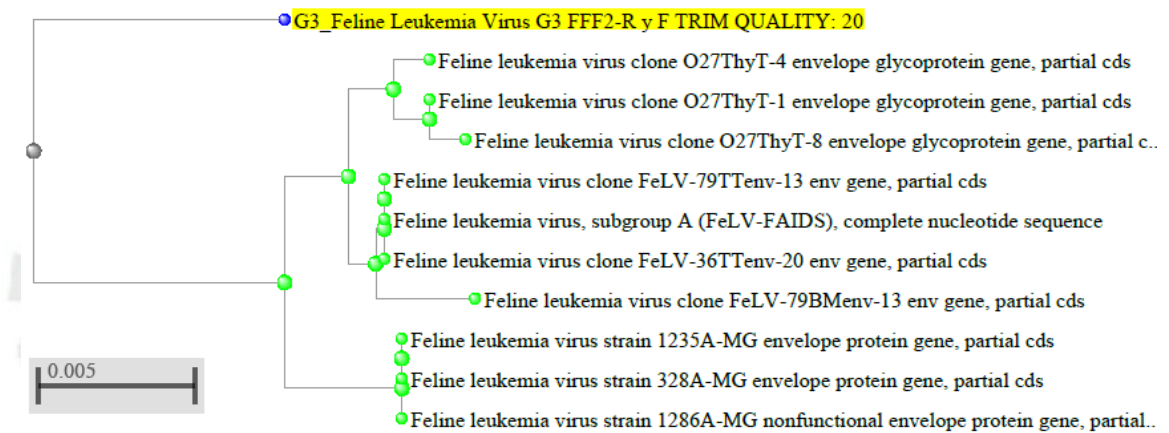
**j. Similitud de las Muestras con las 10 primeras secuencias registradas en el Genbank**

**Tabla 8. Similitud de Muestra 3**

<b>G3_Feline Leukemia Virus G3 FFF2-R y F TRIM QUALITY: 20</b>						
<b>Select for downloading or viewing reports</b>	<b>Description</b>	<b>Scientific Name</b>	<b>Total Score</b>	<b>Query Cover</b>	<b>Per. Ident</b>	<b>Acc. Len</b>
Select seq AY706358.1	Feline leukemia virus clone O27ThyT-4 envelope glycoprotein gene, partial cds	Feline leukemia virus	2960	100%	98.05%	1314
Select seq AY706357.1	Feline leukemia virus clone O27ThyT-1 envelope glycoprotein gene, partial cds	Feline leukemia virus	2960	100%	98.05%	1314
Select seq EU629218.1	Feline leukemia virus strain 1235A-MG envelope protein gene, partial cds	Feline leukemia virus	2960	100%	98.05%	1072
Select seq EU629217.1	Feline leukemia virus strain 328A-MG envelope protein gene, partial cds	Feline leukemia virus	2960	100%	98.05%	1072
Select seq EU629219.1	Feline leukemia virus strain 1286A-MG nonfunctional envelope protein gene, partial sequence	Feline leukemia virus	2955	100%	98.05%	1072
Select seq AY706359.1	Feline leukemia virus clone O27ThyT-8 envelope glycoprotein gene, partial cds	Feline leukemia virus	2949	100%	97.93%	1314
Select seq U03218.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79TTenv-13 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	2955	100%	97.93%	1236
Select seq M18247.1	Feline leukemia virus, subgroup A (FeLV-FAIDS), complete nucleotide sequence	Feline leukemia virus	2955	100%	97.93%	8440
Select seq U03163.1	Feline leukemia virus clone FeLV-36TTenv-20 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	2955	100%	97.93%	1236
Select seq U03193.1	Feline leukemia virus clone FeLV-79BMenv-13 env gene, partial cds	Feline leukemia virus	2943	100%	97.82%	1236

k. **Árbol Filogénico de la Muestra 3**

**Figura 18. Árbol Filogénico Muestra 3**



**Conclusión: Análisis Filogenético del FeLV (Árbol Radial)**

El presente análisis filogenético del virus de la leucemia felina (FeLV), representado mediante un árbol de tipo radial, revela que la cepa evaluada forma parte de un clado genéticamente divergente respecto a los clones prototípicos tradicionales del virus (FeLV-A, B y C). La localización periférica de esta cepa en el árbol, así como su agrupamiento con variantes poco comunes o geográficamente específicas, sugiere la existencia de un linaje filogenético distinto. Este hallazgo refuerza la hipótesis de una posible recombinación o adaptación evolutiva frente a presiones inmunológicas del hospedador o influencia ambiental. La presencia de mutaciones puntuales y su distancia genética con respecto al grupo ancestral evidencia la emergencia de variantes con potencial impacto clínico y epidemiológico. Por ello, se recomienda el fortalecimiento de la vigilancia molecular, la actualización de pruebas diagnósticas y la evaluación periódica de la efectividad de las vacunas disponibles frente a la variabilidad del FeLV (20) (56) (57).

**l. Secuencia**

```
AATGTGTGTACACATATTCGGGTTGATGGTAAGTNCACCTCTGG
GCCATAATTCGATTAAGACACAAAATCAGAGGTCCAATTGA
GCACCGCCATGGAAATGCATGGGGTGAGTCCAGTGTTACAGG
CCCAATAGGTGCCATTGGGGGCGGCTAGATAGCGCGCCCCTG
TATGTCCCTGTTGCGTCTTATTGCACAAAGCCTGGTGGGTCTT
AGGAACAGTCCCTATGCACAGTCCTTGCCCTGATACTTCAGAT
ATGGTCAGCTTGTGTTGCGGACTAAATAGGCAGGATAGGGGA
GGGTCTGTGTGGTTGCTGTAGTTACCTAAGATTGCGATCCCTT
CGTAATAGGGTGGTCGAGCAACCAGGCAGAGCCAACAGTCTT
TAGTTTTGTTGGGGTCGGTGGCATTTAAGGCTAGGTATGTCCC
TTGTAATAAATTTATTAACCTATCTCCGGTCCCAATCCGTTTGG
GACCCACGGTGGTGGGGGCAACAGACCTTGGGGCGCTTTTAT
CCGTTTGGGGCCTCTGGGTGCGCCACTTTGGACCCTGTTTGAGA
```

TTGTCGGGATGGGGGTTTTTGGATCAGGTAAGACTAGGTTTGGT  
 CCCATTGCCTGAGGCGGCGTAATGGTTGACACCTGCCGGGAC  
 ACCGTGAATAAGGCGATAGGGTCATATCCTGTACGGTATAGTC  
 GCAATCCCCATATCTTAGGTCCGTCCCAAGAGGCTTGTCTCCC  
 CTTCTGGGTGAACTGCAAATCAGGGGGTTGCATTTTCCTTCA  
 CAGTTATTGTCCTGACTACTCCCTCTTTTTACTGTGATATAATC  
 CCATGAGGAGGAGGGCTTCAACAGCAACAGACATACCCCTTT  
 TACGTCTGCCCCGGACATGCCCCCTCGCTGGGGCCAAAGGGA  
 ACACATTGTGGAGGGGCACAAGATGGGTTTTGTGCCGCATGG  
 GGATGTGAAACAACCGGAGAAGCTTGGTGGAAGCCCTCCTCC  
 TCATGGGATTATATCACAGTAAAAGAGGGAGTAGTCAGGAC  
 AATAACTGTGAAGGAAAATGCAACCCCTGATTTTGCAGTTCA  
 CCCAGAAGGGGAGACA  
 AGCCTCTTGGGACGGACCTAAGATATGGGGATTGCGACTATA  
 CCGTACAGGATATGACCCTATCGCCTTATTCACGGTGTCCCGG  
 CAGGTGTCAACCATTACGCCGCCTCAGGCAATGGGACCAAAC  
 CTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCATCCCGACAATCTCAA  
 CAGGGTCCAAAGTGGCGACCCAGAGGCCCCAAACGGATAAAA  
 GCGCCCCAAGGTCTGTTGCCCCACCACCGTGGGTCCCAAACG  
 GATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAATTTAGTACAAGGGAC  
 ATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAAACCTAAAGA  
 CTGTTGGCTCTGCCTGGTTGCTCGACCACCCTATTACGAAGGG  
 ATCGCAATCTTAGGTAACACTACAGCAACCACACAGACCCTCCCC  
 TATCCTGCCTATTTAGTCCGCAACACAAGCTGACCCTATCTGA  
 AGTATCANGGCAAGGACTGTGCATAGGGACTGTTCCCTAAGAC  
 CCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACGCAACAGGGACATACAGG  
 GGCGCGCTATCTAGCCGCCCCCAATGGCACCTATTGGGCCTGT  
 AACACTGGACTCACCCCATGCATTT

