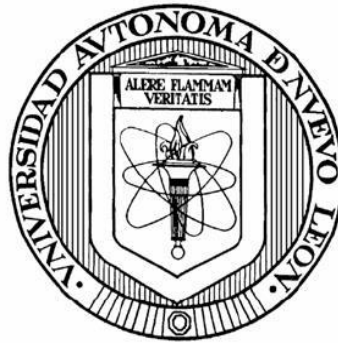


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
POSGRADO CONJUNTO



**COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO: FACTORES DE RIESGO Y
DETECCIÓN MOLECULAR DE AGENTES INFECCIOSOS SELECTOS EN
GATOS DEL AREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEON.**

Por

Irma Luz Pinales Hernández

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL

Noviembre 2020

**COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO: FACTORES DE RIESGO Y
DETECCIÓN MOLECULAR DE AGENTES INFECCIOSOS SELECTOS EN
GATOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN.**

COMITÉ DE TESIS:



DR. RAMIRO AVALOS RAMÍREZ
DIRECTOR DE TESIS



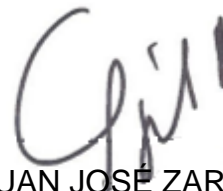
DR. JOSÉ C. SEGURA CORREA
DIRECTOR EXTERNO



DRA. SIBILINA CEDILLO ROSALES
CO-DIRECTOR



DRA. DIANA ELISA ZAMORA ÁVILA
CO-DIRECTOR



DR. JUAN JOSÉ ZARATE RAMOS
CO-DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Ramiro Avalos Ramírez por aceptar ser mi asesor, guiarme y apoyarme durante todo este tiempo, a pesar de lo mucho que tenía por aprender, él siempre estuvo presente en cada error para ayudarme a salir adelante.

A la Dra. Sibilina, el Dr. Jaime Escareño, por siempre brindarme su apoyo ante cualquier duda y facilitarme material cuando se llegó a necesitar.

Agradezco a cada uno de mis compañeros de generación y del laboratorio que siempre tuvieron alguna palabra de aliento o alguna enseñanza que compartir, durante estos dos años han sido parte importante de la culminación de este proyecto.

A las técnicas laboratoristas, Leslee y Cynthia, que, a pesar de no tener la responsabilidad de colaborar, siempre estuvieron dispuestas a apoyarme, y siempre supieron resolver las dudas que tuve durante estos años.

Al Dr. José Gonzales, que siempre tuvo las palabras correctas para alentarme a seguir adelante y vencer todos los miedos o dudas que llegue a tener.

A todos los médicos veterinarios clínicos que me dieron su confianza y su tiempo, para tomar las muestras a los pacientes y llenar las encuestas que les pedí, porque sin su valiosa colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Rosalinda y el Dr. Noé por siempre empujarme hacia el camino correcto, y por enseñarme cual es la forma correcta para trabajar, ser siempre honestos y jamás hacer las cosas mal porque otros así lo hagan. Gracias porque con ustedes aprendí que los profesionales buenos existen y que debemos trabajar para ser cada día mejores veterinarios.

Agradecer a CONACYT por concederme el apoyo económico para realizar la maestría y al posgrado en conjunto por aceptarme dentro del programa de maestría en ciencia animal.

Agradecimientos y reconocimiento al director de la FMVZ-UANL el Dr. Gustavo Moreno Degollado por todas las facilidades y apoyo recibido para la realización del presente estudio y consecución de la Maestría en Ciencias.

DEDICATORIA

A mis padres que siempre me han apoyado en todo lo que hago, por siempre darme palabras de aliento o regaños cuando se necesitó, por siempre impulsarme a seguir adelante y no dejarme vencer. Porque durante los 25 años de vida jamás me han reprochado absolutamente nada y solo se han dedicado a cuidarme y guiarme. Es de ellos de quien espero se sientan más orgullosos, porque han sido ellos los que jamás me han dejado sola.

Al departamento de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, ya que fue el lugar donde me desempeñe durante estos dos años y donde me brindaron el material y las enseñanzas necesarias para elaborar este proyecto.

A mis asesores, pero en especial a mi asesor principal, por sus palabras, regaños y enseñanzas que durante estos dos años me brindaron. A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por darme la oportunidad de estudiar y prepararme para ser una profesionista

Al Dr. José Gonzales, ya que sin sus palabras y todo su apoyo esto hubiera terminado desde hace algún tiempo. Al Dr. Jaime por siempre dar el mejor consejo para salir de algún apuro o duda.

A las técnicas Leslee y Cynthia, por toda su paciencia y todas sus enseñanzas, a mis compañeros de generación, a mi compañero de laboratorio Francisco que siempre estuvo dispuesto a resolver cualquier duda que tuviera.

Al Dr. Noé y la Dra. Rosalinda por ser como unos padres y siempre apoyarme y ayudarme a seguir siendo una mejor persona y profesionista, siempre escucharon mis quejas, pero sobre todo siempre tuvieron las palabras adecuadas para guiarme.

A Luis Mario Martínez que ha sido mi compañero de vida durante 6 años y formo parte de esta etapa que ahora culmina, por todo su apoyo y todo el sacrificio que siempre estuvo dispuesto a hacer por mí. Por sus palabras que muchas veces me hicieron recapacitar y no darme por vencida. A mis amigos que siempre estuvieron escuchando mis quejas, llantos y alegrías, pero sobre todo siempre motivándome a seguir adelante.

A Dios que me permitió despertar cada día llena de salud y permitirme culminar esta etapa de mi vida.

Este trabajo de tesis ha sido financiado a través de diversas vías:

El estudio fue financiado parcialmente mediante el *Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica -2019 (PAICyT 2019)* de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN a través de Dirección de Investigación de la Secretaria de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico para el proyecto: “Epidemiología Molecular y Factores de Riesgo asociados a la infección por Herpesvirus felino-1 (HVF-1) y Calicivirus Felino en gatos domésticos del área metropolitana de Monterrey, N.L.” clave: CT743-19 y por el *Programa de Apoyo para el Fortalecimiento de la Investigación (PAFI) 2019/2020* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ABREVIATURAS

A	Adenina
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido Ribonucléico mensajero
°C	Grados centígrados
Cp	Proteína de la cápside
C	Citosina
CI	Intervalo de Confianza
CO ₂	Dióxido de Carbono
cp	Citopático
CsCl	Cloruro de cesio
d	Precisión
D	Efecto de diseño
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E1	Proteína de envoltura 1
E2	Proteína de envoltura 2
FCV	Calicivirus Felino
FeHV-1	Herpesvirus Felino 1
G	Guanina
H	Adenina o Citosina o Timina
kDa	Kilodalton
µl	Microlitros
µM	Micromolar
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Min.	Minutos
Mr	Masa molecular
n	Tamaño de la muestra
N	Tamaño de la población
nm	Nanómetros
ORF	Marco Abierto de Lectura
OR	Razón de Momios, Razón de probabilidades, del inglés “Odds Ratio”
p	Prevalencia Esperada
P	Probabilidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rpm	Revoluciones por Minuto
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SAS	Statistical Analysis Software

SDS	Dodecilsulfato Sódico
SE	Error estándar
spp	Especies
T	Timina
TA	Temperatura ambiente
TAL	Transcripción asociada a latencia
U	Uracilo
WinEpi	Trabajo en Epidemiología "WorkingIN EPIdemiology"
w/v	Peso sobre volumen
χ^2	Chi-cuadrada
Z	Valor de la tabla de Z con un nivel de confianza del 95% (1.96)

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	iii
ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ABSTRACT	xiii.
RESUMEN.....	xvi.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HIPÓTESIS.....	4
1.2. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	4
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	5
2. LITERATURA REVISADA.....	6
2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	6
2.2. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE LOS AGENTES INFECCIOSOS ESTUDIADOS.....	7
2.2.1. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE <i>Herpesviridae</i>	7
2.2.2. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE <i>Mycoplasmaceae</i>	7
2.2.3. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE <i>Caliciviridae</i>	8
2.2.4. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE <i>Chlamydiaceae</i>	8
2.3. PROPIEDADES DE LOS AGENTES INFECCIOSOS.....	9
2.3.1. PROPIEDADES DE LOS VIRIONES DE <i>Herpesviridae</i>	9
2.3.2. PROPIEDADES DE LOS VIRIONES DE <i>Caliciviridae</i>	9
2.3.3. PROPIEDADES DE <i>Mycoplasmaceae</i>	10
2.3.4. PROPIEDADES DE <i>Chlamydiaceae</i>	11
2.4. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HERPESVIRUS FELINO-1.....	11
2.4.1. RINOTRAQUEITIS VIRAL FELINA.....	11

2.4.2. TRANSMISIÓN.....	11
2.4.3. PATOGENIA.....	11
2.4.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	12
2.4.5. DIAGNÓSTICO.....	12
2.4.6. TRATAMIENTO.....	12
2.4.7. EPIDEMIOLOGÍA.....	12
2.5. ENFERMEDADES CAUSADAS POR CALICIVIRUS FELINO EN GATOS.....	12
2.5.1. CALICIVIRUS FELINO.....	12
2.5.2. TRANSMISIÓN.....	13
2.5.3. PATOGENIA.....	13
2.5.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	14
2.5.5. DIAGNÓSTICO.....	14
2.5.6. TRATAMIENTO.....	14
2.5.7. EPIDEMIOLOGÍA.....	14
2.6. ENFERMEDADES CAUSADAS POR <i>Mycoplasma</i> spp. EN GATOS.....	14
2.6.1. <i>Mycoplasma</i> spp.....	14
2.6.2. TRANSMISIÓN.....	15
2.6.3. PATOGENIA.....	15
2.6.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	15
2.6.5. DIAGNÓSTICO.....	15
2.6.6. TRATAMIENTO.....	16
2.6.7. EPIDEMIOLOGÍA.....	16
2.7. ENFERMEDAD CAUSADA POR <i>Chlamydomphila felis</i> EN GATOS.....	16
2.7.1. <i>Chlamydomphila felis</i>	16
2.7.2. TRANSMISIÓN.....	16
2.7.3. PATOGENIA.....	17
2.7.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	17
2.7.5. DIAGNÓSTICO.....	17
2.7.6. TRATAMIENTO.....	18
2.7.7. EPIDEMIOLOGÍA.....	18

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. EQUIPOS.....	20
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
3.3. ESTUCHES COMERCIALES.	20
3.4. REACTIVOS.....	21
3.5. LUGAR Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	21
3.6. ÁREA DE MUESTREO Y ESPECIES INCLUIDAS EN EL TRABAJO.....	21
3.7. TIPO Y TAMAÑO DE MUESTRAS.....	23
3.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	24
3.9. EXTRACCIÓN DE ADN.....	24
3.10. PRIMERS	24
3.11. PCR MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN de FHV-1, <i>Mycoplasma</i> spp, y <i>Chlamydomphila felis</i>	24
3.12. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR) PARA LA DETECCIÓN FCV EN MUESTRAS CLÍNICAS.....	25
3.13. CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO.....	26
3.14. METODO ESTADÍSTICO.....	27
 4. RESULTADOS.....	 30
4.1. FRECUENCIA MOLECULAR DE FEHV-1, <i>Mycoplasma</i> spp Y FCV EN GATOS DOMÉSTICOS CON COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO.....	30
4.2. FACTORES DE RIESGO PARA LA PRESENTACIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAS de FeHV-1, <i>Mycoplasma</i> spp y FCV EN GATOS DOMÉSTICOS AFECTADOS POR CRF DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY N.L.....	37
 5. DISCUSIÓN.....	 39
6. CONCLUSION.....	44
 7. FUENTES BIBLIOGRAFICAS.....	 45

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TAMAÑO DE BANDA DEL AMPLICÓN EN PARES DE BASES.....	26
TABLA 2. RELACIÓN DE LA POSITIVIDAD A SECUENCIAS GENÉTICAS DE PATÓGENOS SELECTOS INVOLUCRADOS CON COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO EN GATOS DOMÉSTICOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L, MÉXICO.....	31
TABLA 3. RELACIÓN ENTRE LA CONDICIÓN CLÍNICA DETECTADA EN LOS GATOS POSITIVOS A SECUENCIA GENÉTICAS DE FEHV-1, MYCOPLASMA SPP Y FCV	35
TABLA 4. FACTORES DE RIESGO SIGNIFICANTES PARA LA PRESENCIA SECUENCIAS GENÉTICAS DEL FEHV-1 EN GATOS DOMÉSTICOS AFECTADOS CON CRF EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L.	38
TABLA 5. FACTORES DE RIESGO SELECTOS SIGNIFICANTES PARA LA PRESENCIA SECUENCIAS GENÉTICAS DEL MYCOPLASMA SPP EN GATOS DOMÉSTICOS CON SIGNOLOGÍA COMPATIBLE A CRF DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 MUNICIPIOS QUE CONFORMAN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN; MÉXICO.....	22
FIGURA 2 PRODUCTOS DE PCR GENERADOS A PARTIR DE LAS VACUNAS EMPLEADAS COMO CONTROLES POSITIVOS.	30
FIGURA 3 . PCR MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAS DE PATÓGENOS ASOCIADOS AL COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO (CRF) EN GATOS DOMÉSTICOS DEL ÁREA METROPOLITA DE MONTERREY, N.L.	32
FIGURA 4 . RT-PCR Y PCRN PARA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAS DEL CALICIVIRUS FELINO (FCV) ORIGINADOS A PARTIR DE LA VACUNA FELOCELL® (ZOETIS) Y LA COMBINACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS (1):.....	33
FIGURA 5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE GATOS DOMÉSTICOS AFECTADOS POR COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L.	34
FIGURA 6 RELACIÓN ENTRE LA CONDICIÓN CLÍNICA DE GATOS AFECTADOS POR COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO Y LA DETECCIÓN MOLECULAR DE FEHV-1 Y MYCOPLASMA SPP.	36

ABSTRACT

The purpose of this work was to carry out the first multicenter study in the Monterrey Nuevo León metropolitan area to estimate the prevalence of Feline Herpesvirus-1 (FHV-1), Feline Calicivirus (FCV) and *Mycoplasma* spp. in cats with Feline Respiratory Complex (CRF) disease and assess the risk factors for this clinical condition. The study population were 130 cats who had a consultation with signs compatible with the CRF. 130 conjunctival, nasal and oropharyngeal swabs were collected that were obtained from June 2018 to November 2019. A survey was conducted for each cat where data were collected, such as vaccination history, clinical signs, age and sex. Samples were analyzed by RT-PCR / PCR. Of the samples analyzed, the most common of the agents detected was FHV-1 (51%) followed by *Mycoplasma* spp. (13%), and as a coinfection of both agents a 2% positivity was found. FHV-1 infection was more common in cats that had access to the outside, who cohabited with other cats and cats that did not have an adequate vaccination schedule. For infection with *Mycoplasma* spp. It was more common to observe it in cats <1 year of age, <2 kg in weight and in cats that had access to the outside. The largest number of samples were collected during the winter months. CRF is a common disease that affects felines in the metropolitan area of Monterrey N.L., being commonly associated with infection with FHV-1 and *Mycoplasma* spp. Veterinarians can use this information to design tools to prevent, manage and control these infectious diseases in domestic cats.