**m. Identificación de la Muestra 4**

**Query ID**

lcl|Query\_5151983

**Descripción**

G4\_Feline leukemia Virus G4 FFF4-R y F TRIM QUALITY: 20

**Tipo de Molécula**

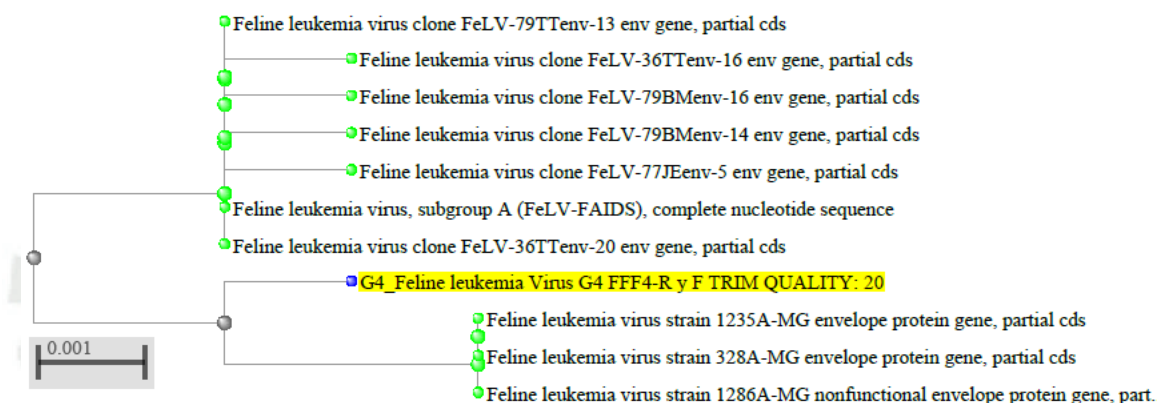
ADN

**Query Length**

1732

n. **Árbol Filogénico de la Muestra 4**

**Figura 19. Árbol Filogénico Muestra 4**



**Análisis Filogenético del FeLV (Cepa G4 FFF4-R y F)**

El análisis filogenético de la cepa G4 FFF4-R y F del virus de la leucemia felina (FeLV), en comparación con las 10 secuencias más similares, revela un agrupamiento genético diferenciado del clado tradicional de FeLV-A. La cepa se ubica junto a las variantes 1235A-MG, 328A-MG y 1286A-MG, formando un clado con alta similitud genética, lo que sugiere una evolución paralela o la existencia de un nuevo linaje emergente. Las pequeñas distancias genéticas observadas indican una conservación relativa del genoma viral, aunque con mutaciones puntuales que justifican su separación filogenética. La divergencia con respecto a las cepas prototípicas resalta la necesidad de reforzar la vigilancia genómica, revisar las estrategias diagnósticas actuales y considerar estas variantes en el diseño de futuras vacunas. Estos hallazgos aportan evidencia clave para entender la dinámica evolutiva y la diversidad del FeLV en poblaciones felinas (20) (54) (53).

**o. Secuencia**

TGTGTGTACACATATTCGGGTTGATGGTAAGTCACTCTCGGGC  
 CATAATTCGATTAAGACACAAAATCAGAGGTCCAATTGAGC  
 ACCGCCATGGAAATGCATGGGGTGAGTCCAGTGTTACAGGCC  
 CAATAGGTGCCATTGGGGGCGGCTAGATAGTGCGCCCCTGTAT  
 GTCCCTGTTGCGTCTTATTGCACAAAGCCTGGTGGGTCTTAGG  
 AACAGTCCCTATGCACAGTCCTTGCCCTGATACTTCAGATATG  
 GTCAGCTTGTGTTGCGGACTAGATAGGCAGGATGGGGGAGGG  
 TTTGTTTGGTTGCTGTAGTTACCTAAGATTGCAATCCCTTCGTA  
 ATAGGGTGGTCGAGAAACCAGGCAGAGCCAACAGTCTTTAGT  
 TTTGTTGGGGTTCGGTGGCATTTAAGGCTAGGTATGTCCCTTGC  
 ACTAAATTTATTAACCTATCTCCGGTCCCAATCCGTTTGGGAC  
 CCACGGTGGTGGGGCAACAGACCTTGGGGCGCTTTCATTCGT  
 TTGGGGCCTCTGGGTCCCACTTTGGACCCTGTTTGAGATTGT  
 CGGGATGGGGGTTTTTGTGATCAGGTAAGACTAGGTTTGGTCCCA  
 TTGCCTGAGGCGGCGTAATGGTTGACACCTGCCGGGACACCGT

GAATAAGGCGATAGGGTCATATCCTGTACGGTATAGTCGCAA  
TCCCCACATCTTANGTCCGTCCCAAGAGGCTTGTCTCCCCTTCT  
GGGTGAACTGCAAATCAGGGGGTTGCATTTTCCCTCACAGTT  
ATTGTCCTGACTACTCCCTCTTTTTACTGTGATATAGTCCCATG  
AGGAGGAGGGCTTCCACCAGCTTCTCGGGTGGTTCACATCCCC  
ATGCGGCCAGCAACAGACATACCCCTTTTACGTCTGCCCCGGA  
CATGCCCCCTCGCTGGGGCCAAAGGGAACACATTGTGGAGGG  
GCACAAGATGGGTTTTGTGCCGCATGGGGATGTGAAACCACC  
GGAGAAGCTTGGTGGGAAGCCCTCCTCCTCATGGGACTATATCA  
CAGTAAAAAGAGGGGAGTAGTCAGGACAATAACTGTGAGGGA  
AAATGCAACCCCCTGATTTTGCAGTTCACCCAGAAGGGGAGA  
CAAGCCTCTTGGGACGGACCTAAGATGTGGGGATTGCGACTA  
TACCGTACAGGATATGACCCTATCGCCTTATTCACGGTGTCCC  
GGCAGGTGTCAACCATTACGCCGCCTCAGGCAATGGGACCAA  
ACCTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCATCCCGACAATCTCA  
AACAGGGTCCAAAGTGGCGACCCAGAGGCCCAAACGAATGA  
AAGCGCCCCAAGGTCTGTTGCCCCACCACCGTGGGTCCCAA  
CGGATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAATTTAGTGCAAGGG  
ACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAAACCTAAA  
GACTGTTGGCTCTGCCTGGTTTCTCGACCACCTATTACGAAG  
GGATTGCAATCTTAGGTAACACAGCAACCAAACAACCCCTC  
CCCCATCCTGCCTATCTAGTCCGCAACACAAGCTGACCATATC  
TGAAGTATCAGGGCAAGGACTGTGCATAGGGACTGTTCTTAA  
GACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACGCAACAGGGACATAC  
AGGGGCGCACTATCTAGCCGCCCCCAATGGCACCTATTGGGCC  
CTGTACACTGGACTCACCCCATGCATT