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue realizar el primer estudio multicéntrico en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León para estimar la prevalencia de Herpesvirus felino-1 (FHV-1), Calicivirus felino (FCV) y *Mycoplasma* spp. en gatos con enfermedad del complejo respiratorio felino (CRF) y evaluar los factores de riesgo para esta condición clínica. La población de estudio fueron 130 gatos con signos variables compatibles con el CRF remitidos a consulta a diversas clínicas del área metropolitana. Se recolectaron 130 hisopos conjuntivales, nasales y orofaríngeos que fueron obtenidos desde junio del 2018 hasta noviembre del 2019. Se realizó una encuesta para cada gato donde se recopilaban datos, como el historial de vacunación, los signos clínicos, la edad y el sexo. Las muestras se analizaron mediante RT-PCR/PCR. De las muestras analizadas el más común de los agentes detectados fue FHV-1 (51%) seguido de *Mycoplasma* spp. (13%), y como coinfección de ambos agentes se encontró una positividad del 2%. La infección por FHV-1 fue más común en gatos que tenían acceso al exterior, que cohabitaban con otros gatos y gatos que no contaban con un calendario de vacunación adecuado. Para la infección por *Mycoplasma* spp. fue más común observarla en gatos < 1 año de edad, < 2 kg de peso y en gatos que tuvieron acceso al exterior. La mayor cantidad de muestras fueron recolectadas durante los meses de invierno. El CRF es una enfermedad común que afecta a los felinos del área metropolitana de Monterrey N.L, siendo comúnmente asociada a la infección por FHV-1 y *Mycoplasma* spp. Los médicos veterinarios pueden usar esta información diseñar herramientas de prevención, manejo y control de estas enfermedades infecciosas en gatos doméstico.

Palabras clave: Complejo respiratorio felino, Herpesvirus felino-1, Calicivirus felino, *Mycoplasma* spp.

1.1. INTRODUCCIÓN

Los virus son patógenos asociados fuertemente como causa actual de aumentos prominentes de la morbilidad y la mortalidad en todo el mundo tanto en animales como en humanos (Draz & Shafiee, 2018). Lo más notable de estas entidades biológicas es que carecen de metabolismo, por lo que son parásitos estrictamente intracelulares. La apropiación, uso de la maquinaria biosintética celular y modificación de la misma es con el propósito de replicar su material genético (ADN o ARN) y algunos constituyentes, esto mediante la expresión de su material genético que conlleva a alteración de la homeostasia celular y por lo tanto una descompensación a nivel de tejidos, órganos y sistemas de los organismos vivos (Koonin, Dolja, & Krupovic, 2015).

El gato doméstico (*Felis catus*) se ha convertido a lo largo de los años en una mascota popular en el mundo, amigables para unos y para otros no. Existen entre 600 millones y mil millones de gatos domésticos en todo el mundo, un número que sorprende para un animal que contribuye poco o nada en el trabajo. El gato doméstico es la consecuencia de notables experimentos de domesticación que comenzaron hace aproximadamente 10.000 años al este de Asia (O'Brien et al., 2012). En el gato doméstico los virus señalados como de mayor importancia incluyen a: el Virus de la Leucemia Felina (FeLV), Virus de la Inmunodeficiencia Felina (FIV), Herpesvirus Felino-1 (FHV-1), Virus de la Panleucopenia Felina (FPV), Calicivirus Felino (FCV) y Coronavirus Felino (FCoV). Mientras que las bacterias de mayor importancia incluyen a: *Mycoplasma* spp., *Chlamydomphila felis* y *Bordetella bronchiseptica* (Furtado et al., 2017).

El complejo respiratorio felino es una condición clínica con presentación aguda característica de una enfermedad respiratoria u ocular contagiosa que es ocasionada por uno o múltiples patógenos. Aunque la presentación de CRF generalmente es asociada a una enfermedad aguda, también puede originarse a consecuencias de secuelas de infecciones crónicas ya sea por reactivación viral o por deficiencias en la respuesta inmune en general o contra la infección. Se ha demostrado que al menos otros cuatro patógenos,

además del Calicivirus Felino, están asociados al CRF y estos son: Herpesvirus Felino-1, *Mycoplasma* spp., *Chlamydomphila felis* y *Bordetella bronchiseptica* (Berger et al., 2015). Debido a que CRF es iniciado por agentes infecciosos, aparentemente las manifestaciones agudas son relativamente fáciles de establecer en criaderos o sitios en los cuales la densidad poblacional es alta, mas no así en gatos alojados de forma individual y con limitado contacto con otros especímenes. Aunque la morbilidad es mayor a la mortalidad, bajo ciertas condiciones fisiológicas, de manejo y de medio ambiente, los gatos y especialmente los gatos jóvenes, pueden morir a consecuencia de la infección. Los signos clínicos pueden ser leves o extremadamente severos, las infecciones bacterianas secundarias pueden llegar a convertirse en complicaciones importantes. Los signos más comunes de CRF incluyen secreción nasal serosa, mucoide o mucopurulenta, estornudos, conjuntivitis, secreción ocular, ulceraciones de los labios, lengua y encías, salivación, letargo e inapetencia (Cohn et al., 2011). FHV-1 puede causar rinotraqueitis mientras que el FCV es responsable de la estomatitis y la gingivitis (Furtado et al., 2017). *Mycoplasma* spp. llega a ocasionar legaña, conjuntivitis o queratitis (Pasavento et al., 2008).

Herpesvirus felino-1 es un virus de ADN bicatenario que pertenece al género Varicellovirus siendo un virus de distribución mundial (Wang et al., 2017). Calicivirus Felino es un virus ARN que se encuentra presente en todo el mundo en gatos domésticos y felinos exóticos (Berger et al., 2015) es un virus monocatenario sin envoltura perteneciente a la familia Caliciviridae (Furtado et al., 2017). *Mycoplasma* spp. pertenece al grupo de bacterias Mollicutes orden Mycoplasmatales son bacterias que carece de pared celular. Los agentes infecciosos FHV-1 y FCV tienen como medida principal de prevención la vacunación, por lo que se recomienda se realice en gatos sanos (Radford et al., 2009). *Chlamydomphila felis* es un agente causante de neumonía y conjuntivitis aguda y crónica en gatos causando una enfermedad llamada clamidiosis felina (Ohya et al., 2008). El primer diagnóstico diferencial para la conjuntivitis felina es la infección por *Chlamydomphila felis*, es el principal agente patógeno conjuntival y a diferencia del FHV-1, no llega a afectar la córnea. Las principales manifestaciones clínicas en casos agudos pueden incluir secreción ocular, hiperemia conjuntival y a menudo quemosis (Sandmeyer et al., 2010). *Bordetella bronchiseptica* es un comensal del tracto respiratorio superior de diversas especies

animales, incluidos mamíferos y aves, también juega un papel importante como patógeno primario y secundario (Lee et al., 2020). En los gatos la conjuntivitis, traqueobronquitis, y la neumonía se han asociado con la infección por *Bordetella bronchiseptica* (Foley et al., 2002).

La finalidad del presente estudio es determinar el posible impacto epidemiológico que tiene la presencia y detección molecular del Herpesvirus felino-1, Calicivirus felino y de *Mycoplasma* spp. en gatos domésticos con alteraciones respiratorias y remitidos a consulta en clínicas del área metropolitana de Monterrey, N.L. La información pretende además coadyuvar al entendimiento de la presentación del Complejo respiratorio Felino, así como en la resolución de casos clínicos de estas entidades infecciosas.

1.1. HIPOTESIS

Los agentes infecciosos Herpesvirus felino -1, Calicivirus felino y *Mycoplasma*.spp están presentes y asociados al complejo respiratorio felino en gatos domésticos del área metropolitana de Monterrey, N.L.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al entendimiento epidemiológico del complejo respiratorio felino y factores de riesgo asociados a la presencia de Herpesvirus felino -1, Calicivirus felino y *Mycoplasma* spp. en gatos domésticos del área metropolitana de Monterrey, N.L.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Poner a punto un protocolo de RT-PCR/PCR para la detección múltiple de secuencias genéticas de Herpesvirus felino-1, Calicivirus felino y *Mycoplasma* spp.
- Establecer la prevalencia molecular de Herpesvirus felino -1, Calicivirus felino y *Mycoplasma* spp. en gatos con alteraciones respiratorias.
- Determinar la frecuencia de co-infecciones entre Herpesvirus felino -1, Calicivirus felino y *Mycoplasma* spp. en gatos con complejo respiratorio felino.
- Identificar factores de riesgo asociados a la infección por Herpesvirus felino -1, Calicivirus felino y *Mycoplasma* spp. en gatos con complejo respiratorio felino y coadyuvar a la precisión clínica diagnóstica.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Dada la carencia de datos que existen con respecto a la presencia y/o epidemiología de infecciones virales y bacterianas asociadas al Complejo Respiratorio Felino (CRF), así como la no disposición de métodos de diagnósticos precisos para detectar estos patógenos, es necesario contar con herramientas para determinar su presencia y posible impacto que puedan tener estas infecciones en la población de felinos domésticos en el área metropolitana de Monterrey, N.L. Colateralmente, los datos obtenidos permitirán coadyuvar en la resolución de casos clínicos de entidades infecciosas con participación múltiple en procesos respiratorios de gatos lo cual apoyara al personal involucrado en preservar la salud de esta población . Siendo posible el establecimiento de un diagnóstico rápido, sensible y específico para el diagnóstico de agentes virales y bacterianos involucrados en el CRF.

2. LITERATURA REVISADA

2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La taxonomía de virus es una construcción artificial que busca describir y catalogar la gran diversidad de virus conocidos y sus interrelaciones genéticas. Los virus se clasifican formalmente en órdenes, familias, géneros y especies por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Aiewsakun & Simmonds, 2018). Es un comité de la División de Virología de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS) siendo el responsable de la taxonomía de virus. Las decisiones del ICTV se basan en el asesoramiento de grupos de especialistas, que son los Grupos de estudio de ICTV, generalmente están compuestos por expertos en miembros de familias de virus en particular (Manuscript & Magnitude, 2013).

Los virus de la familia Herpesviridae se clasifican en tres subfamilias: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae y Gammaherpesvirinae (Troyer et al., 2014).

La familia Caliciviridae se divide en cinco géneros: Norovirus, Sapovirus, Lagovirus, Vesivirus y Nebovirus (International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://ictvonline.org>).

La taxonomía de las bacterias busca diferenciar y describir la amplia diversidad de especies bacterianas existentes, nombrando y agrupándolas según sus similitudes. Los criterios de clasificación son variados. El organismo encargado de la nomenclatura y taxonomía de las bacterias es el Comité Internacional de Sistemática Procariota (ICSP).

Las bacterias de la familia Mycoplasmataceae pertenece al orden Mycoplasmatales y cuentan con dos únicos géneros Mycoplasma y Ureaplasma (Martin et al., 2015).

Las bacterias de la familia Chlamydiaceae comprende en la subdivisión de dos géneros Chlamydia y Chlamydophila que se han discutido políticamente durante la última década (Konrad et al., 2015). Chlamydia trachomatis y Chlamydia psittaci fueron las dos únicas especies reconocidas hasta la década de 1980, antes de que se introdujeran Chlamydia pneumoniae y Chlamydia pecorum (Subtil et al., 2014).

2.2. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE LOS AGENTES INFECCIOSOS ESTUDIADOS.

2.2.1. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DEL *Herpesviridae*

La familia *Herpesviridae* es una de las familias virales más significativas que comprende los principales patógenos de una amplia gama de huéspedes (Sharma et al., 2016). Los diferentes géneros de virus pertenecientes a la subfamilia *Alfaherpesviridae* afecta humanos, así como a una amplia gama de animales como canidos, félidos, bóvidos, cérvidos, équidos entre otros más. Los virus que engloba la subfamilia *Betaherpesvirinae* causan enfermedades en primates y humanos. Y la subfamilia *Gammaherpesvirinae* engloba a virus que afectan a humanos, primates, bovinos, ovinos, cerdos, equinos, reptiles y otros mamíferos (Eberle et al., 2013).

2.2.2. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE *Mycoplasma*

Muchas especies de *Mycoplasmataceae* son patógenas en animales y humanos. Dentro de ella se encuentran los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma* caracterizando a este último por la capacidad de hidrolizar la urea para la producción de energía (Martin et al., 2015). Los *Mycoplasmas* han sido reconocidos por mucho tiempo como patógenos del tracto urogenital, tracto respiratorio y articulaciones en una gran variedad de especies animales. Producen enfermedades que son crónicas y a menudo de origen multifactorial con algunas raras excepciones. La infección se produce según las condiciones ambientales, la predisposición genética del huésped y en menor medida debido a la naturaleza del microbio infectante. Durante mucho tiempo ha sido difícil establecer la importancia etiológica de los *Mycoplasmas*. En la última década, estos organismos han recibido una atención creciente como agentes de enfermedades humanas y enfermedades en animales. *Mycoplasmas*, que es el epíteto comúnmente aceptado de los microorganismos sin pared pertenecientes a la clase Mollicutes, constituyen un linaje filogenético distinto dentro de los Gram positivos, caracterizados por tener un bajo contenido de GC en sus genomas, en el dominio Bacterias (Pettersson et al., 1989).

2.2.3. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE *Caliciviridae*

Caliciviridae es una familia de virus que infectan a humanos, a una amplia gama de animales como aves, peces , y otros mamíferos, lo que resulta en un amplio espectro de enfermedades (Mikalsen et al., 2014). Los *norovirus* como los agentes causantes más importantes de la gastroenteritis humana epidémica no bacteriana. Los *sapovirus* juegan un papel menor como agentes causantes de gastroenteritis principalmente en niños pequeños (Bank et al., 2010). *Lagovirus* que causa una enfermedad hemorrágica en conejos y liebres (Le Gall-Reculé et al., 2017). Los *vesivirus* causan diversas enfermedades en varios huéspedes animales como felinos, cerdos, reptiles, anfibios, peces e incluso nematodos (Mikalsen et al., 2014) La infectividad y la citopatología de *Vesivirus* pueden variar con la cepa, la especie y el tipo de célula infectada. Algunos animales pueden estar infectados solo por un corto tiempo, pero otros animales como los chimpancés pueden tener infecciones recurrentes persistentes (Smith et al., 1983). Mientras que los *nebovirus* han demostrado causar gastroenteritis en el ganado (Conley et al., 2017).

2.2.4. ESPECTRO DE HOSPEDEROS DE *Chlamydiaceae*

La familia Chlamydiaceae es de las familias más antiguas y están dentro de los grupos de bacterias intracelulares obligadas más exitosas. Comprende de bacterias intracelulares obligatorias distinguidas por un ciclo de desarrollo bifásico único (Konrad et al., 2015).

La familia Chlamydiaceae se divide en dos géneros, *Chlamydia* y *Chlamydophila*. El género *Chlamydia* comprende *Chlamydia trachomatis* (una conjuntivitis humana y agente de enfermedades de transmisión sexual), *Chlamydia muridarum* (un agente de neumonía en ratones) y *Chlamydia suis* (un agente de conjuntivitis porcina).

El último género, *Chlamydophila*, incluye *Chlamydophila pneumoniae* (un agente para la neumonía y un posible agente de aterosclerosis), *Chlamydophila psittaci* (un agente para la psitacosis), *Chlamydophila abortus* (un agente abortivo en rumiantes), *Chlamydophila caviae* (aislado de cobayas), *Chlamydophila pecorum* (infectando rumiantes), y *Chlamydophila felis* (infectando gatos) (Everett et al., 1999; Ohya et al., 2008).

2.3. PROPIEDADES DE LOS AGENTES INFECCIOSOS

2.3.1. PROPIEDADES DE VIRIONES DE *Herpesviridae*

Los virus de la familia Herpesviridae son virus de ADN lineales, bicatenarios con genomas virales grandes (> 100 kb) que codifican 100-200 genes (Troyer et al., 2014). Los ADN difieren con respecto a su tamaño y composición base. El tamaño de los genomas virales es característico de cada virus (especie) y no es un reflejo de polimorfismo, aunque los genomas de herpesvirus individuales varían ligeramente de tamaño. El tamaño de los ADN de herpesvirus varía desde aproximadamente 124 a 235 kbp. (Roizmann et al., 1992). El número de ORF contenidas dentro de los genomas de los herpesvirus que codifican proteínas varía de aproximadamente 70 a más de 200 (International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://ictvonline.org>). Poseen una cápside icosaédrica de aproximadamente 100 a 110 nm (Roizmann et al., 1992). La cápside madura está compuesta de cuatro proteínas principales y varias menores, mientras que el tegumento contiene al menos 15 polipéptidos diferentes. La composición polipeptídica del virión maduro varía mucho entre herpesvirus. Se han identificado más de 30 polipéptidos diferentes en viriones HHV-1. Los miembros de las tres familias en el orden Herpesvirales son filogenéticamente muy distantes entre sí, siendo la morfología del virión la característica unificadora en el orden en lugar del contenido genético. (International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://ictvonline.org>).

2.3.2. PROPIEDADES DE LOS VIRIONES DE LOS *Caliciviridae*

Los viriones consisten en una cápside. La cápside del virus no está envuelta y es redonda con simetría icosaédrica, la cápside isométrica tiene un diámetro de 35 a 39 nm. Los viriones vacíos tienen un diámetro de 23 nm. La estructura de la superficie de la cápside revela un patrón regular con características distintivas, que incluyen 32 depresiones en forma de copa. (Mikalsen et al., 2014).

La masa molecular (M_r) de los viriones es de 15×10^6 . Los viriones tienen una densidad flotante en cloruro de cesio (CsCl) de 1.33–1.41 g / cm³. El gradiente de densidad de viriones en tartrato de potasio-glicerol es 1.29 g / cm³. En condiciones in vitro, los

viriones se inactivan en un entorno ácido de pH 3-5. Los viriones no son estables a temperatura elevada en presencia de alta concentración de Mg^{++} . Los viriones son sensibles al tratamiento con tripsina (en algunas cepas, no son sensibles al tratamiento con detergentes suaves, éter o cloroformo). La infectividad aumenta después del tratamiento con tripsina (en algunas cepas) (ICTV).

El genoma no está segmentado y contiene una sola molécula de ARN de cadena positiva de sentido positivo lineal. Algunas veces se encuentran especies menores de ácido nucleico no genómico en viriones. El genoma completo tiene 7700 nucleótidos de largo. El genoma tiene un contenido de guanina + citosina de 45 a 49%. El extremo 5' del genoma tiene una proteína ligada al genoma (VPg). El término 3' tiene un tracto poli (A). Cada virión contiene una copia de longitud completa o copias interferentes defectuosas (Smith et al., 2006).

Compuesto predominantemente por una proteína de la cápside principal VP1. Se ha encontrado una segunda proteína estructural menor llamada VP2 en asociación con viriones FCV y RHDV. Las proteínas no estructurales están codificadas en el extremo 5' del genoma y las proteínas estructurales en el extremo 3'. Organizado en tres marcos de lectura abiertos (ORF); ORF1 (nucleótidos 20-5.305) codifica las poliproteínas no estructurales incluyendo la polimerasa viral; ORF2 (nucleótidos 5,314 a 7,317-7,326) codifica la proteína de cápside estructural principal (VP1) y ORF3 (nucleótidos 7,617-7,626 a 7,634-7,643) que codifica la proteína estructural secundaria VP2 (Abd-Eldaim et al., 2009).

2.3.3. PROPIEDADES DE *Micoplasmaceae*

Las bacterias de la familia Mycoplasmataceae son pequeñas bacterias pleomórficas, que carecen de una pared celular, el citoplasma está limitado por una membrana teniendo una morfología variada. Las formas varían de filamentosas a esféricas, con diámetros de hasta 0.8 μm (Shah et al., 2012; Hentschel et al., 1998).

Han sido los procesos evolutivos responsables de una amplia gama de diversidad, los fenotipos de virulencia han sido de interés desde hace mucho tiempo. Algunos estudios

evolutivos previos de la Chlamydiaceae involucraron la reconstrucción filogenética utilizando genes de ARNr (Everett et al., 1999; Robin et al., 2001) y el gen para la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (Fitch et al., 1993).

2.4. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HERPESVIRUS FELINO

2.4.1. RINOTRAQUEITIS VIRAL FELINA

El virus Herpesvirus felino -1 (FHV -1) causa una enfermedad respiratoria superior severa de gatos conocida como Rinotraqueitis viral felina (Key & Medicine, 1985). FeHV-1 es un virus de dsDNA con envoltura clasificado dentro del género Varicellovirus dentro de la subfamilia Alphaherpesvirinae (Townsend et al., 2013).

2.4.2. TRANSMISIÓN

El virus se desprende de las secreciones oculares, nasales y orales y la transmisión se produce principalmente por contacto directo con un gato infectado. En algunas situaciones, particularmente dentro de un criadero, la transmisión indirecta también puede ocurrir a través de la contaminación de la vivienda (Radford et al., 2007).

2.4.3. PATOGENIA

En todos los herpes virus el ADN viral se transcribe al ARNm dentro del núcleo de la célula infectada. La infección se inicia cuando una partícula viral contacta una célula con tipos específicos de moléculas receptoras en la superficie celular. Después de la unión de las glicoproteínas de la envoltura viral a los receptores de la membrana celular, el virión se internaliza y se desmantela, lo que permite que el ADN viral migre al núcleo celular. Dentro del núcleo, se produce la replicación del ADN viral y la transcripción de genes virales. Durante la infección sintomática, las células infectadas transcriben genes virales líticos. En cambio, en algunas células huésped, se acumula una pequeña cantidad de genes virales denominados transcripción asociada a la latencia (TAL). De esta manera, el virus puede persistir en la célula (y, por lo tanto, en el huésped) indefinidamente. Si bien la infección primaria suele ir acompañada de un período autolimitado de enfermedad clínica, la latencia a largo plazo no presenta síntomas (ICTV). En la infección aguda, el

virus se replica predominantemente en los cornetes nasales, paladar blando, amígdalas, y en menor grado (Key & Medicine, 1985) en las células epiteliales de la conjuntiva y el tracto respiratorio superior (Hora et al., 2013).

2.4.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los primeros signos incluyen depresión, estornudos marcados, inapetencia y pirexia, seguidos rápidamente por secreciones nasales y orales (Radford et al., 2007).

2.4.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico puede basarse inicialmente en signos clínicos. El FHV-1 generalmente induce signos más graves en el tracto respiratorio superior y en la conjuntiva que otros patógenos respiratorios felinos, pero cuando se requiere un diagnóstico específico, se deben realizar pruebas de laboratorio (Radford et al., 2007).

2.4.6. TRATAMIENTO

Aunque no existen tratamientos específicos para combatir esta enfermedad, la administración oral de famciclovir a gatos con infección por FHV-1 parece ser segura y efectiva. L-Lysine es un suplemento de aminoácidos oral que reduce la diseminación viral en gatos con infección latente por FHV-1. (Cohn et al., 2011)

2.4.7. EPIDEMIOLOGÍA

El herpesvirus-1 felino, tiene una prevalencia de entre 0,2% y 33% en gatos domésticos , se ha notificado a tasas de entre 63% y 84% en gatos de refugio en Corea del Sur , Bélgica y California (E.U) (Gourkow et al., 2013).

2.5. ENFERMEDADES CAUSADAS POR CALICIVIRUS FELINO

2.5.1. CALICIVIRUS FELINO

El virus Calicivirus felino (FCV) pertenece a la familia *Caliciviridae* del género *Vesivirus* siendo un virus de ARN genómico monocatenario de sentido positivo (Kim & Chang, 2018). FCV es responsable de estomatitis y gingivitis en gatos domésticos (Furtado et al., 2017).

Varios estudios han correlacionado la prevalencia de FCV con la presentación crónica de gingivostomatitis crónica en felinos domésticos (Fernández et al., 2016).

2.5.2. TRANSMISIÓN

Tanto los gatos con infección aguda como los portadores crónicos eliminan el virus altamente contagioso de secreciones corporales y especialmente en secreciones respiratorias, oculares y orales. El virus es bastante estable en el medio ambiente y puede persistir durante un mes o más (Cohn et al., 2011).

2.5.3. PATOGENIA

La replicación viral es citoplasmática. La entrada en la célula huésped se logra mediante la unión a los receptores del huésped, que median la endocitosis. La replicación sigue el modelo de replicación del virus de ARN de cadena positiva. La transcripción del virus de ARN de cadena positiva es el método de transcripción. La traducción se lleva a cabo mediante escaneo con fugas y reinicio de terminación de ARN. Los vertebrados sirven como el huésped natural. Las rutas de transmisión son fecales-orales (ICTV).

Después del contacto con las partículas virales, el gato susceptible desarrollará una viremia transitoria en la orofaringe que es el sitio primario de la replicación viral. La gravedad de la enfermedad depende de una serie de factores que incluyen la virulencia del agente patógeno y la respuesta del huésped. Los gatos con una inmunidad preexistente pueden permanecer sanos, mientras que los gatos que no cuentan con ella padecen la enfermedad, lo que podría explicar por qué los gatos jóvenes se ven afectados con mayor frecuencia por FCV que los gatos adultos (Cohn et al., 2011).

2.5.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Muchos gatos infectados con FCV no manifiestan la enfermedad. Estos animales pueden estar infectados persistentemente o estar infectados con cepas de FCV que causan enfermedad leve o no fácilmente detectable. En aquellos gatos que muestran signos agudos de enfermedad los hallazgos clínicos más consistentes son fiebre y ulceración lingual u oral. FCV también puede causar signos respiratorios superiores como estornudos, rinitis y conjuntivitis (Pesavento et al., 2008).

2.5.5. DIAGNÓSTICO

La detección del virus se puede realizar mediante el aislamiento viral o la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar el ARN viral (Pesavento et al., 2008).

2.5.6. TRATAMIENTO

No existe un tratamiento específico para esta enfermedad, los tratamientos suelen ser sintomáticos. Por lo tanto, se espera el desarrollo de agentes terapéuticos efectivos para diversas cepas de FCV para proporcionar un beneficio significativo para el manejo y control de la infección por FCV en gatos (Kim & Chang, 2018).

2.5.7. EPIDEMIOLOGÍA

El Calicivirus felino tiene la propensión a evolucionar rápidamente, por lo que se pueden encontrar diferentes cepas en el campo (Almeras et al., 2017). Causa una alta morbilidad y generalmente baja mortalidad, con solo casos ocasionales de una enfermedad más virulenta. (Pesavento et al., 2008). En los últimos años, se notificaron cepas virulentas sistémicas de FCV (vs-FCV) que causan enfermedades sistémicas graves con una mortalidad alta de hasta 67% en los Estados Unidos (Kim & Chang, 2018).

2.6. ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Mycoplasma* spp. EN GATOS

2.6.1. *Mycoplasma* spp.

2.6.2. TRANSMISIÓN

Tanto los gatos con infección aguda como los portadores crónicos eliminan la bacteria altamente contagiosa de secreciones corporales y especialmente en secreciones respiratorias, oculares y orales. La bacteria es bastante estable en el medio ambiente y puede persistir durante un mes o incluso años (Cohn et al., 2011).

2.6.3. PATOGENIA

Después del contacto directo con un gato enfermo, el gato susceptible desarrollará una infección transitoria en la conjuntiva que es el sitio primario de la replicación bacteriana. La gravedad de la enfermedad depende de una serie de factores que incluyen la patogenicidad del agente infeccioso y la respuesta del huésped. Los gatos con una inmunidad preexistente pueden permanecer sanos, mientras que los gatos que no cuentan con ella padecen la enfermedad, lo que podría explicar por qué los gatos jóvenes se ven afectados con mayor frecuencia que los gatos adultos (Cohn et al., 2011).

2.6.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Muchos gatos infectados con *Mycoplasma* spp. no manifiestan la enfermedad. Estos animales pueden estar infectados persistentemente pero no ser fácilmente detectable. En aquellos gatos que muestran signos agudos de enfermedad los hallazgos clínicos más consistentes son legaña, conjuntivitis o queratitis. (Pesavento et al., 2008). La presencia de descargas nasales u oculares purulentas o mucopurulentas puede ser un indicativo de alguna infección bacteriana primaria o secundaria, pero no es un signo verdaderamente patognomónico ya que los agentes virales o fúngicos también pueden inducir descargas mucopurulentas (Lappin et al., 2017).

2.6.5. DIAGNÓSTICO

La detección de la bacteria generalmente se realiza mediante cultivo microbiano y más recientemente mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo esta última una técnica diagnóstica con mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de laboratorio en comparación con el cultivo microbiano. Aunque estas dos técnicas han sido aplicadas y probadas, no son técnicas comúnmente utilizadas en la

clínica veterinaria, por el tiempo de respuesta y por la falta de laboratorios que se dediquen a hacer estos diagnósticos (Parker et al., 2018).

2.6.6. TRATAMIENTO

Debido a la falta de pruebas diagnósticas rápidas para la detección del agente involucrado en la infección, los tratamientos suelen ser sintomáticos y sistemáticos, un antibiótico de amplio espectro. Por lo tanto, se espera que el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y pruebas rápidas, aseguren un tratamiento más específico (Kim & Chang, 2018).

2.6.7. EPIDEMIOLOGÍA

Mycoplasma spp. tiene la propensión a evolucionar rápidamente, por lo que se pueden encontrar una amplia variedad de especies (Almeras et al., 2017). Causa una alta morbilidad y muy baja mortalidad, con solo casos ocasionales de una enfermedad grave (Pesavento et al., 2008). En los últimos años, se notificaron nuevas especies de *Mycoplasma* (vs-FCV) con sintomatología relativamente variada (Kim & Chang, 2018).

2.7. ENFERMEDAD CAUSADA POR *Chlamydia felis*

2.7.1. *Chlamydia felis*

Chlamydia felis es un agente bacteriano causante de la clamidiosis felina y un agente potencialmente zoonótico, se caracteriza por causar infecciones primarias en el tracto respiratorio superior, conjuntivitis aguda o crónica y neumonía en gatos domésticos. Por lo general, se transmite por vías aéreas y en secreciones oculares y nasales de gatos infectados (Ming et al., 2013).

2.7.2. TRANSMISIÓN

La transmisión de gatos infectados a gatos clínicamente sanos se produce principalmente por contacto directo por secreciones oculares e indirectamente por contaminación de fómites. La transmisión también puede darse a través de aerosoles por secreciones nasales pero este método de transmisión es poco frecuente (Povey et al., 1990).

2.7.3. PATOGENIA

Tiene predilección por las células epiteliales conjuntivales. Puede persistir en el epitelio de la conjuntiva y el aparato respiratorio superior como flora residente. Tras la infección esta tiende a seguir un curso crónico e insidioso que muy a menudo progresa de forma asintomática (Sykes et al., 2005). Esto le permite permanecer en el organismo por un periodo prolongado. El periodo de incubación va desde los 3 – 14 días.

Se ha documentado la presencia de *C. felis* en excreciones fecales y vaginales en gatos con infecciones prolongadas, esto sugiere que los tractos intestinal y reproductivo pueden ser sitios de infección persistente. También se ha encontrado en el pulmón, bazo, hígado, riñón y peritoneo de gatos, aunque la importancia de la infección en estos sitios no está clara (Wills et al., 1986; Sykes et al., 2005). El organismo se excreta durante varios meses (Helps et al., 2005). Se ha aislado *C.felis* de la conjuntiva hasta 215 días después de la infección experimental (Sykes et al., 2005).

2.7.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los signos clínicos más comunes son la conjuntivitis, quemosis, secreción ocular serosa a mucopurulenta y blefaroespasma (Sykes et al., 2014; Nguyen et al., 2018). El signo clínico más frecuente es la conjuntivitis, pero el aspecto clínico de la conjuntivitis varía según la persistencia de la enfermedad (Schulz et al., 2015). También se pueden observar otros signos clínicos como secreciones nasales serosas o mucopurulentas y estornudos (Sykes et al., 2014). La conjuntivitis se asocia típicamente con un infiltrado neutrofílico. La fiebre transitoria, la inapetencia y la pérdida de peso pueden ocurrir poco después de la infección, aunque la mayoría de los gatos permanecen bien y continúan comiendo. Los signos clínicos mejoran después de algunas semanas, pero la conjuntivitis leve a menudo persiste durante meses (Sykes et al., 1999; Sykes et al., 2005).