### Resumen Comparativo de las Cepas FeLV G1 a G4

El presente resumen compara filogenéticamente las cuatro cepas analizadas del virus de la leucemia felina (FeLV), etiquetadas como G1, G2, G3 y G4, con base en sus relaciones genéticas con cepas prototípicas y variantes regionales. A continuación, se presenta un cuadro resumen con los hallazgos más relevantes:

**Tabla 9. Comparativo de las Cepas FeLV G1-G4**

Cepa	Clado principal	Cepa(s) más cercanas	Distancia genética	Conclusión filogenética
<b>G1</b>	Cepa MG divergente	Cepas MG (1235A, 328A, 1286A)	Moderada	Variante divergente de clado tradicional, posible linaje emergente
<b>G2</b>	Clado independiente	Cepas MG (1235A, 328A, 1286A)	Moderada	Separación marcada del grupo A; variante potencialmente nueva
<b>G3</b>	Grupo O27ThyT	O27ThyT-1, -4 y -8	Baja	Alta similitud dentro del clado; posible subgrupo geográfico definido
<b>G4</b>	Cercano a MG	1235A-MG, 328A-MG, 1286A-MG	Baja	Alto grado de conservación genética; separación de cepas clásicas

Este análisis comparativo evidencia que las cepas G1 y G2 presentan mayor divergencia con respecto a las cepas prototípicas de FeLV y podrían representar linajes emergentes. Las cepas G3 y G4, aunque filogenéticamente conservadas, también se ubican fuera del grupo tradicional, lo cual refuerza la necesidad de vigilancia genómica continua en poblaciones felinas.

#### 4.4. Discusión

Los hallazgos de este análisis corroboran la efectividad de la PCR y la electroforesis como metodologías diagnósticas para identificar molecularmente el virus de la Leucemia Felina (FeLV) en gatos domésticos en Arequipa. La exitosa amplificación de fragmentos que varían entre 1700 y 2500 pb, junto a una identidad genética superior al 98% en comparación con secuencias de referencia, pone de manifiesto la gran precisión de los métodos aplicados. Esto se alinea con lo que reportó Autran Martínez en su trabajo “Uso de la Técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de leucemia viral felina y el análisis filogenético de los productos amplificados. México, D, F. 2014”, quien

demonstró que la PCR centrada en la detección de provirus presenta una sensibilidad mejorada en relación a las técnicas serológicas tradicionales.

La calidad de las bandas obtenidas a través de gel de agarosa afirma la existencia del producto amplificado, lo que valida la efectividad de los primers empleados (En-LT, RB-53 y RB-59). Estos resultados son consistentes con los estudios de Chia-Fang Ho y colaboradores en “Desarrollo de un sistema de amplificación múltiple de mutación refractaria mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa para el diagnóstico diferencial de la vacuna del virus de la leucemia felina y las cepas salvajes”, quienes indicaron la utilidad de estos cebadores en la identificación del gen env durante la caracterización molecular del FeLV y en la diferenciación de sus subtipos. Asimismo, Banda Faruku y sus coautores en su trabajo denominado “Detección molecular, análisis filogenético e identificación de motivos de transcripción en el virus de la leucemia felina de gatos infectados de forma natural en Malasia” subrayan que los análisis en las regiones env posibilitan la detección de recombinaciones virales y linajes nuevos, un aspecto que cobra importancia en este estudio debido a la identificación de divergencias genéticas en dos de las secuencias analizadas.

El estudio filogenético reveló que las cepas G1 y G2 presentan una divergencia notable con respecto al clado tradicional FeLV-A, indicando la posible circulación de linajes virales emergentes en la comunidad felina de Arequipa. Este hallazgo tiene relevancia epidemiológica, ya que investigaciones como la de Leight Stimson en “Detección del Virus de la Leucemia Felina en la médula ósea mediante la reacción en cadena de la polimerasa” han señalado que las variaciones en el material genético pueden influir en la capacidad patogénica del virus, así como en la manifestación de la enfermedad siendo esta una infección progresivas o regresivas. Estas variaciones podrían estar asociadas con eventos de recombinación con retrovirus endógenos de felinos tales como el subtipo B o C, un fenómeno que Chia-Fang Ho y colaboradores han discutido en profundidad, señalando que este proceso es una vía común para la diversificación del virus; ya que como se indico las mutaciones directas del subtipo A nos generan nuevas variaciones.

Por otro lado, las cepas G3 y G4 demostraron una notable similitud genética con cepas clásicas del subtipo FeLV-A, sugiriendo una estabilidad evolutiva superior. Estos hallazgos respaldan lo que Autran Martínez mencionó en 2014 sobre la persistencia de linajes altamente conservados en áreas urbanas, especialmente en poblaciones felinas con condiciones de convivencia intensas o escasa intervención sanitaria, lo cual es una realidad en el presente debido a la falta de control epidemiológico de la enfermedad, así como la conducta impuesta por los humanos en las que los gatos viven en colonia y ya no forma individual.

Desde un enfoque clínico y epidemiológico, la presentación de secuencias conservadas a la par de las divergentes indica un posible escenario en el que variantes clásicas y emergentes conviven, lo que podría afectar el pronóstico de los pacientes ya que los tratamientos paliativos actuales se basan en las

subdivisiones conocidas ya que de cierta manera su sintomatología es específica basándonos en anemias y en el peor de los casos la presentación oncológica pero el tener una posible divergencia hace variar la presentación clínica de esta enfermedad con una variación en la sintomatología, la aparición de casos inmunosupresores y la efectividad de las campañas de vacunación ya que estas están basadas en la etiología ya conocida por lo que se podría insinuar que en algún punto su prevención estaría reducida. Banda Faruku y colegas resaltan que algunas variaciones en el gen env pueden alterar la afinidad por los receptores celulares, potenciando así mecanismos de inmunosupresión, anemia no regenerativa u otras patologías asociadas a la infección progresiva.

En conjunto, los hallazgos de este estudio nos permiten señalar que la identificación de la Etiología del FeLV mediante PCR y análisis filogenético constituye una herramienta fundamental para comprender la dinámica evolutiva del virus en poblaciones felinas en Arequipa; por lo que resulta relevante el uso de herramientas moleculares en el diagnóstico de FeLV. El hecho de que actualmente se puedan hallar secuencias altamente conservadas junto con posibles linajes divergentes refuerza la necesidad de considerar la variabilidad genética del FeLV siendo así necesario el realizar la actualización de protocolos diagnósticos, planes de vacunación y estrategias de control sanitario en la población felina. Estos resultados no solo aportan evidencia relevante para poder comprender la epidemiología local del virus actualmente, sino que también abren una línea de investigación necesaria en el país, la cual se orienta en el monitoreo constante de variantes virales, así como el fortalecimiento de programas de salud pública veterinaria que permitan reducir la carga clínica y el impacto del FeLV.

Los resultados observados fortalecen la relevancia del uso de herramientas moleculares en el diagnóstico de FeLV y constituyen una contribución a futuras investigaciones enfocadas en la evaluación de la diversidad genética viral y su efecto en la salud de los gatos en Arequipa.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

1. Se logró la extracción eficiente de ADN viral a partir de las muestras analizadas, permitiendo la obtención de secuencias genéticas de alta calidad (longitudes entre 1700 y 1848 pb), fundamentales para el posterior análisis por PCR y estudios filogenéticos.
2. La técnica de PCR fue eficaz en la amplificación de las regiones del gen env del FeLV, con una cobertura del 100% de las secuencias blanco y una identidad superior al 98% con cepas referenciales del NCBI, confirmando la especificidad y sensibilidad del protocolo utilizado.
3. El análisis mediante electroforesis permitió verificar productos de amplificación consistentes en tamaño con las secuencias esperadas (~1700 pb), y el peso molecular se correspondió con los fragmentos esperados para genes parciales del env de FeLV, validando la integridad y pureza del ADN amplificado.
4. El análisis filogenético de las secuencias permitió clasificar las cepas dentro de clados específicos, destacando la pertenencia de G1 y G2 a linajes divergentes posiblemente emergentes, mientras que G3 y G4 mostraron alta similitud con cepas tradicionales del subtipo FeLV-A. Esto evidencia una diversidad genética en circulación que subraya la importancia de mantener la vigilancia molecular en poblaciones felinas locales.