2.7.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de *C. psittaci* en gatos no se puede hacer estrictamente basados en la apariencia clínica de la conjuntivitis. Aunque la quemosis (durante la forma aguda de la enfermedad) y la formación de folículos linfoides (durante la forma media a crónica de la

enfermedad) han sido descritos como signos clínicos clásicos de la enfermedad, la presencia de ellos no se puede utilizar para establecer un diagnóstico definitivo (Hoover et al., 1978). Al igual que otros agentes la detección de esta bacteria generalmente se realiza mediante cultivo microbiano y más recientemente mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo esta última una técnica diagnóstica con mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de laboratorio en comparación con el cultivo microbiano (Parker et al., 2018). A pesar de la alta seroprevalencia en gatos clínicamente normales y gatos con conjuntivitis, este organismo se aísla con poca frecuencia (4% a 6%) de hisopos conjuntivales (Greene et al., 1998). La infección con *C. felis* se detecta con mayor frecuencia en gatos de 2 a 12 meses de edad (Sykes et al., 2014).

2.7.6. TRATAMIENTO

Los tratamientos suelen ser sintomáticos y sistemáticos. Las clamidias son susceptibles a las tetraciclinas, la eritromicina, rifampicina y fluoroquinolonas. La doxiciclina es el tratamiento de elección, y parece ser superior a la azitromicina. En las colonias de investigación, la infección por *C. felis* se elimina eficazmente usando doxiciclina sistémica sola durante 3 semanas (5 mg / kg q12 hora) (Sykes et al., 1999). La naturaleza sistémica de las infecciones por clamidias en gatos explica por qué la terapia tópica por sí sola no es efectiva. En algunos casos, períodos de tratamiento de más de 3 semanas han sido necesarios para eliminar infecciones por *C. felis*, combinando terapia sistémica con tetraciclina tópica algunos han sugerido ungüentos cada 6 a 8 horas (Gaskell et al., 1996). Es posible que, en infecciones crónicas, el organismo pueda ser más difícil de eliminar (Leirisalo et al., 1993). Sin embargo, los casos recurrentes a menudo involucran el alojamiento de una gran cantidad de gatos y un mal cumplimiento con los métodos de prevención (Strugess et al., 2001). Todos los gatos deben tratarse con el ciclo completo de antimicrobianos y se debe mantener una higiene y cuarentena adecuadas.

2.7.7. EPIDEMIOLOGÍA

La especie principal que infecta a los gatos es *C. felis*, pero recientemente un ADN que se parece al del patógeno humano *Chlamydomphila pneumoniae* se ha detectado en hisopos oculares de gatos con conjuntivitis de Europa (Sykes et al., 2014). No se ha demostrado

que *C. felis* que tenga preferencias regionales, geográficas o ambientales, pero es más probable que se haga un diagnóstico positivo durante los meses de verano en comparación con otras estaciones, tiene distribución mundial y está presente en ambientes áridos y húmedos (Sykes et al.,1999; Greene et al.,1998). Se ha estimado que su prevalencia oscila entre 0% –15% (Nguyen et al.,2018). Los porcentajes de gatos positivos para la infección por *C. felis* fueron 14.7% en Gran Bretaña (29), 20.0% en Italia (32), 11.5% en Suiza, 15,3% en Suecia y 4,6% en los Estados Unidos. En estudios anteriores en Japón, los porcentajes fueron 26.3% en gatos callejeros y 28.9% en gatos domésticos (Schulz et al., 2015).

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. EQUIPOS

- Campana de flujo LABCONCO® Purifier class II Biosafety Cabinet (Delta series).
- Centrífuga refrigerada BIOMETRIX® MICRO 17TR.
- Refrigerador de 16 pies cúbicos 2-4 °C TORREY.
- Ultra congeladores de -20 °C CFC0735 ARW, ADMIRA.
- Ultra congelador de -80 °C MDF-C8V1, Sanyo Scientific.
- Ultra congelador de 150 °C MDF-C2156VANC, Sanyo Scientific.
- Micropipetas Bio/Pet (1000/100 µl); (200/20 µl); (100/10µl); (10/0,5 µl).
- Tubos de polipropileno de microcentrífuga MCT-150-C.
- Termociclador, MAXYGENE; AXYGEN.
- Simplicity® UV; F9AN46648; MILLIPORE.
- Cámara Transiluminadora UVP; UV, MultiDoc-It; Digital Imaging System.
- Bloque térmico (55-60 °C) AccuBlock, Labnet International.
- Puntillas desechables para micropipetas de 10, TF-300-R-S, AXYGEN 20,
- 200 T-200-Y, AXYGEN, 1000 T-1000-B, AXYGEN SCIENTIFIC µl.
- Vórtex; Daigger; Genie 2.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

- Vacuna Felocell (Zoetis)
- Vacuna Feligen(Virbac)
- Vacuna Purevax (Merial)

3.3. ESTUCHES COMERCIALES

- QuiAamp Ultrasens Virus kit
- PCRMaster Mix (Thermo Scientific)
- SuperScript™ III RT (Invitrogen)

3.4. REACTIVOS

- Cloroformo al 99.8%, Jalmek®.
- Alcohol isopropílico 99.5%, Jalmek®.
- Etanol Anhidro 99.5%, Jalmek®.
- Agua libre de RNAsas y DNAsas, tratada con DEPC
- Solución de agarosa, Agarosa LE, AGR-LE-500 AXYGEN BIOSCIENCES: 1,5
- Buffer de corrimiento para ADN/ARN: SB 1X.
- Marcador de peso molecular 500 µl. 100 bp ADN, GenScript.
- Buffer SB 1X (50 ml. Buffer 20X, 35 gr. Ácido bórico (F.W. 61.83) y 6 gr.
- Agua destilada y esterilizada (buffer de electroforesis).

3.5. LUGAR Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento de las muestras para el diagnóstico molecular de este estudio se llevó a cabo en el Departamento de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.6. ÁREA DE MUESTREO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS GATOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

El estado de Nuevo León, con su capital Monterrey, se ubica al noreste de México y cuenta con 5,119,504 habitantes siendo en el 2015 el séptimo estado con mayor población del país y con el 95% de sus habitantes asentados en el área urbana (www.inegi.org.mx). Los municipios de Apodaca, Pesquería, Cadereyta Jiménez, García, General Escobedo, Guadalupe, Juárez, Salinas Victoria, San Nicolás de los Garza, San Pedro Garza García, Santa Catarina y Santiago junto con Monterrey conforman actualmente el Área Metropolitana de Monterrey (Figura 1).

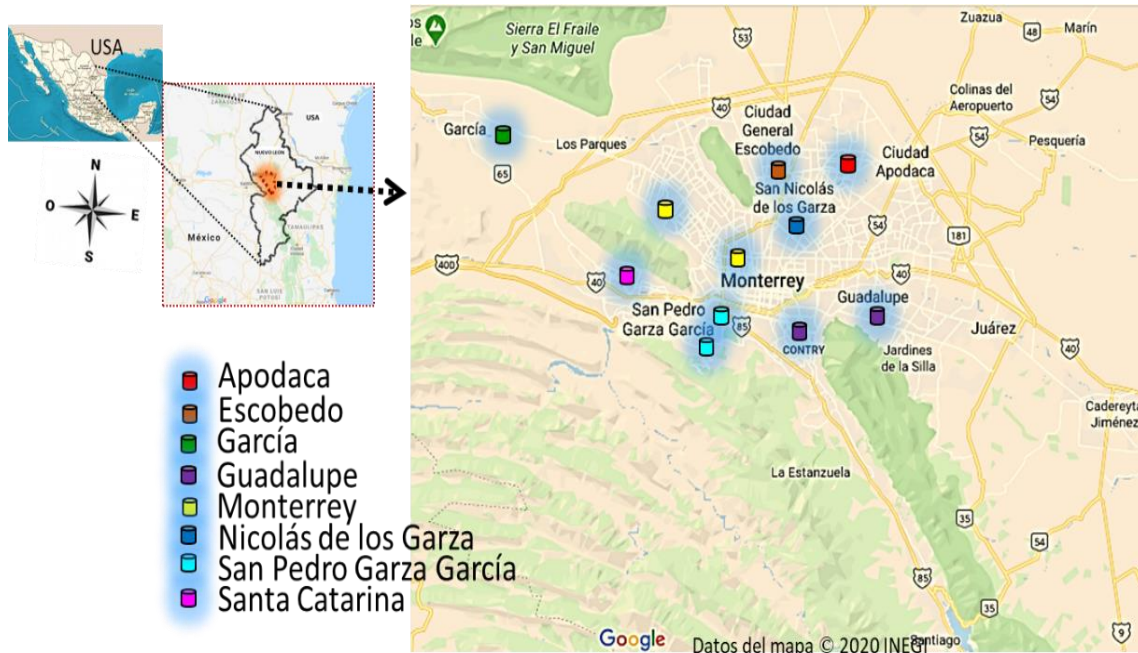


Figura 1. Municipios que conforman el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León; México. Se muestra la ubicación relativa de las clínicas veterinarias a partir de las cuales se obtuvieron las muestras clínicas de gatos domésticos afectados por CRF.

A la par del aumento de la extensión territorial y de la población humana y acorde a información proporcionada por miembros del Colegio de Médicos Veterinarios especialistas en pequeñas especies de Nuevo León (COMVEPE), también ha ocurrido un auge considerable en la población de felinos domésticos en el área de Monterrey y con ello el incremento de hallazgos de diversas condiciones infecciosas que afectan la salud de estos animales. Los procesos infecciosos, en las clínicas de pequeñas especies y particularmente en gatos, son categorizados en respiratorios, digestivos, nerviosos y generalizados. La gran mayoría de estas condiciones son tratados acordes a síntomas manifestados y su progresión clínica. Solo una proporción menor de profesionistas dedicados la clínica de pequeñas especies refiere realizar estudios básicos de laboratorio para complementar el diagnóstico. Estos estudios de diagnóstico usualmente consisten en biometrías hemáticas y de química sanguínea. Los gatos domésticos afectados por el Complejo Respiratorio Felino (CRF) no escapa de esta situación dado que en la mayoría

de los casos no se realiza el diagnóstico etiológico. Los únicos agentes infecciosos, para los cuales existen estuches comerciales y contra los cuales se lleva a cabo el diagnóstico en la clínica son para el Virus de la Leucemia Felina y el Virus de la Inmunodeficiencia Felina.

Acorde a lo señalado, los animales sujetos de estudio fueron gatos domésticos presentados a consulta con diversos grados de alteraciones respiratorias y oculares a distintas clínicas veterinarias del área metropolitana. En este criterio de inclusión se consideraron por igual ejemplares si el problema respiratorio estaba acompañado de otra alteración ya sea digestiva o generalizada. En todos los casos Médicos Veterinarios responsables de cada clínica estimaron la condición clínica y obtuvieron las muestras bajo previa entrevista para exponerles los objetivos del estudio. Todas las muestras se obtuvieron bajo el consentimiento del propietario del ejemplar.

3.7. TIPO, TAMAÑO DE MUESTRA Y DATOS DE LOS PACIENTES.

Ante la consulta los médicos veterinarios participantes procedieron a realizar la valoración clínica de cada ejemplar y realizaron el llenado del expediente clínico respectivo. Las muestras para el estudio consistieron en hisopados nasofaríngeos y de conjuntiva ocular, mismas que fueron depositados en tubos con 1.5 ml de solución salina estéril. Los tubos fueron almacenados a 4°C mientras fueron acopiados por un periodo de entre 24 hasta 78 horas. Después de recolectados, las muestras fueron almacenados a -20°C hasta su análisis en las pruebas moleculares. El tamaño total de la muestra fue de 130 gatos domésticos con su respectiva encuesta. Los datos epidemiológicos fueron recogidos mediante encuesta con información obtenida a partir del expediente clínico y entrevista con el Médico Veterinario responsable del caso. La encuesta consistió cerca de 45 preguntas divididas en datos generales y procedencia de los pacientes, así como las características clínicas al momento de obtener la muestra y antecedentes de medicina veterinaria preventiva como vacunaciones y desparasitaciones. En el anexo 1 se muestra el formato la encuesta “*Estudio epidemiológico de agentes infecciosos del Complejo Respiratorio Felino*” usada para la obtención de los datos del presente estudio.

3.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La detección molecular de los patógenos considerados en el presente estudio se llevó a cabo mediante PCR y/o RT-PCR basados en modificaciones del método reportado por Sykes et al., 2001. Además de los ajustes en las condiciones de extracción de ácidos nucleicos y de la PCR y RT-PCR, las modificaciones consistieron en el uso de oligonucleótidos adicionales para la detección de *Mycoplasma* spp y el empleo de los oligonucleótidos diseñados en el presente estudio para detectar al FCV ante la ausencia de amplificación con los oligonucleótidos reportados previamente. Los oligonucleótidos fueron diseñados con el uso de las secuencias genómicas completas del FCV publicadas en el “GenBank” con la ayuda del programa Primer Select / DNSTAR v.15 y el programa NCBI/Primer- BLAST.

3.9. EXTRACCIÓN DE DNA

Los ácidos nucleicos totales de las muestras clínicas se obtuvieron mediante la unión a gel de sílice siguiendo las recomendaciones el estuche comercial “QIAamp® Ultrasens® Virus Kit” (www.qiagen.com). El volumen de inicio de la muestra fue de entre 800 a 1200 µl dependiendo de las condiciones de las mismas. Todas las etapas del protocolo fueron llevados a cabo a una temperatura de 22 a 25°C. El volumen final de elución fue de 50 µl en agua tratada con dietil pirocarbonato grado de biología molecular (UltraPure™ DEPC-Treated Water Invitrogen™, EEUU). Para cada una de las muestras a partir de 1 µl se calculó la concentración de ácidos nucleicos totales mediante espectrofotometría a un rango de absorbancia de A260/A280 (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, Biotek; EEUU, www.biotek.com). Las muestras cuantificadas fueron conservadas a –70° C hasta su uso en las reacciones de PCR y/ RT-PCR.

3.10. PRIMERS

La determinación de las secuencias genéticas de los patógenos considerados en el presente estudio fue llevada a cabo con el uso de oligonucleótidos dirigidas hacia regiones genéticas conservadas de los respectivos agentes infecciosos ya sea reportados previamente o diseñados en el presente estudio como es el caso del FCV. Todos los

oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Eurofins/Genomics (<https://www.eurofinsgenomics.com>) a través del distribuidor comercial Silvera Ciencia e Ingeniería, SA de CV (<https://silveracei.com.mx>). En la tabla 1 se muestran las secuencias, nombre, región genética y otras características de los oligonucleótidos usados.

3.11. PCR MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN DE FHV-1, MYCOPLASMA SPP, Y CHLAMYDOPHILA FELIS.

La amplificación de las secuencias blanco de FHV-1, Mycoplasma spp, y Chlamydomphila felis se llevó a cabo con la ayuda del estuche comercial Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen, www.lifetechnologies.com). La reacción se ensayó en un solo tubo en un volumen total de 25 µl, con la mezcla de oligonucleótidos HerpF- HerpR, Chla F-ChlaR y MW28-MW29 y reactivos (Platinum® PCR SuperMix (22 U/ µl de Taq DNA polimerasa unida un anticuerpo anti-Taq Platinum®, 22mM Tris-HCL [pH 8.4], 55mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM de cada dNTP) del estuche. En primera instancia se realizó una PCR en gradientes de temperatura para determinar la temperatura optima de unión de los oligonucleótidos. Las temperaturas analizadas fueron 50.2, 52.4, 53.4, 55.3, 56.0, 57.0, 58.5, 58.9, 59.4 grados Celsius. Ante la consistencia en la amplificación para Herpesvirus felino-1, Mycoplasma spp, y Chlamydomphila felis de los controles positivos las condiciones seleccionadas fueron de 40 ciclos de 1 minuto a 91 ° C, 1 minuto a 56 ° C y 1 minuto a 72 ° C, después de un período de desnaturalización inicial de 5min a 95 ° C. Todos los ciclos de temperatura para el PCR de gradientes y PCR sucesivos fueron ejecutadas en un termociclador de gradientes automático (MAXYGEN Thermal Cycler, AXYGEN Scientific, Inc.). Los amplicones generados en las reacciones de PCR fueron evidenciados mediante separación electroforética a 100V, 40mA, durante 40 minutos en gel de agarosa al 1.5% elaborado con solución amortiguadora de Tris-acetato-EDTA (TAE). La determinación del tamaño del ADN copia (ADNc) fue establecido al comparar los productos de la PCR contra un marcador de peso molecular (100 bp ladder DNA marker, Axygen Biosciences) previa visualizados con una cámara de luz ultravioleta y con la ayuda del programa MultiDoc-It™ Imaging System (www.uvp.com) para el registro de la imagen.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en RT-PCR/PCR para detectar al Herpesvirus Felino-1 (FHV-1), Calicivirus Felino, (FCV), *Mycoplasma spp* y *Chlamydomphila felis* a partir de exudados nasales, faríngeos y oculares de gatos domésticos afectados por el Complejo Respiratorio Felino.