## CAPÍTULO VI

### RECOMENDACIONES

Fortalecer la vigilancia molecular continua del FeLV en poblaciones felinas locales, Dado que las cepas G1 y G2 muestran divergencia genética significativa respecto a las cepas clásicas (posibles linajes emergentes), se recomienda implementar programas de monitoreo molecular periódicos para detectar variantes con potencial impacto clínico y epidemiológico.

Actualizar las pruebas diagnósticas y protocolos de PCR en clínicas veterinarias, Considerando la existencia de variantes con mutaciones puntuales y diferencias filogenéticas, es clave adaptar los kits de diagnóstico y los primers utilizados en PCR para mantener la sensibilidad frente a cepas no convencionales.

Evaluar la eficacia de las vacunas comerciales frente a cepas divergentes Dado que las vacunas actuales están basadas en cepas prototípicas, es necesario realizar estudios de neutralización cruzada o ensayos de protección con las variantes G1 y G2 para garantizar su efectividad en el contexto epidemiológico actual.

Promover la investigación sobre la evolución viral y posibles recombinaciones genéticas, y los hallazgos sobre ramificaciones específicas y cercanía a cepas recombinantes sugieren la importancia de apoyar investigaciones sobre mecanismos de recombinación y presión selectiva en el FeLV, para prevenir el surgimiento de subtipos más patogénicos (como FeLV-B o FeLV-C).

## CAPÍTULO VII

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. dataZone. Charles Darwin Foundation. [Online]. [cited 2024 septiembre 02]. Available from: <https://datazone.darwinfoundation.org/en/checklist/?species=5211>.
2. Vella CM, Shelton LM. The history of cats. *Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice*. 2017; 6(47): p. 1049-1060.
3. Xuan J. The Origin and Evolution fo Cats. *Animal Molecular Breeding*. 2023; 13(2): p. 1-6.
4. Bradshaw JW. Sociality in cats: a comparative review. *Journal of Veterinary Behavior*. 2016; 11: p. 113-124.
5. Serpell JA. *Domestication and History of the Cat*; 2013.
6. Turner DC, Bateson P. *The domestic cat: The biology of its behaviour*: Cambridge Iniversity Press; 2014.
7. Ley JM. Chapter 4 - Normal Social Behavior. In Rodan I, Heath S, editors. *Feline Behavioral Health and Welfare*.: W.B. Saunders; 2016. p. 34 - 40.
8. Alho AM, Lima C, Colella V, Carvalho LMMd, Otranto D, Cardoso L. Awareness of zoonotic diseases and parasite control practices: a survey of dog and cat owners in Qatar. *Parasites Vectors*. 2018; 11: p. 133.
9. Benavides J, Valderrama W, Recuenco S, Uieda W, Suzán G, Avila-Flores R, et al. Benavides JA, Valderrama W, Recuenco S, Uieda W, Suzán G, Avila-Flores R, Velasco-Villa A, Almeida M, Andrade FAG, Molina-Flores B, Vigilato MAN, PoDefining New Pathways to Manage the Ongoing Emergence of Bat Rabies in Latin America. *Viruses*. 2020; 9(12): p. 1002.
10. Day MJ, Crawford C, Marcondes M, Squires RA. Recommendations on vaccination for Latin American smallanimal practitioners: a report of the WSAVA Vaccination Guidelines Group. *Journal of Small Animal Practice*. 2020; 6(61): p. 1-35.
11. Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim Pract*. 2016; 1(57): p. 1-45.
12. Salgado-Caxito M, Benavides JA, Atero N, Córdova-Bürhle F, Ramos R, Fernandez M, et al. Preventive healthcare among dogs and cats in Chile is positively associated with emotional owner-companion animal bond and socioeconomic factors. *Preventive Veterinary Medicine*. 2023; 213.
13. Collado Alcalá VM. Efecto in vitro de interferón de tipo I sobre la expresión de. In. Madrid; 2017.
14. Conde BU. Prevalencia y Caracterización Clínico-Lesional de los Principales

- Procesos Infecciosos de Etiología Vírica que Afectan a las Colonias de Gatos Callejeros en Madrid Capital: Merial; 2015.
15. Schlecht-Louf G, Mangeney M, El-Garch H, Lacombe V, Poulet H, Heidmann T. A targeted mutation within the feline leukemia virus (FeLV) envelope protein immunosuppressive domain to improve a canarypox virus-vectored FeLV vaccine. *J Virol.* 2014; 2(88): p. 992-1001.
  16. Song N, Jo H, Choi M, Kim JH, Seo HG. Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in silico data analysis. *Journal of General Virology.* 2013 marzo 17;(94): p. 1587-1596.
  17. Zhuo X, Feschotte C. Cross-Species Transmission and Differential Fate of an Endogenous Retrovirus in Three Mammal Lineages. *PLoS Pathog.* 2015; 11(11): p. e1005279.
  18. Almeida IO, Silva MAAd, Sena BVd, Paz JSd, Jaretta TdA, Faria PCG, et al. Retrospective study of retroviruses by immunoenzymatic test on cats in Grande Vitória (ES, Brazil) and associated neoplasms. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine.* 2021;(43): p. 104220.
  19. Dunham SP, Graham E. Retroviral infections of small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2008;(38): p. 879-901.
  20. Hosie MJ, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, et al. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med.Surg.* 2009;(11): p. 575-584.
  21. Dufait I, Liechtenstein T, Lanna A, Laranga R, Padella A, Bricogne C, et al. Lentiviral Vectors in Immunotherapy. *INTECH.* 2013.
  22. Willett BJ, Hosie MJ. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery.. *Vet. J.* 2013;(195): p. 16-23.
  23. Denis KAS. Feline Leukemia Virus Disease. *MSD Manual Veterinary Manual.* 2022;; p. 1-14.
  24. Hofmann-Lehmann R, Hartmann K. Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2020; 9(22): p. 831-846.
  25. Helfer-Hungerbuehler A, Widmer S, Kessler Y, Riond B, Boretti FS, Grest P, et al. Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. *Virus Res.* 2015;(197): p. 137-150.
  26. Sakaguchi S, Shojima T, Fukui D, Miyazawa T. A soluble envelope protein of endogenous retrovirus (FeLIX) present in serum of domestic cats mediates infection of a pathogenic variant of feline leukemia virus.. *J Gen Virol.* 2015; 3(96): p. 681-7.