Patógeno (región genética)	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (1)	Fuente
FHV-1 (Timidina quinasa)	HerpF HerpR	GACGTGGTGAATTATCAGC CAACTAGATTTCCACCAGGA	292	Sykes et al., 2001
FCV (Proteína de cápside)	CalcapF CalcapR	TTCGGCCTTTTGTGTTCC TTGAGAATTGAACACATCAATAGATC	673	
<i>C. felis</i> (ompA)	Chla F Chla R	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG CAAGATTTTCTAGACTTCATTTTGT	1069	
<i>Mycoplasma spp.</i> (16S ARNr)	MW28 MW29	CCAGACTCCTACGGGAGGCA TGCGAGCATACTACTCAGGC	580	Hotzel & Sachse 1998
FCV (Proteína de cápside)	FCV-8F ⁽²⁾ FCV-8R ⁽²⁾	CACSTTATGTCYGACACTGA CTRGADGTRTGCARRATT	955	Henzel et al.,2012
FCV (ORF 1-2)	CalFel-1F ⁽²⁾ CalFel-2R ⁽²⁾	WVYGGYGYRGADRCGCG CHTCNAYNGANCCNGACC	730	Presente estudio

1: Tamaño de banda del amplicón en pares de bases

2: Oligonucleótidos degenerados, las letras se refieren a: D (A/C/T), H (A, C, T), N (A, C, G, T), R (A/G), S (C/G), V (A, C, G), W (A, T) e Y (T/C) según corresponda.

FHV-1: Herpesvirus Felino-1, FCV: Calicivirus felino, *C.felis*: *Chlamydomphila felis*

3.12. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR) PARA LA DETECCIÓN FCV EN MUESTRAS CLÍNICAS.

La generación la copia de ADN copia (cDNA) de la secuencia blanco del FCV fue llevada a cabo con el uso de hexámeros aleatorios (Applied Biosystems™ Random Hexamers [50 µM]) y con la ayuda del estuche comercial SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, www.lifetechnologies.com), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Similar a la PCR para FeHV-1, se realizó una PCR de gradientes de temperatura como es descrito en el apartado 5.2.4.3, al inicio de los experimentos el cDNA total obtenido se incorporó a los ensayos de PCR múltiple (para la detección de múltiple de Herpesvirus felino-1, *Mycoplasma spp*, y *Chlamydomphila felis*, en una sola reacción) sin embargo ante la ausencia de amplificación se optó por realizar la amplificación del FCV de forma independiente. El cDNA fue sintetizado 20 µl de solución total conteniendo 3 µl de ARN (aproximadamente 100 ng), 100 ng de cebadores aleatorios, buffer 10X de transcriptasa inversa (RT), MgCl₂ 25 mM, dNTP 10 mM, DTT 0.1 Mm, 40 U RNaseOUT y 200 U RT (SuperScript™ III RT - Invitrogen). Subsecuentemente el cDNA fue usado en una PCR y

PCR anidado como se describe previamente en 5.2.4.3 para detectar las secuencias genéticas del FCV. La temperatura óptima de unión de oligonucleótidos fue establecida en 50°C realizándose todos los ensayos a 25 µl de volumen final.

3.13. CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO

Los controles positivos consistieron en ADN extraído de las vacunas comerciales Felocell® 3 (Zoetis, <https://www.zoetis.mx>), cepa vacunales de FeHV [$10^{6.2}$ TCID_{50%}], FCV [$10^{6.7}$ TCID_{50%}] Feligen® C.R.P. (Virbac, <https://mx.virbac.com>) FeHV [$10^{4.6-6.6}$ TCID 50%], FCV [$10^{3.7-4.5}$ TCID_{50%}] y Purevax® RCPCh (Boehringer Ingelheim Animal Health-Merial) FeHV-1, FCV y *Chlamidophila felis*.

No fue posible contar con controles positivos para *Mycoplasma spp.* y los resultados positivos de estos casos fueron considerados cuando se generó el tamaño de banda esperado reportado en la literatura (Hotzel & Sachse 1998; Spargser et al., 2002).

Los controles negativos consistieron en agua doble destilada la cual fue usada en todas las reacciones.

3.14. MÉTODO ESTADÍSTICO

La cantidad de muestras para analizar se obtuvo mediante un muestreo multi-etapa en la cual se consideraron las clínicas del área metropolitana de Monterrey, N.L. como unidad de muestreo y los gatos con problemas respiratorios los especímenes a estudiar. La cantidad de clínicas y especímenes se determinaron con el programa WinEpi® (Balcázar et al., 2006), tomando como base la N de Clínicas aquellos registrados en la Asociación de Clínicas del área metropolitana.

Debido a que en las clínicas del área metropolitana de los municipios del área metropolitana no tienen una distribución homogénea se realizó un estudio multi-etapa para establecer el número de muestras a obtener por clínica, aplicando la fórmula de efecto de diseño que minimiza la desviación estándar entre las poblaciones con un nivel de confianza del 95% y una prevalencia esperada del 50% debido a que no existen datos previos de la presencia de estos virus en la población de gatos del área metropolitana de Monterrey, N.L.

Se aplicó la siguiente fórmula de efecto de diseño para minimizar la desviación estándar entre las poblaciones (Magaña et al., 2005).

$$D = \frac{n}{\sqrt{NZ^2 * pq}} \sqrt{Nd^2 + Z^2 * pq}$$

Dónde: n = tamaño de la muestra; D = efecto de diseño; N = tamaño de la población (gatos consultados por unidad); Z = valor de la tabla de Z con un nivel de confianza del 95% (1.96); p = prevalencia esperada (0.50); $q=1-p$; d = precisión.

La variable del estudio fue la presencia o ausencia de secuencias genéticas del FHV-1, Calicivirus felino, *Chlamydomphila psittaci* y *Mycoplasma* spp. en gatos domésticos con CRF. Al no encontrar información previa publicada acerca de su presencia en gatos domésticos de México, la frecuencia molecular se estableció mediante la fórmula.

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{Gatos positivos a secuencias genéticas del patógeno}}{\text{Gatos afectados por Complejo Respiratorio Felino}} \times 100$$

Para los cálculos se empleó un nivel de significancia de $P > 0.05\%$ usando el paquete computacional WinEpi® (de Blas et al, 2006)

Mediante análisis de Chi-cuadrada se determinó el grado de asociación entre la presencia de secuencias genéticas (mono o co-asociados) de los patógenos considerados en el presente estudio con los datos proporcionados en las encuestas por los Médicos Veterinarios / dueños de mascotas afectadas. El criterio fue que si el valor de P fue mayor a 0.05 ($P > 0.05$) se consideró que no hubo asociación, pero si valor obtenido fue menor a 0.05 ($P < 0.05$) se estimó que si hubo asociación entre el factor de riesgo y la presencia de los patógenos. Subsecuentemente, se realizó un análisis multivariado en el cual solo se incluyeron los resultados de mayor significancia acorde a los resultados de Chi-cuadrada para luego mediante regresión logística calcular la razón de momios (Odds ratio) de todos

y cada uno de factores detectados como significantes. Para los cálculos se empleó un nivel de significancia de $P > 0.05\%$ usando el paquete computacional WinEpi® (de Blas et al, 2006) y SPSS® Statistics (www.ibm.com/).

4. RESULTADOS

4.1. FRECUENCIA MOLECULAR DE FEHV-1, *MYCOPLASMA SPP* Y FCV EN GATOS DOMÉSTICOS CON COMPLEJO RESPIRATORIO FELINO.

La puesta a punto de la PCR y/o RT-PCR para la detección múltiple de secuencia genéticas de patógenos asociados a CRF presento una serie de inconvenientes. Las vacunas usadas como controles positivos, que establecen en sus contenidos la presencia cepas activas modificadas de FeHV-1 y FCV (Feligen® y Felocell® 3) y *Chlamidophila felis* (Purevax®) no fueron consistentes en sus resultados. Los experimentos de puesta a punto implicaron uso de diferentes lotes de vacunas, mezcla de vacunas, además de las modificaciones inherentes para su ajuste desde la extracción de los ácidos nucleicos y concentración de oligonucleótidos y otros componentes como el Mg⁺⁺ hasta la experimentación de diferentes temperaturas de unión de oligonucleótidos, entre otros. Al final de los experimentos las condiciones seleccionadas fueron: 40 ciclos de 1 minuto a 91 ° C, 1 minuto a 56 ° C y 1 minuto a 72 ° C para la detección de los patógenos exceptuando a FCV. En la Figura 2 se muestra los amplicones generados con las condiciones señaladas a partir de cada una de las cepas vacúnales empleadas.

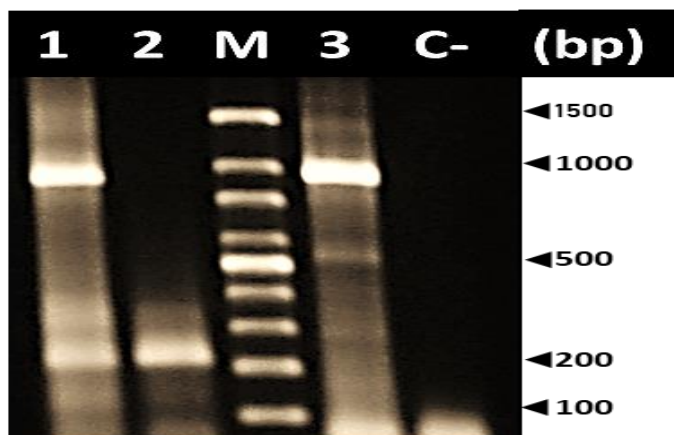


Figura 2. Productos de PCR generados a partir de las vacunas empleadas como controles positivos. 1: Felocell®, Zoetis; 2: Feligen® C.R.P., Virbac; 3: Purevax® RCPCCh, Merial. M: marcador de peso molecular, C-: Control Negativo (H₂O), bp: pares de bases.

Conforme al procedimiento y métodos empleados, en la tabla 2 se muestra la relación de los resultados positivos a secuencias genéticas para FeHV-1, *Mycoplasma spp* y FCV en gatos domésticos afectados con complejo respiratorio felino. Según los criterios establecidos, un total de 91 (70%) de las 130 muestras clínicas resultaron positivas a la presencia de amplicones de uno o más de los patógenos seleccionados en el presente trabajo. De los casos positivos FeHV-1 apareció como el agente infeccioso de mayor frecuencia detectado ya sea de forma individual con 67 (51.5%), combinada con *Mycoplasma spp* (67 + 3/ 91) o con FCV (67+2 /91). Es decir, amplicones del tamaño esperado para FeHV-1 se detectaron en el 82.8% de las muestras positivas (72/91) y en el 55.4 % de los gatos afectados por CRF. Secuencias genéticas compatibles por el tamaño de banda de *Mycoplasma spp* se detectaron en un total de 21 (16.2%) casos en las 130 muestras. Solo 18 muestras resultaron positivas a amplicones de *Mycoplasma spp* y negativos a cualquier otro patógeno. Tomando en cuenta lo anterior, secuencias genéticas de *Mycoplasma spp* fueron encontradas en el 19.8% (18/91) de los casos positivos. La combinación de amplicones de *Mycoplasma spp* y FeHV-1 se observó en 3 casos y para la combinación de *Mycoplasma spp* y FCV no se detectaron. En la figura 5 se muestran 3 casos clínicos de gatos domésticos afectados por CRF que resultaron positivos para amplicones de FeHV-1 (Figura 5A), FeHV-1 + *Mycoplasma spp* (Figura 5B) y FeHV-1 + FCV (Figura 5C).

Tabla 2. Relación de la positividad a secuencias genéticas de patógenos selectos involucrados con Complejo Respiratorio felino en gatos domésticos del área metropolitana de Monterrey, N.L, México.

	FeHV-1	<i>Mycoplasma spp</i>	FCV ⁽¹⁾	Totales
FeHV-1	67	--	--	67
<i>Mycoplasma spp</i>	3	18	--	21
FCV	2	0	1	3
	72	18	1	91

(1) Solo fue posible analizar 18 muestras para detectar la presencia del FCV.

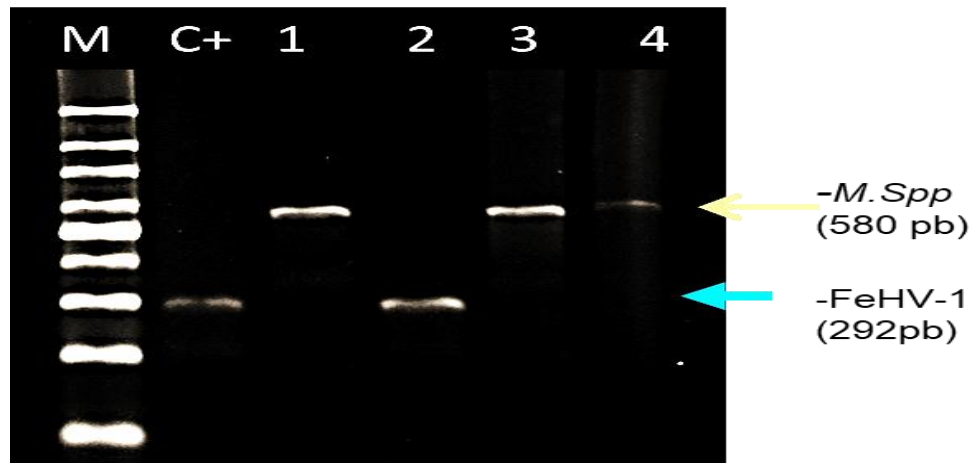


Figura 3. PCR múltiple para la detección de secuencias genéticas de patógenos asociados al Complejo Respiratorio Felino (CRF) en gatos domésticos del área metropolitana de Monterrey, N.L. En la imagen se muestran 4 casos clínicos selectos que amplifican para FeHV-1 y *Mycoplasma spp* en distintos gatos con CRF. M: marcador de peso molecular, C +: Control positivo. 1-4 muestras clínicas.

Para el caso del FCV, y debido a las inconsistencias en los resultados observados en la RT-PCR, solo fue posible analizar 18 muestras de las cuales solo 11 arrojaron resultados consistentes. En la figura 4 se muestra los productos de RT-PCR y PCRn obtenidos con el uso de la vacuna Felocell® (Zoetis) y la combinación de los oligonucleótidos FCV-8F / FCV-8R (Henzel et al.,2012) + CalFel-1F / CalFel-2R (presente estudio) y FCV-8F / FCV-8R (Henzel et al.,2012) + CalcapF / CalcapR (Sykes et al., 2001). De las 11 muestras solo 3 (27.7%) fueron consideradas como positivas. En 2 de estos casos clínicos (18.2%) se observó la combinación con FeHV-1 (Figura 5C) y en ningún caso en conjunción con *Mycoplasma spp*. En la tabla 2 se muestran los resultados positivos a FeHV-1, *Mycoplasma spp* y FCV en gatos domésticos afectados con CRF del área metropolitana de Monterrey, N.L. En los análisis de PCR, ya sea de gradiente o de punto final, no se encontraron amplicones con tamaño de banda sugerentes de *Chlamidophila felis* / *Chlamidia psittacci* ya sea partir de los controles vacunales y o de las muestras clínicas. Acorde al sexo del animal la frecuencia de secuencias genéticas se distribuyó de manera homogénea, pero con ligero aumento de machos positivos para todos los patógenos. Para

FeHV-1 46 machos y 26 hembras resultaron positivos ya sea como infección única o combinada mientras que 13 y 8 lo fueron para *Mycoplasma spp.* Aunque fue mayor el número de casos positivos en machos para cualquiera de los patógenos no se observó diferencia estadística significativa ($P>0.05$).

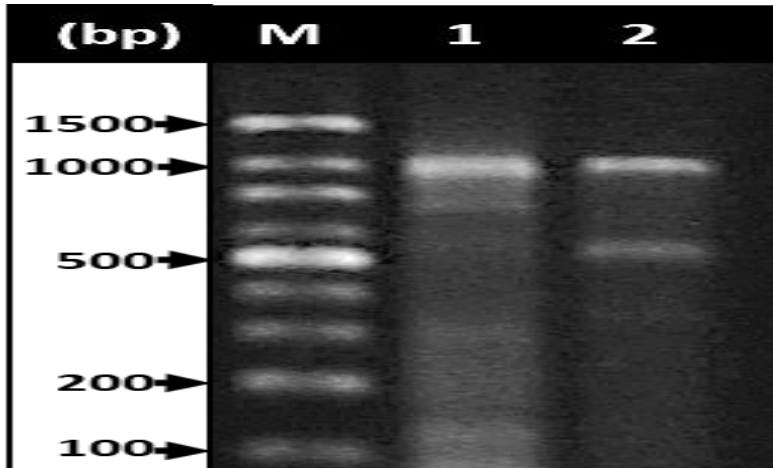


Figura 4. RT-PCR y PCRn para amplificación de secuencias genéticas del Calicivirus Felino (FCV) originados a partir de la vacuna Felocell® (Zoetis) y la combinación de los oligonucleótidos (1): FCV-8F/FCV-8R + CalFel-1F / CalFel-2R y (2): FCV-8F/FCV-8R + CalcapF/CalcapR. M: marcador de peso molecular; (bp): pares de bases.

En cuanto a las características clínicas registradas en los gatos afectados por CRF se observó una amplia variación (Tabla 3). La signología clínica fue muy variables en su presentación individual o combinadas exteriorizándose una frecuencia mayor de fiebre, pérdida de peso y secreción ocular seguida de secreción nasal y oral, síntomas nerviosos y conjuntivitis asociados a las secuencias genéticas de FeHV-1 (Figura 5 A) y de letargia, pérdida de peso, estornudos e inapetencia para la detección de *Mycoplasma spp.* (Figura 5 B). Aunque fue mayor la frecuencia de ciertas condiciones clínicas para ya sea FeHV-1 y *Mycoplasma spp.*, no se observó diferencia estadística significativa ($P>0.05$) para condición alguna para ambos patógenos. Los 3 gatos positivos a secuencia genéticas de FCV mostraron ulceración en cavidad bucal, conjuntivitis, secreción oral y ocular, así como fiebre (Figura 5 C). En la tabla 3 se muestra la relación entre la condición clínica detectada en los animales positivos a secuencias genéticas de los patógenos seleccionados y

detectados. En la figura 6 se muestra una representación gráfica de la frecuencia del cuadro clínicos con la presencia del FeHV-1 y *Mycoplasma spp.*




	<p>A) Felino doméstico criollo positivo a amplicones de FeHV-1 con un curso de 3-5 días, fiebre e inapetencia, leve secreción nasal y ocular. Queratoconjuntivitis y letargia y disnea.</p>
	<p>B) Gato doméstico cruza de raza Siamés positivo a la presencia de secuencias genéticas de FeHV-1 + <i>Mycoplasma spp.</i> Queratitis y conjuntivitis severa, secreción nasal y ocular mucopurulenta. Letargia, pérdida de peso y estornudo ocasional y curso aparente de 10 a 15 días. Distres respiratorio patente.</p>
	<p>C) Felino criollo con distrés respiratorio agudo y positivo a FeHV-1 + FCV. Mostró ulceración extensiva en lengua y cavidad bucal, sialorrea profusa y queratitis seca con secreción nasal purulenta moderada.</p>

Figura 5. Características clínicas de gatos domésticos afectados por Complejo Respiratorio Felino en el área metropolitana de Monterrey, N.L. La signología observada fue ampliamente variable en tanto en casos positivos como en negativos y reconocida por Médicos Veterinarios Zootecnistas responsables de cada caso (N=130) durante octubre 2018 a junio 2019.

Tabla 3. Relación entre la condición clínica ⁽¹⁾ detectada en los gatos positivos a secuencia genéticas de FeHV-1, *Mycoplasma spp* y FCV.

Condición clínica	FeHV-1		<i>Mycoplasma spp</i>		FCV	
	Si	No	Si	No	Si	No
Estornudos	52	20	12	9	0	3
Inapetencia (anorexia)	60	12	11	10	2	1
Tos	48	24	6	15	2	1
Conjuntivitis	66	6	4	17	3	0
Secreción ocular	70	2	8	13	3	0
Secreción nasal	66	6	10	11	2	1
Secreción oral	68	4	4	17	3	0
Queratitis	7	65	2	19	2	1
Ulceración oral / lingual	22	50	4	17	3	0
Fiebre	70	2	11	10	3	0
Postración	68	4	2	19	0	3
Letargia	58	14	19	2	2	1
Diarrea	6	66	11	10	1	2
Pérdida de peso	70	2	15	6	2	1

(1) Cantidad de gatos domésticos observados: FeHV-1 (N=72), *Mycoplasma spp.* (N=21) y FCV (N= 3). Oligonucleótidos contra *Chlamydomphila felis* fueron incorporados en las reacciones de PCR múltiple no observándose reacción positiva.

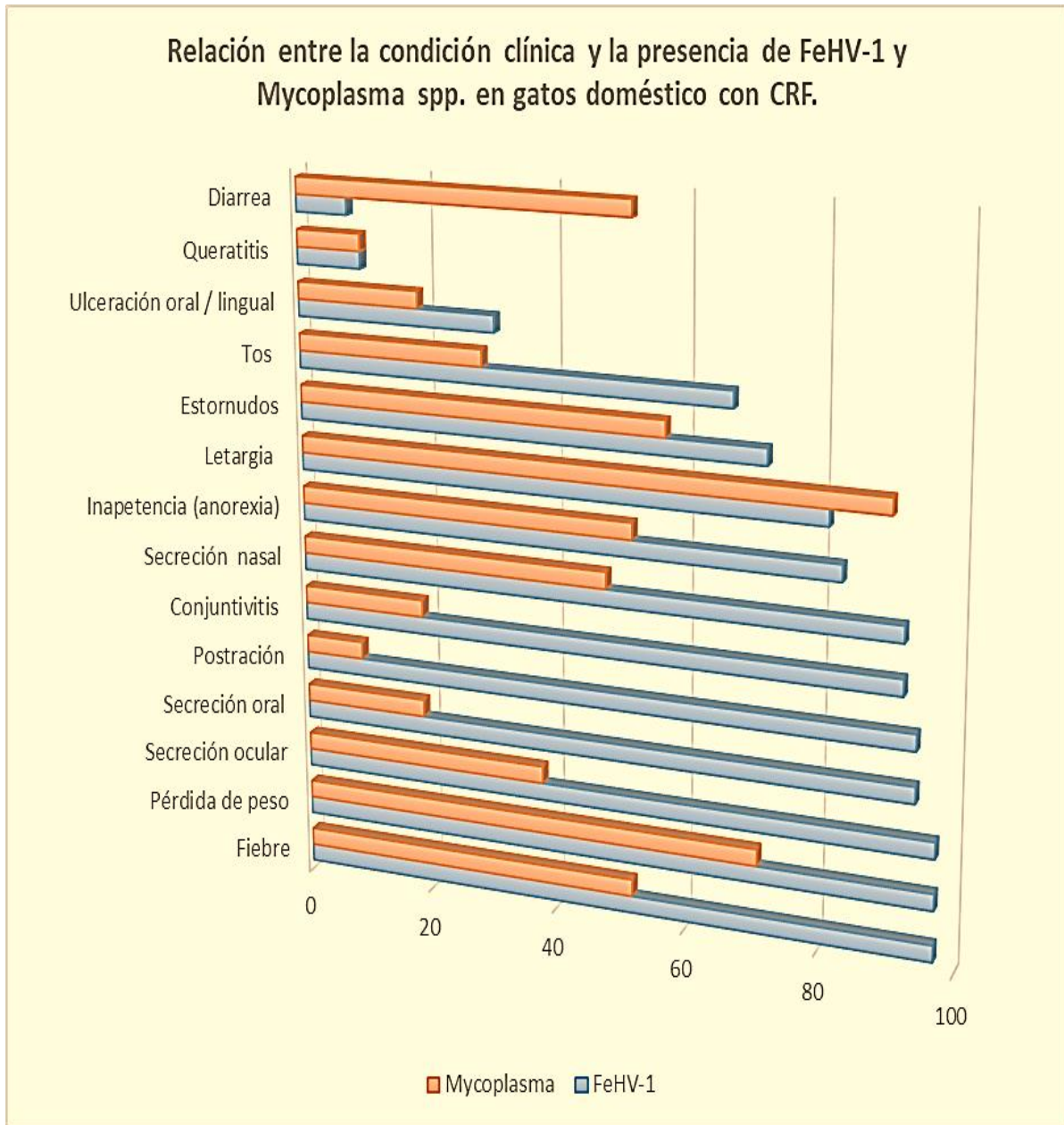


Figura 6. Relación entre la condición clínica de gatos afectados por Complejo Respiratorio Felino y la detección molecular de FeHV-1 y *Mycoplasma* spp. La relación es mostrada en proporciones del total de gatos positivos a FeHV-1 (n:72) o *Mycoplasma* spp. (n: 21)

4.2. FACTORES DE RIESGO PARA LA PRESENTACIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAS de FeHV-1, *Mycoplasma spp* y FCV EN GATOS DOMÉSTICOS AFECTADOS POR CRF DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY N.L.

Los factores de riesgo asociados a la presencia de secuencias genéticas de FeHV-1 y *Mycoplasma spp* fueron analizados a partir de los 130 gatos afectados con CRF. Para el caso de FCV y de *Chlamidophila felis/Chlamidia psittaci* no fue posible estimarlos dado en bajo número de casos analizados o ausencia de positividad en la detección molecular.

En el presente estudio se evaluó el historial de vacunación, el sexo, la edad y otros parámetros que se incluyeron en la encuesta realizada a los propietarios de los felinos. De los parámetros analizados cinco fueron factores de riesgo significativos para la presentación del FeHV-1 (Tabla 4) y cuatro para *Mycoplasma spp.* (Tabla 5) en los gatos domésticos. Los factores de riesgo asociados ($P < 0.05$) a Herpesvirus felino-1 fueron, en orden decreciente, los gatos que cohabitaban con otros gatos dentro de su hogar (OR: 4.9, IC: 95%, 1.535-15.781), los gatos con acceso al exterior (calle) del hogar (OR:3.1, IC:95%,0.8-5.2), los gatos machos (OR: 1.4, IC: 95%, 0.6-3.0) y gatos con edades menor de un año de edad (OR: 1.4, IC: 95%, 0.7-2.8). Una asociación negativa entre la positividad a FeHV-1 y el factor de riesgo fue observada para los gatos vacunados (OR:0.4, IC:95%, 0.2-1.0), edad mayor a un año (OR:0.6, IC:95%,0.3-1.3), las gatas (OR:0.7, IC: 95%, 0.3-1.5), gatos con peso mayor a 2 kilogramos (OR:0.7, IC: 95%, 0.3-1.7), gatos que habitan en el interior de la vivienda (OR:0.7, IC:95%, 0.5-2.4) y gatos desparasitados (OR:0.8, IC: 95%, 0.5-2.4). Los factores de riesgo asociados ($P < 0.05\%$) a la presencia de secuencias genéticas de *Mycoplasma spp.* fueron cuatro y estos se presentaron en los gatos menores de 1 año de edad (OR: 3.4, IC:95%,0.8-7.0), gatos que frecuentan el exterior (calle) del hogar (OR: 3.1, IC:95%,0.9-10.5), gatos con pesos menores a 2 kg (OR: 2.1, IC:95%,0.5-8.0) y las hembras (OR: 1.2, IC:95%,0.4-3.4). Como factores de protección para *Mycoplasma spp* se observó para gatos mayores de 2 kg (OR: 0.47, IC: 95% 0.1-1.7), animales mayores de un año (OR: 0.43, IC: 95% 0.1-1.2) y los felinos machos (OR: 0.77, IC: 95% 0.2-2.1).

Tabla 4. Factores de riesgo significantes para la presencia secuencias genéticas del FeHV-1 en gatos domésticos afectados con CRF en el área metropolitana de Monterrey, N.L.

Variable	χ^2	Odd Ratio	IC95%	Valor de P
Macho	0.98	<u>1.44</u>	0.687-3.00	0.21
Hembra	0.65	<u>0.74</u>	0.359-1.531	0.266
Edad < 1 año	1.09	<u>1.44</u>	0.725-2.885	0.192
Edad > 1 año	1.07	<u>0.69</u>	0.348-1.385	0.194
Peso < 2 kg	0.15	<u>1.18</u>	0.518-2.703	0.425
Peso > 2 kg	0.37	<u>0.77</u>	0.343-1.758	0.344
Exterior	2.01	<u>3.10</u>	0.803-5.281	0.033
Interior	2.01	<u>0.79</u>	0.512-2.495	0.033
Cohabitación	8.28	<u>4.92</u>	1.535-15.781	0.0004
Vacunación	3.26	<u>0.48</u>	0.216-1.072	0.0054
Desparasitación	0.3	<u>0.8</u>	0.360-1.778	0.365

Tabla 5. Factores de riesgo selectos significantes para la presencia secuencias genéticas del *Mycoplasma spp* en gatos domésticos con signología compatible a CRF del área metropolitana de Monterrey, N.L.

Variable	χ^2	Odd Ratio	IC95%	Valor de P
Macho	0.23	0.77	0.278-2.163	0.406
Hembra	0.16	1.23	0.445-3.445	0.445
Edad < 1 año	3.01	3.48	0.869-7.076	0.009
Edad > 1 año	3.01	0.43	0.152-1.240	0.009
Peso < 2 kg	1.28	2.12	0.563-8.052	0.204
Peso > 2 kg	1.28	0.47	0.124-1.777	0.204
Exterior	3.81	3.17	0.955-10.538	0.04
Interior	3.81	0.31	0.095- 1.047	0.04
Cohabitación	1.08	0.57	0.199-1.646	0.22
Desparasitaciones	0.006	0.96	0.333-2.770	0.58

5. DISCUSIÓN

El complejo respiratorio Felino (CRF) es síndrome de amplia distribución mundial con fuertes repercusiones en la salud y bienestar del gato doméstico. La presentación del CRF es el resultado de una compleja interacción de factores que incluyen agentes infecciosos, la salud e inmunidad del animal y el manejo o condiciones del medio ambiente. Los agentes infecciosos y los factores de riesgo en la presentación clínica del CRF son múltiples y pueden concurrir de manera independiente o combinada (Binns S.H. et al., 2000).