27. Miyake A, Watanabe S, Hiratsuka T, Ito J, Ngo M, Makundi I, et al. Novel feline leukemia virus interference group based on the ENV gene. *Journal of Virology*. 2016; 9(90): p. 4832-4837.
28. Restrepo FC, Fernández L, Morales-Zapata LM, Ruiz-Sáenz J. Virus de la leucemia felina: un patógeno actual que requiere atención en Colombia. *Veterinaria y Zootecnia*. 2014; 7(2): p. 117-138.
29. Sykes JE, Hartmann K. Feline Leukemia Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*. 2014;: p. 224-238.
30. Hofmann-Lehmann R, Tandon R, Boretti F. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine*. 2006;(24): p. 1087–1094.
31. Kadar E, Sykes J, PH K. Evaluación de la prevalencia de infecciones en gatos después del trasplante renal: 169 casos (1987-2003). *J Am Vet Med Assoc*. 2005;(227): p. 948–953.
32. Major A, Cattori V, Boenzli E. Exposición de gatos a dosis bajas de FeLV: seroconversión como único parámetro de infección. *Vet Res*. 2010;(41): p. 17.
33. Little S, Bienzle D, Carioto L, Chisholm H, O'Brien E, Scherk M. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in Canada: recommendations for testing and management. *Can. Vet. J*. 2011;(52): p. 849-855.
34. Hartmann K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011; 143(190 - 201).
35. Westman ME, Malik R, Hall E, Sheehy PA, Norris JM. Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2015; 42: p. 43 - 52.
36. Wilkes R, Kania S, Tsai Y, Lee PYA, Chang HH, Ma LJ, et al. Rapid and sensitive detection of Feline immunodeficiency virus using an insulated isothermal PCR-based assay with a point-of-need PCR detection platform. *J Vet Diagn Invest*. 2015; 4(27): p. 510-515.
37. Putra LAG, Yonathan CJ, Niedhatrata NI, Firdaus MHR, Yoewono JR. A Review of the Development of Polymerase Chain Reaction Technique and Its Uses in Scientific Field. *Stannum : Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. 2020; 2(1): p. 17-30.
38. Carson S, Miller HB, D Scott Witherow. *Molecular Biology Techniques*. 3rd ed. Carson S, Miller HB, Witherow DS, editors.: Academic Press; 2012.
39. Carter M, Essner R, Goldstein N, Iyer M. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. 3rd ed. Carter M, Essner R, Goldstein N, Iyer M, editors.: Academic Press; 2022.

40. Overbergh L, Vig S, Coun F, C M. Molecular Diagnostics. 3rd ed. Patrinós GP, editor.: Academic Press; 2017.
41. Cattori V, Tandon R, Riond B. The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome. *Vet Microbiol.* 2009;(133): p. 292-296.
42. Palmero M, Carballés V. Enfermedades infecciosas Felinas; 2010.
43. Wittmeier P, Hummel S. Agarose Gel Electrophoresis to Assess PCR Product Yield: Comparison with Spectrophotometry, Fluorometry and qPCR. *BioTechniques.* 2022; 72(4): p. 155-158.
44. Jetani VD, Shah VR, Patel KT, Upadhyay DU. A Review on- Electrophoresis Technique. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications.* 2022; 7(6): p. 248-260.
45. Haines A, Tobe S, Kobus H, Linacre A. Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 2015; 6(36): p. 941-944.
46. Aguirre FR. Friveroll. [Online].; 2022. Available from: <https://friveroll.github.io/posts/dise%C3%B1o-de-primers-para-pcr/>.
47. Guo J, Starr D, Guo H. Classification and review of free PCR primer design software. *Bioinformatics.* 2020; 36: p. 5263-5268.
48. Ho CF, Chan KW, Yang WC, Chiang YC, Chung YT, Kuo J, et al. Development of a multiplex amplification refractory mutation system reverse transcription polymerase chain reaction assay for the differential diagnosis of Feline leukemia virus vaccine and wild strains. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2014; 26(4): p. 496-506.
49. Biezus G, Cristo TGd, Neves GBd, Casa MdS, Brizola PB, Sombrio MS, et al. Phylogenetic identification of feline leukemia virus A and B in cats with progressive infection developing into lymphoma and leukemia. *Virus Research.* 2023; 329: p. 199093.
50. Martínez MA. Uso de la Técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de Leucemia Felina y el análisis filogenético de los productos amplificados. Tesis Maestría. Arequipa: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2014.
51. Stimson EL. Detection of Feline Leukemia Virus in Bone Marrow Using Polymerase Chain Reaction. Tesis Maestría. Virginia: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University; 2000.
52. Bande F, Arshad SS, Hassan L, Zakaria Z. Molecular detection, phylogenetic analysis, and identification of transcription motifs in feline leukemia virus from naturally infected cats in Malaysia. *Vet Med Int.* 2014 Noviembre 17.

53. Harder TC, Osterhaus ADME. Molecular characterization of feline leukemia virus isolates from naturally infected cats. *Journal of General Virology*. 1997; 78(10): p. 2663-2670.
54. Tandon R, Cattori V, Willi B, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Quantitative real-time PCR assay for the measurement of feline leukemia virus RNA and proviral DNA loads. *Journal of Virological Methods*. 2008; 147(2): p. 167–176.
55. Poli A, Pistello M, Carrai P, Millanta F, Ceccherini-Nelli L, Abramo F. Poli, A., Pistello, M., Carrai, P., MilFeLV infection: a comparison of techniques for proviral DNA detection in tissues. *Journal of Veterinary Medicine Series B\**. 1994; 41(1-10): p. 648-655.
56. Jarrett O, Neil JC. The pathogenesis of feline leukaemia virus (FeLV). *Archives of Virology*. 1982; 72(3): p. 225–234.
57. Hofmann-Lehmann R, Fehr D, Grob M, Elgizoli M, Packer C, Martenson JS, et al. Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesvirus, coronavirus, and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in east Africa. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1996; 3(5): p. 554–562.
58. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. Zheng Zhang, Scott SchwaA greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000. 2000; 7(1-2): p. 203-14.
59. Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics*. ; 24: p. :1757-1764.

## ANEXOS

### MATERIALES Y EQUIPOS

#### Sangre recolectada en tubos de EDTA

**Figura 20. Sangre de Numbit**



**Figura 21. Sangre de Kike**



**Figura 22. Sangre de Ares**



**Figura 23. Sangre de Gatito**



**Figura 24 y 25. Se colocan en un Eppendorf 300  $\mu$ l de sangre, se repite por cada muestra.**



**Materiales y Equipos de Laboratorio para la Extracción de ADN de la Muestra**  
**Figura 26. Buffer RBC Lysis**



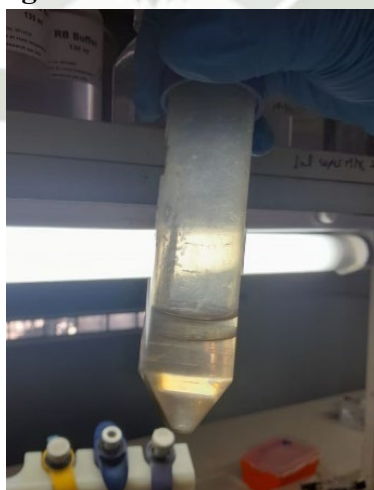
**Figura 27. Eppendorf con Pellet de muestra**



**Figura 28. Buffer Lysis JCBO, SDS 10 % y Proteinasa K**



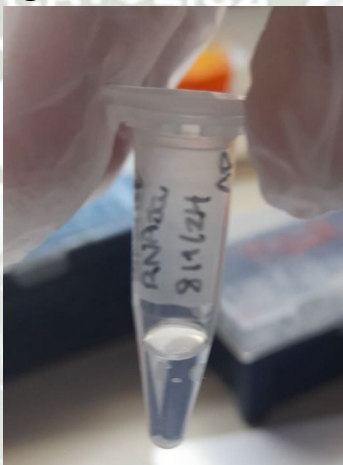
**Figura 29. Fenol Cloroformo**



**Figura 30. Eppendorf con fase fenólica, fase proteica y fase soluble de la muestra.**



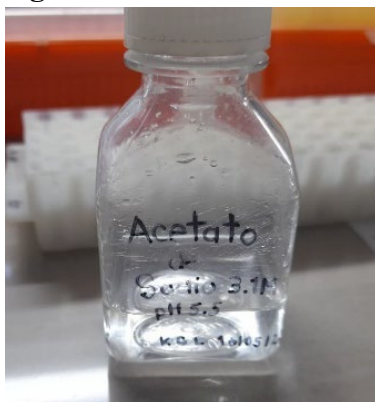
**Figura 31. Enzima RNAsa**



**Figura 32. Eppendorf con sobrenadante**



**Figura 33. Acetato de Sodio**



**Figura 34. Isopropanol**



**Figura 35. Baño de Hielo**



**Figura 36. Eppendorf con pellet y Etanol Absoluto**



**Figura 37. Agua Libre de Nucleasas**



**Figura 38. Centrífuga**



**Figura 39. Tempblock Module Heater**

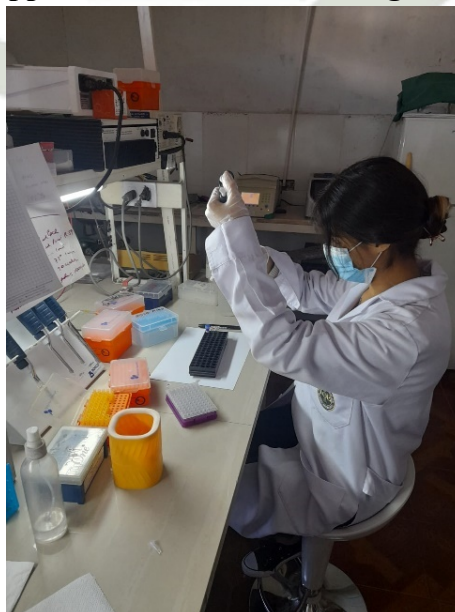


**Materiales y Equipos de Laboratorio para la Ampliación del ADN**

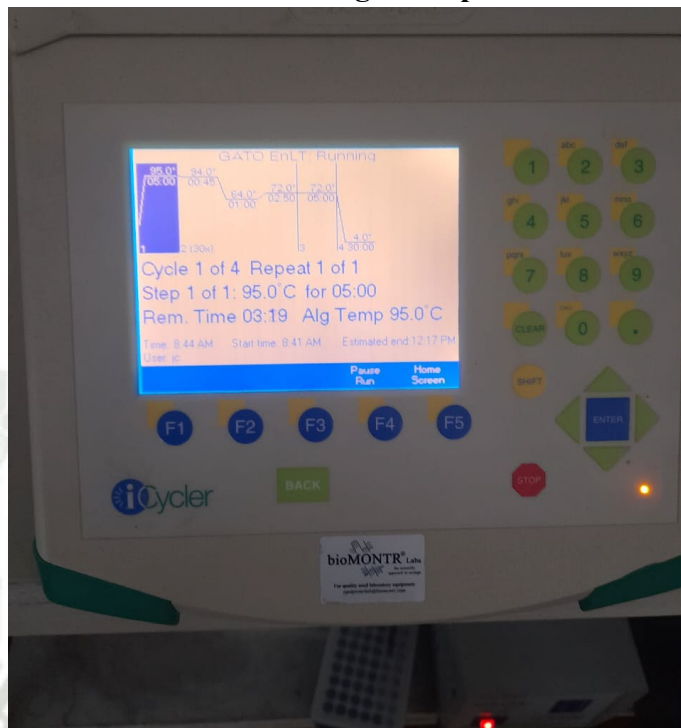
**Figura 40. Agua de PCR, Master Mix, Muestra de ADN extraído y Primer En-LT**



**Figura 41. En el Eppendorf “En-LT” se homogeniza con micropipeta.**



**Figura 42. Termociclador configurado para el Primer En-LT.**



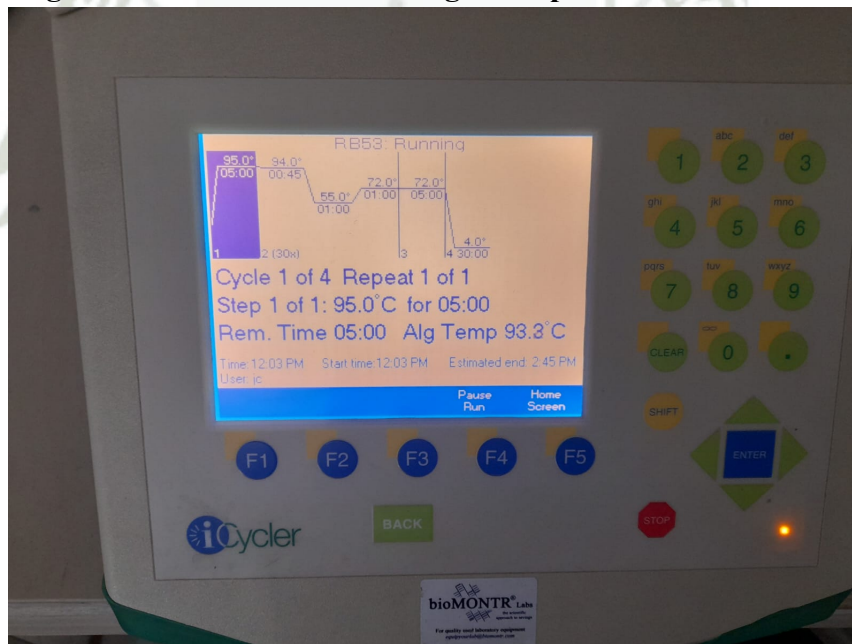
**Figura 43. Agua de PCR, Master Mix y Primers RB-53 y RB-59.**



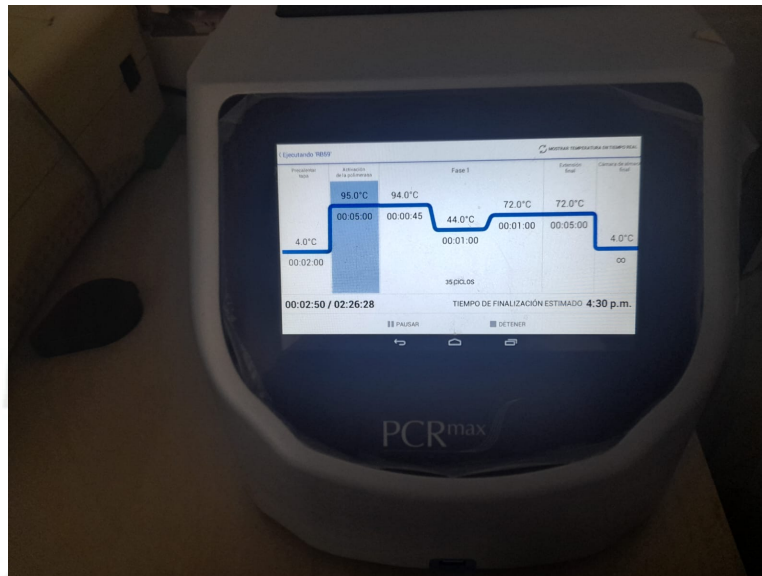
**Figura 44. En los Eppendorf “RB-53” y “RB-59” se homogeniza con micropipeta.**