Generalmente se considera que los patógenos virales son los principales agentes detonantes del CRF usualmente evitado, bloqueando o alterando la respuesta inmune innata y adaptativa ya sea al inicio de la infección, reactivación o durante la presentación clínica (Gaskell et al., 2007, Radford et al., 2007). Situación similar se observa en el Complejo Respiratorio Bovino / Fiebre de Embarque (CRB / FE) (Kumar et al., 2018) y en Complejo Respiratorio Canino (CRC) (Day, M.J. et al., 2020). En México no existen datos epidemiológicos del CRF, en el área metropolitana de Monterrey, N.L. su presencia se deduce a partir de los casos clínicos de infección respiratoria, los cuales son muy frecuentes en temporada invernal, en gatos remitidos a consulta (comunicación personal MVZ Mario Alberto Elizondo Lozano, Clínica Veterinaria Privada y personal Médico Veterinario de la Clínica de Pequeñas Especies de la FMVZ –UANL) no obstante, se desconoce cuáles son los agentes etiológicos involucrados así como su distribución, factores de riesgo y efectos en la población de gatos domésticos. Durante el periodo de estudio la mayor cantidad de muestras positivas fueron colectadas en el periodo invernal, coincidiendo los parámetros analizados en lo general con lo reportado por otros investigadores (Schulz et al., 2015; Holz et al., 2010).

En el presente trabajo, se observó que una proporción del 70% de gatos con problemas respiratorios resultaron positivos cuando a menos a uno de cinco patógenos analizados, lo cual confirma que los agentes infecciosos detectados juegan un papel muy importante en la presentación clínica del CRF (Lister et al, 2015). Es probable que el manejo de la muestra, dificultades para poner a punto el diagnóstico molecular, variaciones de nucleótidos en los sitios de unión de los oligonucleótidos, cepas locales no reactivas al RT-

PCR o PCR o la presencia de otros patógenos no incluidos en el estudio contribuyeron para que no se detectaran agentes infecciosos en 39 de las 130 muestras analizadas (Lister et al, 2015; Abd-Eldaim et al,2009).

Dado lo anterior, es importante considerar aumentar el espectro de agentes infecciosos involucrados recientemente en alteraciones respiratorias de felinos, y dado el contacto entre humanos y gatos doméstico, principalmente aquellos con potencial zoonótico como los virus de la Influenza A (IFA) o el Coronavirus del Síndrome Agudo Respiratorio tipo 2 (SARS-CoV-2), entre otros (Belser et al, 2017, Ibrahim et al 2016, Diakoudi et al., 2019, Stephen et al 2012, Stout et al, 2020; Lee et al., 2017). Secuencias genéticas del FeHV-1 fueron detectadas en el 82.8% de las muestras positivas y en el 55.4% del total de los gatos con CRF, cifras que contrastan con otros estudios (Sykes et al 1999, Fernández et al 2017), probablemente variaciones en el proceso de diagnóstico o condiciones locales de medio ambiente influyeron en estos resultados (Lister et al., 2015). Sin embargo, el presente estudio sugiere en el área metropolitana el FeHV-1 ha sido sub-diagnosticado (Sykes et al 1997), por la comunidad de veterinarios y por lo tanto sería de relevancia de esclarecer el rol de este virus en el CRF de gatos del área.

Por otra parte, y en contraste, de las muestras analizadas con el uso de oligonucleótidos y condiciones reportados para amplificación y ajustes al proceso de detección molecular no fue posible encontrar secuencias genéticas de *Chlamidophila felis/Chlamidia psittaci* lo cual puede estar sujeta bajo las mismas consideraciones epidemiológicas discutidas para FeHV-1. La ausencia o baja frecuencia de C.felis está acorde a los resultados de otros estudios similares (Gourkow et al., 2013; Lister et al., 2015, Halánová et al., 2019, Rodolakis et al., 2010). Por lo que, podría ser importante considerar estos resultados dado el potencial zoonótico que representan las clamidias, especialmente en animales de compañía así que es necesario confirmar estos datos en vista de la baja prevalencia de este patógeno a nivel mundial (Cai et al., 2001; Rodolakis et al., 2010; Sykes et al 1999, Willis 1986). Recientemente, Halánová, et al reportaron, que los gatos callejeros y gatos de criaderos podrían constituirse como una fuente potencial de contaminación de C.felis (Halánová et al., 2019). No obstante, la prevalencia de FHV-1 y *Mycoplasma* spp. en este

estudio concuerdan con lo reportando en otros países (Gourkow et al., 2013; Fernandez et al., 2016; Berger et al., 2015) en el caso de FHV-1 manteniéndose en un 50% y para *Mycoplasma* spp. por arriba del 3% (Nakanishi et al., 2018), por lo que es probable que condiciones locales o condiciones no previstas contribuyeron a estas observaciones del presente estudio.

En condiciones naturales, y dado los mecanismos de patogenicidad y persistencia de los patógenos considerados, es racional suponer que los animales con CRF al momento de consulta usualmente cursan con infecciones múltiples y ya que las co-infecciones en gatos que se presentan a consulta son muy comunes (Fernandez et al., 2017), es importante considerar situación, en este sentido el tratamiento debe de basarse según el o los patógenos involucrados. En este estudio solo tuvimos 3 casos (2%) de co-infección por FHV-1 - *Mycoplasma* spp. lo cual contrasta con un estudio realizado por Nguyen et al., en el año 2018 en Australia que encontraron una prevalencia mayor 60/300 gatos (20%) (Nguyen et al., 2018). Cifras muy similares fueron observadas en la combinación FeHV-1 y FCV, pero dado las inconsistencias en la amplificación del FCV en las muestras nuestra discusión al respecto está muy limitada. Dado la estrecha asociación del gato domestico con el humano, sería interesante ampliar la lista de patógenos primarios virales o bacterianos involucrados en CRF especialmente aquellos con potencial zoonótico como Influenza (Belser et al., 2017, Lee et al 2017), Coronavirus (Halfman et al 2020, Shi et al., 2020, Stout et al., 2020) o *Bordetella bronchiseptica* (Cohn, 2011; Lister et al., 2015).

En el presente estudio, la detección molecular del FCV en las muestras fue muy complicada, el ensayo con diferentes vacunas comerciales (como controles positivos), diferentes condiciones en la RT-PCR (como temperatura de alineamiento, numero de ciclos) y el uso de hexámeros aleatorios u oligonucleótidos específicos recomendados fallaron para detectar secuencias genéticas de este virus. Previamente investigadores de Australia reportaron que en la detección molecular del FCV la temperatura de almacenaje de la muestra influye en los resultados y por consecuencia afecta la interpretación epidemiológica de este virus (Sykes et al., 2011). En este sentido, los parámetros e interpretación epidemiológica para FCV podrían contrastaron fuertemente, situación que

se ha sugerido en otros estudios los cuales mostraron alta frecuencia de FCV en gato doméstico (Pereira et al 2018; Ravicini et al., 2016).

El FCV es un virus con genoma de ARN que dado sus mecanismos de replicación y su amplia variación genética ocurre como cuasi-especie en los animales afectados clínicamente, tejidos y cultivos celulares (Bennett et al., 1998, Pesavento et al., 2008). Alineamientos de las secuencias del genoma completo del FCV, realizadas para localizar oligonucleótidos y usarlos en la detección molecular, mostraron muy escasas posiciones conservadas de nucleótidos a lo largo del genoma, predominando regiones muy variables e hipervariables (datos no mostrados) lo cual concuerda a los reportado en estudios previos (Pereira et al., 2018). Dentro de esta gran variación genética es posible que ocurran cambios en los sitios de unión de los oligonucleótidos al genoma viral o que las variantes genéticas reconocidas por los oligonucleótidos ocurran en una muy baja frecuencia en las muestras clínicas, así que estos fenómenos tal vez expliquen la baja frecuencia de detección en las muestras clínicas de los gatos afectados por CRF. Si esto es correcto, es probable que en el área metropolitana circulen cepas virales del FCV que nos son reconocidas por los oligonucleótidos empleados. Por otra parte, la alta variación genética del FCV puede también tener un impacto en el diseño de vacunas y su eficacia para prevenir la infección (Ohe et al 2007; Alfonso et al., 2017).

Esta situación plantea la necesidad de ampliar y profundizar este tipo de trabajos para reconocer el verdadero impacto del FCV en la salud de los gatos domésticos del área metropolitana de Monterrey N.L. Interesantemente de 130 muestras de gatos con problemas respiratorios solo uno presentó signos clínicos relacionados a FCV (Manzanilla et al., 2016). La definición de los factores de riesgo para CRF es un factor muy importante para el control o prevención de este síndrome (Wagner et al 2018). Diversos estudios han abordado esta situación (Fernandez et al 2017, Wagner et al., 2017). De los datos observados, aparentemente el contacto con otros gatos resulta ser un factor de riesgo muy importante para la infección por FHV-1, y entre otras circunstancias, la falta de un protocolo de vacunación adecuado. Esto podría ser explicado y basado en un estudio en el cual aisló en casi un 90% FHV-1 en gatos de la calle (J.K et al. 2008). Exceptuando al FCV, la

frecuencia de detección y factores de riesgo como el contacto entre gatos y el hacinamiento fueron similares entre los hallazgos de este trabajo y un estudio realizado en 218 criaderos de gato doméstico en Europa (Helps et al., 2005). Sin embargo, contrastan fuertemente estos mismos parámetros en centros de rescate de felino en los cuales arrojan las cifras de frecuencia de infecciones y factores de riesgo son más elevados y numerosos, respectivamente (Gourkod et al., 2013; Polak et al., 2014). Por otra parte, para la infección por los patógenos del presente estudio el acceso al exterior se encontró como un factor de riesgo importante, lo cual es similar a lo reportado previamente (Fernandez et al., 2017); esto debe de tenerse en cuenta dada la problemática social de la alta tasa de abandono animal por parte de propietarios lo cual ha derivado en emisión de leyes a fin proteger a los animales, garantizar su bienestar, brindarles atención, buen trato, manutención, alojamiento, desarrollo natural y salud (Gaceta Oficial del Distrito Federal, 2014).

Por otra parte, y aunque no fue analizado en el presente estudio, el origen de los gatos que se llevan a consulta veterinaria un factor importante para establecer la probabilidad de infección a diversos los patógenos por parte de los veterinarios clínicos. Estudios realizados en centros de acaparamiento o refugio animal, que acumulan animales en condiciones de hacinamiento sin una nutrición y cuidado veterinario adecuado se generan las condiciones adecuadas para una alta frecuencia de infección de *Mycoplasma felis*, *Bordetella bronchiseptica*, FCV y FeHV-1 entre otros patógenos no respiratorios (Helps et al., 2005; Hurley K.F. 2005; Polak et al., 2014) de esta manera es importante considerar esta situación dado que favorecen la perpetuación de los agentes infecciosos en el medio ambiente y podrían influir en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y epidemiología de las infecciones de los gatos domésticos del área metropolitana (Gourkow et al., 2013; Pesavento & Murphy, 2014).

6. CONCLUSIÓN

El presente estudio epidemiológico describe por primera vez la presencia y prevalencia molecular de FHV-1, FCV, *Mycoplasma* spp. y *Chlamydophila felis* en gatos domésticos del área metropolitana de Monterrey N.L. El CRF muestra una tendencia estacional aparente, aumentando su frecuencia en invierno y observándose múltiples variantes clínicas, difícil de asociar a patógenos o condición alguna, no obstante, en la población selecta se identificaron algunos factores de riesgo de consideración para la presencia de este síndrome. Los principales factores de riesgo para la presencia de FHV-1 y *Mycoplasma* spp. fueron el acceso al exterior, la edad y el peso. De forma individual, la cohabitación con otros gatos mostró el mayor riesgo asociados a la infección por FHV-1. El sexo de los animales afectados mostró valores contrastantes por un lado los machos tuvieron una mayor propensión para FHV-1 pero las hembras lo tuvieron para *Mycoplasma* spp. La aplicación de vacunas mostró un efecto protector para la presencia de FHV-1. Acorde al método empleado *Chlamydophila felis* no fue detectada en gatos con CRF. La detección molecular del FCV no fue consistente en el estudio. Si bien el diagnóstico molecular es útil para detectar y diferenciar la infección de los patógenos involucrados en CRF es necesario realizar actualizaciones constantes de este proceso de diagnóstico sobre todo FCV y/o virus RNA. Con la información obtenida se deduce que la vacunación tiene un efecto protector contra FHV-1 y tal vez contra *Chlamydophila felis*. Estos datos se deben de tomar en cuenta para la elaboración de programas de control basados en vacunas y bioseguridad y con ellos contribuir al bienestar del gato doméstico.

7. FUENTES BIBLIOGRAFICAS

- Abd-Eldaim, M. M., Wilkes, R. P., Thomas, K. V., & Kennedy, M. A. (2009). Development and validation of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection of feline calicivirus. *Archives of Virology*, *154*(4), 555–560. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0337-5>
- Afonso M., Pinchbeck G.L., Smith S.L., Daly J.M., Gaskell R.M., Dawson S., Radford A.D. (2017). A multi-national European cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity. *Vaccine* *35*(20):2753-2760. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.030>.
- Aiewsakun, P., & Simmonds, P. (2018). The genomic underpinnings of eukaryotic virus taxonomy: creating a sequence-based framework for family-level virus classification. *Microbiome*, *6*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0422-7>
- Alan, D. R., Karen, P. C., Susan, D., Carol, J. P., & Rosalind, M. G. (2007). Review article Feline herpesvirus, *38*, 319–335. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Almeras, T., Schreiber, P., Fournel, S., Martin, V., Nicolas, C. S., Fontaine, C., ... Gueguen, S. (2017). Comparative efficacy of the Leucofeligen™ FeLV / RCP and Purevax™ RCP FeLV vaccines against infection with circulating feline Calicivirus, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1217-y>
- Bank-Wolf, B. R., König, M., & Thiel, H. J. (2010). Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Veterinary Microbiology*, *140*(3–4), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.021>
- Bennett M., McArdle F., Glenn M.A., Turner P.C., askell R.M., Dawson S.,Radford A.D., Williams R. A. (1998). Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *Journal of General*

Virology 79(1): 1-10. DOI:10.1099/0022-1317-79-1-1

Belser, J. A., Pulit-Penaloza, J. A., Sun, X., Brock, N., Pappas, C., Creager, H. M., Zeng, H., Tumpey, T. M., & Maines, T. R. (2017). A Novel A(H7N2) Influenza Virus Isolated from a Veterinarian Caring for Cats in a New York City Animal Shelter Causes Mild Disease and Transmits Poorly in the Ferret Model. *Journal of virology*, 91(15), e00672-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00672-17>.

Berger, A., Willi, B., Meli, M. L., Boretti, F. S., Hartnack, S., Dreyfus, A., ... Hofmann-Lehmann, R. (2015). Feline calicivirus and other respiratory pathogens in cats with Feline calicivirus-related symptoms and in clinically healthy cats in Switzerland. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0595-2>

Binns, S. H., Dawson, S., Speakman, A. J., Cuevas, L. E., Hart, C. A., Gaskell, C. J., Morgan, K. L., & Gaskell, R. M. (2000). A Study of Feline Upper Respiratory Tract Disease with Reference to Prevalence and Risk Factors for Infection with Feline Calicivirus and Feline Herpesvirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2(3), 123–133. <https://doi.org/10.1053/jfms.2000.0084>

Boothe, D.M. 2001. *Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Philadelphia, W.B. Saunders.

Bush, R.M., Everett, K.D. (2001). Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 51:203-220.

Cassell GH, Cole BC. 1981. Mycoplasmas as agents of human disease. *The new england journal of medicine*. 304:80-89.

Cohn, L. A. (2011). Feline Respiratory Disease Complex. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(6), 1273–1289. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.07.006>.