**Figura 45. Termociclador configurado para el Primer RB-53.**

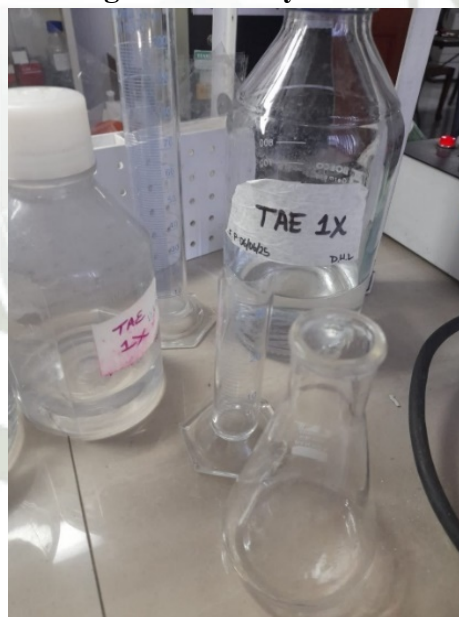


**Figura 46. Termociclador configurado para el Primer RB-59.**



**Materiales y Equipos de Laboratorio para Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5%**

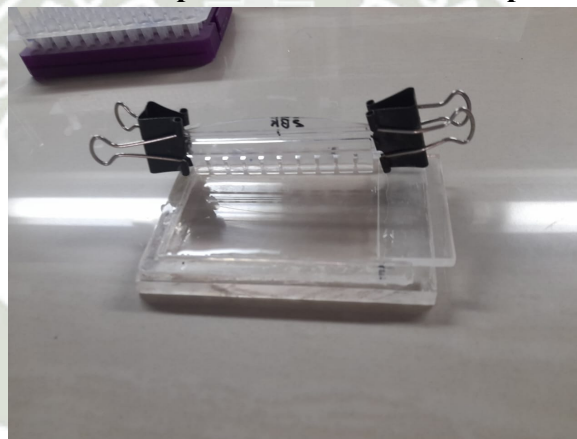
**Figura 47. Tae y vortex.**



**Figura 48 y 49. Disolución de agarosa en polvo se coloca en microondas y luego en molde.**



**Figura 50. Se realiza perforación en el molde para los pozos.**



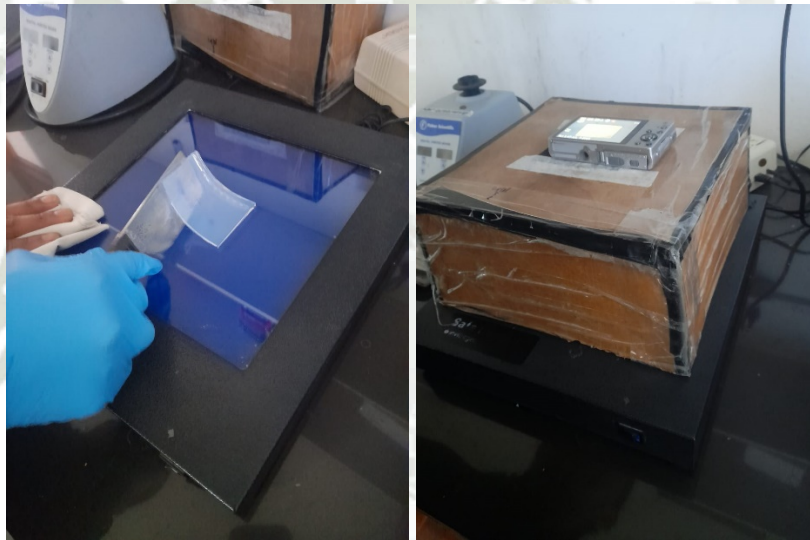
**Figura 51, 52 y 53. Cámara de Electroforesis con el gel al 1.5% cubierto de TAE en la que se llenan los pozos con los resultados de la PCR.**



**Figura 54. Se enciende y configura el equipo de Electroforesis a 80 voltios.**



**Figura 55 y 56. Se coloca el gel en Cámara de Iluminación y se realiza la toma de imágenes con cámara digital.**



## HISTORIA CLINICA 01

**Paciente:** Numbit

**Edad:** 3 años

**Sexo:** Hembra

**Antecedentes:**

Su primera consulta fue el 14 de julio del 2022, donde se tuvo un diagnóstico presuntivo de calcivirus, leucemia felina, sida felino y/o herpes virus, dando positivo en agosto de ese año, siguió un tratamiento.

El 21 de septiembre del 2024, volvió a la clínica presentando sialorrea, secreción sanguinolenta y gingivitis, en su hemograma se observa anemia al tener los hematíes debajo del rango (4.850.000 del rango 5.000.000 – 10.000.000 xmm<sup>3</sup>), hematocrito bajo (26.2 % del rango 28 - 45%) y trombocitopenia (125.000 del rango 300.000 – 800.000 xmm<sup>3</sup>). Se realiza un tratamiento paliativo durante septiembre, octubre y noviembre.

El 15 de noviembre del mismo año ingresa a quirófano por una OVH por piometra, se realizó una bioquímica en la que se observó creatinina en rango (1.4 referencia de 0.7 - 2.2 mg/dL). Al día siguiente vuelve a ingresar a quirófano para una limpieza quirúrgica por probable hernia postquirúrgica, la cual no presentaba, pero tenía bastantes coágulos en subcutáneo distal.

El 18 de diciembre se tomó la muestra de sangre en un tubo de EDTA y se envió a laboratorio para extracción de ADN.

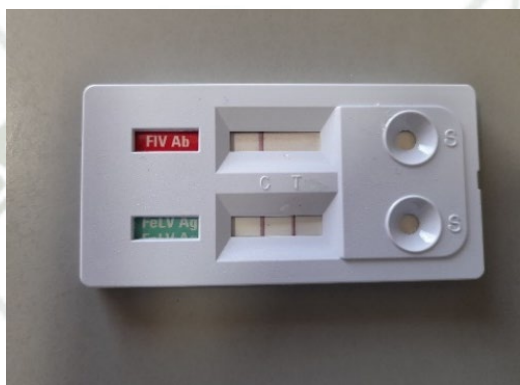
El 21 de diciembre se realizó una destartarización y se retiró 5 dientes y premolares.

El 26 de febrero del 2025 ingresa por consulta en la cual se observa que esta decaída, si tiene apetito, halitosis, se come su arena, tiene fiebre de 40 °C; en prueba de orina se observó ligera turbidez, presencia de cristales amorfos, células epiteliales. En bioquímico se obtuvo urea elevada (95.4 referencia de 18 – 41 mg/dL), creatinina (0.8 referencia de 0.7 – 2.2 mg/dL), TGP (32.3 referencia de 23 – 109 U/I) y TGO (40.9 referencia de 14 – 41 U/I) dentro del rango. En su hemograma se observó anemia al tener hematíes por debajo (2.000.000 del rango 5.000.000 – 10.000.000 xmm<sup>3</sup>) y hemoglobina baja (3.3 del rango 8 – 15 g/dL) hematocrito bajo (10.9 del rango 28 - 45%) y trombocitopenia (18.000 del rango 300.000 – 800.000 xmm<sup>3</sup>) en la serie blanca hay marcada leucocitosis (23.600 del rango 5.500 – 19.500 xmm<sup>3</sup>) monocitosis (1.888 del rango 0 – 850 xmm<sup>3</sup>) y linfocitosis (39 del rango 1.500 – 7.000 xmm<sup>3</sup>). Con estos resultados se recomendó transfusión sanguínea, se le consideró un pronóstico reservado.

El 15 de marzo se continuó con un tratamiento paliativo.

Numbit falleció en su hogar debido a la enfermedad.

**Figura 57 y 58. Paciente Numbit positivo a Leucemia Felina.**



## HISTORIA CLINICA 02

**Paciente:** Kike

**Edad:** 6 años

**Sexo:** Macho

**Antecedentes:**

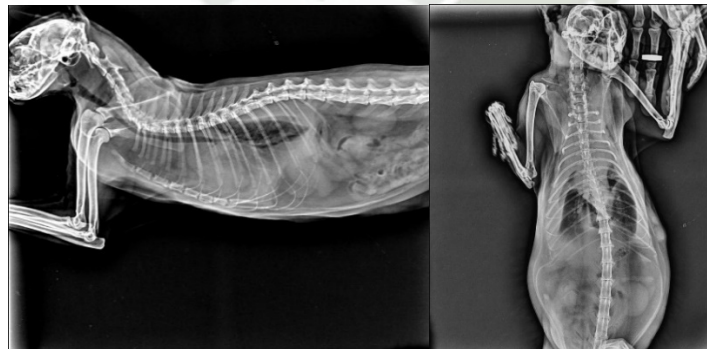
Su primer registro fue por una consulta general el 30 de enero del 2025, se realizó un hemograma en el que se observó una trombocitopenia (173.000 del rango 300.000 – 800.000 xmm<sup>3</sup>); en la serie blanca los leucocitos están bajos, pero dentro del rango (7.500 del rango 5.500 – 19.500 xmm<sup>3</sup>), linfopenia (975 del rango 1.500 – 7.000 xmm<sup>3</sup>). Se realizó la toma de placas Rx, en las que se observó líquido en tórax, el cual se extrajo para prueba de citología en la que se tuvo como la presencia elevada de linfocitos con anisocariosis siendo compatible con una neoplasia y se comprobó con otra placa de Rx si persistía el líquido. Se realizó prueba inmunocromatográfica de Leucemia en la cual dio positivo.

El 31 de enero se continuo su tratamiento y realizo otra toma de placas Rx, no había presencia de líquido.

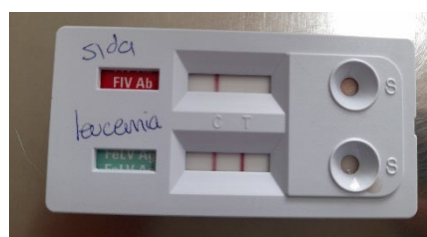
El 3 de febrero se continuó su tratamiento y se realizó una ecografía de control y en su hemograma se observó la trombocitopenia aún más baja (92.000 del rango 300.000 – 800.000 xmm<sup>3</sup>), los leucocitos aumentaron (9.800 del rango 5.500 – 19.500 xmm<sup>3</sup>), linfopenia persiste, pero valores aumentaron (1.372 del rango 1.500 – 7.000 xmm<sup>3</sup>).

A Kike se le realizó una eutanasia el 18 de febrero debido a que se tuvo una recaída por lo avanzada que estaba la enfermedad.

**Figura 59 y 60. Placas de Rx vista lateral, vista ventro-dorsal de Kike en la que se observa liquido libre en tórax.**



**Figura 61. Prueba de Kike positivo a Leucemia Felina.**



### HISTORIA CLINICA 03

**Paciente:** Ares

**Edad:** 5 años y 9 meses

**Sexo:** Macho

**Antecedentes:**

Su primer registro en la veterinaria fue el 12 de junio del 2021 en el que se le diagnosticó una osteomielitis.

El 27 de noviembre del mismo año volvió por consulta en la que presentaba heridas de bajo de la lengua, se le hizo descarte de calcivirus y se le tomó un hemograma. De acuerdo a esto se realizó un tratamiento sintomatológico.

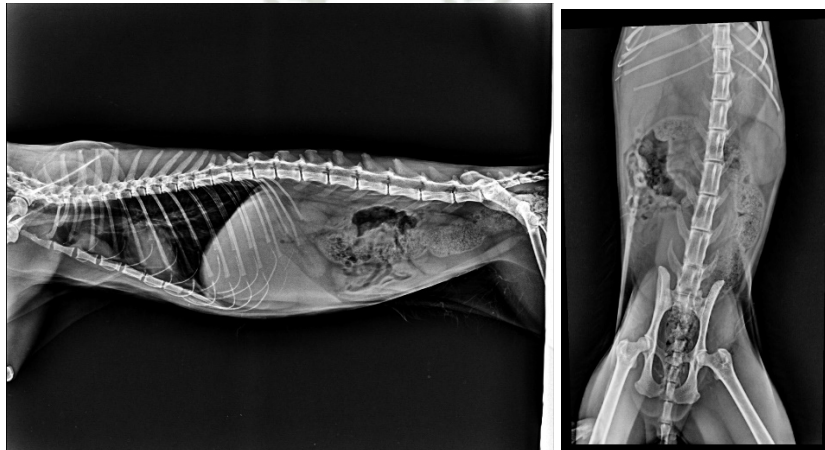
El paciente vuelve a consulta el 05 de junio del 2023 por consulta y se le realiza un hemograma en el que se observa una trombocitopenia (195.000 del rango 300.000 – 800.000 xmm<sup>3</sup>); con valores leucocitarios de un posible proceso viral, linfopenia (796 del rango 1.500 – 7.000 xmm<sup>3</sup>); y al realizar el test de descarte de leucemia felina salió positivo.

El 25 de noviembre vuelve a ingresar por una recaída en la que se le toma un examen de orina debido a que estaba obstruido en el que se observa un aspecto turbio y presencia de sedimento, en un nuevo hemograma su trombocitopenia es más marcada (69.000 del rango 300.000 – 800.000 xmm<sup>3</sup>), leucopenia (28.700 del rango 5.500 – 10.000.000 xmm<sup>3</sup>) y neutrófilos segmentados muy elevados (23.821 del rango 2.500 – 12.500 xmm<sup>3</sup>). Se procede a internar al paciente.

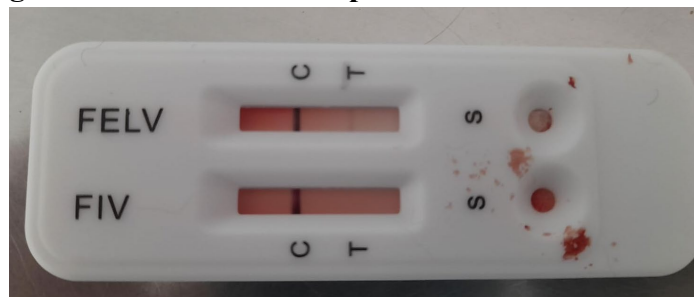
El 26 de noviembre se realiza un bioquímico donde sus valores están elevados siendo creatinina 10.0 mg/dL del rango 0.7 – 2.2 mg/dL y su urea es de 459.8 mg/dL del rango 18 – 41 mg/dL. Ares presentó insuficiencia renal crónica debido a la leucemia.

Regreso por consulta el 10 de marzo del 2025 debido a falta de apetito y estreñimiento, tomándose unas placas en las que se observa fecalomas. El paciente se encontraba en un estado débil, pero el dueño no retornó.

**Figura 62 y 63. Placas de Rx vista lateral, vista ventro-dorsal de Ares.**



**Figura 64. Prueba de Ares positivo a Leucemia Felina.**



## HISTORIA CLINICA 04

**Paciente:** Gatito

**Edad:** 3 años

**Sexo:** Macho

**Antecedentes:**

Su primer registro fue por una consulta general el 30 de enero del 2025, se realizó un hemograma en el cual indicaba anemia debido a que los hematíes se encontraban en 2.970.000 (del rango 5.000.000 – 10.000.000 xmm<sup>3</sup>); su hemoglobina estaba baja (5.3 del rango 8 – 15 g/dl); una trombocitopenia (217.000 del rango 300.000 – 800.000 xmm<sup>3</sup>); en la serie blanca se presenta leucopenia (20.300 del rango 5.500 – 19.500 xmm<sup>3</sup>); linfopenia (10.556 del rango 1.500 – 7.000 xmm<sup>3</sup>). También se le tomo una placa de rayos X para descartar problemas pulmonares y un kit de descarte de leucemia.

Debido a la sintomatología avanzada del felino en la consulta, los dueños decidieron por una eutanasia.

**Figura 65. Placas de Rx vista lateral de Gatito.**



**Figura 66. Prueba de Gatito positivo a Leucemia Felina.**