- Conley, M., Emmott, E., Orton, R., Taylor, D., Carneiro, D. G., Murata, K., ... Bhella, D. (2017). Vesivirus 2117 capsids more closely resemble sapovirus and lagovirus particles than other known vesivirus structures. *Journal of General Virology*, 98(1), 68–76. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000658>.
- Lee Ch., Slavinski S., Schiff C, Merlino M., Daskalakis D., Liu D., Rakeman, J.L., Misener M., Thompson C., Leung Y.L., Varma, J.K., FryA., Havers F., Davis T., Newbury S., Layton M.(2017). Outbreak of Influenza A(H7N2) Among Cats in an Animal Shelter With Cat-to-Human Transmission—New York City, 2016, *Clinical Infectious Diseases* 65(11): 1927–1929, <https://doi.org/10.1093/cid/cix668>
- Day, M.J., Carey, S., Clercx, C., Kohn, B., Marsillo, F., Thiry, E., Freyburger, L., Schulz, B., Walker, D.J. (2020). Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe. *Journal of Comparative Pathology* 176: 86-108. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.02.005>.
- Diakoudi, G., Lanave, G., Capozza, P., Di Profio, F., Melegari, Irene., Di Martino, B., Pennisi, M. G., Elia, G., Cavalli, A., Tempesta, M., Camero, M., Buonavoglia, C., Bányai, K., Martella, V. (2019). Identification of a novel parvovirus in domestic cats, *Veterinary Microbiology*, 228: 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.006>.
- Draz, M. S., & Shafiee, H. (2018). Applications of gold nanoparticles in virus detection. *Theranostics*, 8(7), 1985–2017. <https://doi.org/10.7150/thno.23856>.
- Eberle, R., Hayward, G. S., & Roizman, B. (2013). The Order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 154(1), 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>.
- Everett, K. D., R. M. Bush, and A. A. Andersen. (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. And *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*,

including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:415–440.

Everett, K.D., and Andersen, A.A. "Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1999) 49:803-813.

Fernandez M, Manzanilla EG, Lloret A, León M, Thibault J-C. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydomydia felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2017;19(4):461-469. doi:10.1177/1098612X16634387

Foley JE¹, Rand C, Bannasch MJ, Norris CR, ... Milan J. 2002. Molecular epidemiology of feline bordetellosis in two animal shelters in California, USA. *Journal Preventive Veterinary Medicine.* 25;54(2):141-56.

Furtado, M. M., Taniwaki, S. A., de Barros, I. N., Brandão, P. E., Catão-Dias, J. L., Cavalcanti, S., ... Ferreira Neto, J. S. (2017). Molecular detection of viral agents in free-ranging and captive neotropical felids in Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(5), 660–668. <https://doi.org/10.1177/1040638717720245>.

Gaceta oficial de Distrito Federal (2014). Ley de protección de animales del Distrito Federal. ASAMBLEA LEGISLATIVA DEL DISTRITO FEDERAL, VI LEGISLATURA. <http://www.aldf.gob.mx/archivo-1ab9f8a53e4add9904bbfcefdb0a0db9.pdf>

Garbal M , Adaszek Ł , LYP P , Frymus J , Winiarczyk M, ... Winiarczyk S. 2016. Occurrence of *Bordetella Bronchiseptica* in domestic cats with upper respiratory tract infections. 19(2):353-8. doi: 10.1515/pjvs-2016-0043.

Gaskell RM, Bennett M. 1996. Feline *Chlamydia psittaci* infection, in *Feline and Canine Infectious Diseases*. Oxford, Blackwell Science Ltd, pp 21-25.

Gaskell, R., Dawson, S., Radford, A., Thiry, E. (2007) Feline herpesvirus Vet. Res. 38 (2) 337-354 (2007) DOI: 10.1051/vetres:2006063

Gourkow, N., Lawson, J. H., Hamon, S. C., & Phillips, C. J. C. (2013). Descriptive epidemiology of upper respiratory disease and associated risk factors in cats in an animal shelter in coastal western Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 54(2), 132–138.

Greene CE. 1998. Chlamydia infections. *In* Greene CE (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat, ed 2. Philadelphia, WB Saunders. pp 172-173

Halánová, M., Petrová, L., Halán, M., Trbolová, A., Babinská, I., Weissová, T. (2019). Impact of way of life and environment on the prevalence of *Chlamydia felis* in cats as potential sources of infection for humans. *Ann Agric Environ Med.*, 26(2), 222-226. <https://doi.org/10.26444/aaem/100655>

Halfmann, P.J., Hatta M., Chiba S., Tadashi M., Shufang F., Makoto T., Noriko K., Shin-ichiro H., Yuko S.-T., Kiyoko I.-T., Masaki I, Yoshihiro K., (2020). Transmission of SARS-CoV-2 in Domestic Cats. *N Engl J Med.* 383(6): 592-594. DOI: 10.1056/NEJMc2013400.

Helps CR, Lait P, Damhuis A. 2005. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydia felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. *Vet Rec* ; 156: 669–673.

Hentschel J, Mühlradt PF. 1998. Encyclopedia of Immunology. Delves PJ(eds). pp. 1798-1802.

Holst BS, Hanås S, Berndtsson LT. 2010. Infectious causes for feline upper respiratory tract disease – a case-control study. *J Feline Med Surg* ; 12: 783–789.

Hotzel, H., Sachse, K., 1998. Improvement and acceleration of the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia by direct detection of the pathogen using the polymerase chain reaction. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*; 111(7-8):268-72

- Hora, A. S., Toniatti, P. O., Guerra, J. M., Leme, M. C., Pena, H. F. J., Maiorka, P. C., & Brandão, P. E. (2013). Felid Herpesvirus 1 as a causative agent of severe nonsuppurative meningoencephalitis in a domestic cat. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 676–679. <https://doi.org/10.1128/JCM.02462-12>.
- Hoover EA, Kahn DE, Langloss JM. 1978. Experimentally induced feline chlamydia! Infection (feline pneumonitis). *Am J Vet Res* 39:541-547.
- Hurley K. F. (2005). Feline infectious disease control in shelters. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 35(1), 21–37. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.08.002>
- Ibrahim, M., Ali, A., Daniels, J. B., & Lee, C. W. (2016). Post-pandemic seroprevalence of human influenza viruses in domestic cats. *Journal of veterinary science*, 17(4), 515–521. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.4.515>.
- INEGI. Dirección General de Estadísticas Sociodemográficas. Encuesta Intercensal 2015. (www.inegi.org.mx) 2de febrero del 2016
- Key, G. B., & Medicine, V. (1985). Isolation of Felid Herpesvirus I from the Trigeminal Ganglia of Latently Infected Cats, (1985), 391–394.
- Khaled TA, Bassel LL, Melanie L, ... Harness MA. 2016. Cilia-associated bacteri in fatal Bordetella Bronchiseptica Pneumonia of dogs and cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. DOI: 10.1177/1040638716646806.
- Konrad S,*, Patrik M, Kaltenboeck B, Stephensd RS, Kuo CC, Rosselló-Móra R, Horn M. (2015). Emendation of the family Chlamydiaceae: Proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species. Elsevier.

- Koonin, E. V., Dolja, V. V., & Krupovic, M. (2015). Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*(0). doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>.
- Kim, Y., & Chang, K. O. (2018). Fexaramine as an entry blocker for feline caliciviruses. *Antiviral Research*, 152, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.02.009>.
- Kumar, P., Yadav, A., Lokesh., Yadav, R., Kumar, P., Diwakar, R.P. (2008). Bovine Respiratory Disease Complex – A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 7(12): 352-358
- Lappin MR, Blondeau J, Boothe D, Breitschwerdt EB, Guardabassi L, Lloyd DH, Papich MG, Rankin SC, Sykes JE, Turnidge J, ... Weese JC. 2017. Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *J. Vet. Intern. Med.* 31(2): 279–294. doi: 10.1111/jvim.14627.
- Litster A., Wu C.C., Leutenegger C.M., (2015). Detection of feline upper respiratory tract disease pathogens using a commercially available real-time PCR test. *The Veterinary Journal*. 206(2), 149-153. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.001>.
- Le Gall-Reculé, G., Lemaitre, E., Bertagnoli, S., Hubert, C., Top, S., Decors, A., ... Guitton, J. S. (2017). Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Research*, 48(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0473-y>.
- Lee J, Han Y, ... Joo H. 2020. Bordetella bronchiseptica is a potent and safe adjuvant that enhances the antigen presentig capability of dendric cells. *The korean journal of Physiology & Pharmacology*. 24(1): 47–52. doi: 10.4196/kjpp.2020.24.1.47.
- Leirisalo-Repo M. 1993. Are antibiotics of any use in reactive arthritis? *APMIS* 101:575-581.
- Macintire, D.2004. Pediatric Emergencies. *Proceedings:AC-VIM Forum*.

- Manuscript, A., & Magnitude, S. (2013). NIH Public Access, 31(9), 1713–1723.
<https://doi.org/10.1109/TMI.2012.2196707>.
- Martin D, Douglas M., Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases. Bennet J., Blaser J. (eds). pp. 2190-2193.
- Mikalsen, A. B., Nilsen, P., Frøystad-Saugen, M., Lindmo, K., Eliassen, T. M., Rode, M. R., & Evensen, Ø. (2014). Characterization of a novel calicivirus causing systemic infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*L.): Proposal for a new genus of caliciviridae. *PLoS ONE*, 9(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107132>.
- Ming W., Huang SY, Xu MN, Zhou DH, Song HQ, Zhu XQ. 2013. Chlamydia felis exposure in companion dogs and cats in Lanzhou, China: a public health concern. 9:4:104. doi: 10.1186 / 1746-6148-9-104
- Ohe, K., Sakai, S., Takahasi, T. et al. (2007). Genogrouping of Vaccine Breakdown Strains (VBS) of Feline Calicivirus in Japan. *Vet Res Commun* 31, 497 . <https://doi.org/10.1007/s11259-007-3454-1>
- Ohya K, Takahara Y, Kuroda E, Koyasu A, Hagiwara S, Sakamoto M, ... Hisaka M. (2008). *Chlamydophila felis* CF0218 Is a Novel TMH Family Protein with Potential as a Diagnostic Antigen for Diagnosis of *C. felis* Infection. *American Society For Microbiology*. 15 (10): 1606-1615.
- Parker AM, Sheehy P, Hazelton MS, Bosward KL, ... House JK. 2018. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 32(3): 1241–1252. doi: 10.1111/jvim.15135.
- Pereira J.J, Baumworcel N., Fioretti J.M., Domingues C.F., Moraes L.F, Marinho R.S.S.M., Vieira C.R., Pinto A.M.V., Castro T.X (2018). Molecular characterization of feline calicivirus

variants from multicat household and public animal shelter in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49(4): 777-784. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.003>.

Pettersson B, Joseph G., ...Johansson K. (1989). Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al. 1989) based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 291–301.

Pesavento, P. A., Chang, K. O., & Parker, J. S. L. (2008). Molecular Virology of Feline Calicivirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 38(4), 775–786. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.002>.

Pesavento PA, Murphy BG. (2014) Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. *Vet Pathol*. 51(2):478-91. doi: 10.1177/0300985813511129.

Povey RC. 1990. Feline respiratory disease. In Greene CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia, WB Saunders. p 346

Radford, A.D., Coyne, K.P., Dawson S., Porter, C.J., Gaskell, R.M. (2007) Feline calicivirus *Vet. Res.* 38 (2) 319-335. DOI: 10.1051/vetres:2006056

Rodolakis, A., Mohamad, K.Y.,. (2010) Zoonotic potential of *Chlamydia*. *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4):382. [ff10.1016/j.vetmic.2009.03.014](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.014)ff. fhal-00556048f

Robin M., Bush KD., ...E. Everett. (2001). Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 203–220.

Roizmann, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, a C., & Studdert, M. J. (1992). The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 123(3–4), 425–449.

- Sandmeyer LS, Waldner CL , Bauer BS, Wen, ... Bienzle D.(2010). Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus, *Chlamydomphila felis*, and *Mycoplasma* spp. infection in cats with ocular disease in Canada. 51(6): 629–633.
- Shah SS. 2012. Pediatric Infectious Diseases. Long SS. 993-997.e5
- Shi J., Wen Z., Zhog G., Yang H., Wang Ch., Huang B., Liu R., He X., Shuai L., Sun Z., Zhao Y., Liu P., Liang L., Cui p., Wang J., Zhang X. ,Guan Y., Tan W., Wu G., Chen H., Bu Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *SCIENCE* 368:1016-1020
- Sharma, V., Mobeen, F., & Prakash, T. (2016). Comparative Genomics of Herpesviridae Family to Look for Potential Signatures of Human Infecting Strains. *International Journal of Genomics*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9543274>.
- Spergser J, Aurich C, Aurich J, Rosengarten R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Vet Microbiol.* 2002;87:119–29.
- Stephen J. O'Brien 1,, Jennifer L. Troyer., Meredith A. Brown., Warren E. Johnson., Agostinho Antunes., Melody E. RoelkeJill Pecon-Slattery., ... Jill Pecon-Slattery. (2012). Emerging Viruses in the Felidae: Shifting Paradigms. *Journal viruses*,4,236-257. <https://doi:10.3390/v4020236>.
- Stout, A. E., André, N. M., Jaimes, J. A., Millet, J.K., Whittaker, G.R. (2020) Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit?. *Veterinary Microbiology* 247: 108777. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108777>.
- Studdert, M.J., Studdert, V.P., Wirth, H.J. (1981) Isolation of *Chlamydia psittaci* from cats with conjunctivitis. *Aust. Vet. J.* 57, 515–517.

- Sturgess CP, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. 2001. Controlled study of the efficacy of clavulanic acid-potentiated amoxicillin in the treatment of *Chlamydia psittaci* in cats. *Vet Rec* 149:73-76.
- Subtil A., Collingro A., Horn, M. (2014) Tracing the primordial Chlamydiae: extinct parasites of plants? *Trends Plant Sci.* 19, 36–43.
- Sykes J. 2005. Feline Chlamydiosis. *Clinical Techniques in Small Animal Practices.* 20(2):129-34. DOI: 10.1053/j.ctsap.2004.12.018
- Sykes JE. 2014. Pediatric Feline Upper Respiratory Disease. Elsevier. 44(2):331-42. doi: 10.1016/j.cvsm.2013.10.005
- Sykes, J.E., Anderson, G.A., Studdert, V.P. and Browning, G.F. (1999), Prevalence of Feline *Chlamydia psittaci* and Feline Herpesvirus 1 in Cats with Upper Respiratory Tract Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13: 153-162. doi:10.1111/j.1939-1676.1999.tb02172.x
- Sykes JE, Studdert VP, Browning GF. 1990. Comparison of the polymerase chain reaction and culture for the detection of feline *Chlamydia psittaci* in untreated and doxycycline-treated experimentally infected cats. *J Vet Intern Med* 13:146-152.
- Sykes, J.E., Allen, J.L., Studdert, V.P., Browning, G.F., 2001. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1, and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Veterinary Microbiology*, 81:95-108.
- Tully, J.G., Bove, J.M., Laigret, F., and Whitcomb, R.F. 1993. Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species

(Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:378-385.

Townsend, W. M., Jacobi, S., Tai, S. H., Kiupel, M., Wise, A. G., & Maes, R. K. (2013). Ocular and neural distribution of feline herpesvirus-1 during active and latent experimental infection in cats. *BMC Veterinary Research*, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-185>.

Troyer, R. M., Beatty, J. A., Stutzman-Rodriguez, K. R., Carver, S., Lozano, C. C., Lee, J. S., ... VandeWoude, S. (2014). Novel Gammaherpesviruses in North American Domestic Cats, Bobcats, and Pumas: Identification, Prevalence, and Risk Factors. *Journal of Virology*, 88(8), 3914–3924. <https://doi.org/10.1128/JVI.03405-13>.

Veir, J. K., & Lappin, M. R. (2010). Molecular Diagnostic Assays for Infectious Diseases in Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(6), 1189–1200. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.012>.

Wagner DC, Kass PH, Hurley KF (2018) Cage size, movement in and out of housing during daily care, and other environmental and population health risk factors for feline upper respiratory disease in nine North American animal shelters. *PLoS ONE* 13(1): e0190140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190140>

Wang, J., Liu, L., Wang, J., Sun, X., & Yuan, W. (2017). Recombinase polymerase amplification assay-a simple, fast and cost-effective alternative to real time PCR for specific detection of feline herpesvirus-1. *PLoS ONE*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166903>.

Wills JM. 1986. Chlamydial infection in the cat. PhD thesis, University of Bristol.