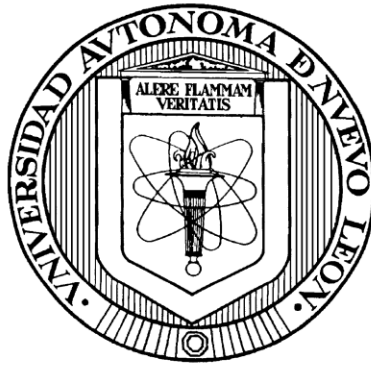


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“Detección molecular de *Malassezia* spp. y *Cryptococcus* spp. en piel de felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y/o Virus de Leucemia Felino”

POR

Zoe Gabriela Hernández Espinoza

Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestría en Ciencia Animal

Diciembre de 2022

“Detección molecular de Malassezia spp. y Cryptococcus spp. en piel de felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y/o Virus de Leucemia Felino”

Aprobación de tesis por el comité particular de

Zoe Gabriela Hernández Espinoza

COMITÉ DE TESIS

Jesús Jaime Hernández Escareño

Presidente

Uziel Castillo Velázquez

Secretario

José Pablo Villarreal Villarreal

Vocal

Ramiro Avalos Ramirez

Vocal

Juan José Zárate Ramos

Vocal

“Detección molecular de *Malassezia* spp. y *Cryptococcus* spp. en piel de felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y/o Virus de Leucemia Felino”

Aprobación de tesis por el comité particular de

Zoe Gabriela Hernández Espinoza

COMITÉ DE TESIS

Jesús Jaime Hernández Escareño

Director

Uziel Castillo Velázquez

Director o Codirector Externo

Uziel Castillo Velázquez

Subdirector de Posgrado e Investigación

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores los doctores Jaime Escareño y Uziel Castillo, que no quitaron el dedo del renglón conmigo.

Agradezco el apoyo a la Facultad de Biología, UANL.

DEDICATORIA

En honor a Maikol, que fue pilar fundamental para que yo me siguiera superando, siempre te amaré mi gatito hermoso.

A mi madre, que siempre estuvo apoyándome en cada crisis existencial, altas y bajas desde el primer día.

A mi familia, que me apoyaron siempre.

A las personas que se integraron a mi círculo en momentos fundamentales y cruciales para ser la persona sana, fuerte y empoderada que soy ahora.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| DEDICATORIA | v |
| ÍNDICE | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA | xii |
| RESUMEN..... | xiii |
| 1. INTRODUCCION..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES (LITERATURA REVISADA)..... | 2 |
| 2.1 Historia Felis catus | 2 |
| 2.2 Población felina en la actualidad y su impacto en la salud felina | 4 |
| 2.3. Clasificación viral (Retrovirus)..... | 5 |
| 2.4. Virus Inmunodeficiencia Felino..... | 5 |
| 2.5. Virus de Leucemia Felino..... | 7 |
| 2.6. Dermatología felina: Dermatofitosis y otitis | 9 |
| Método de infección..... | 10 |
| 2.7 <i>Cryptococcus</i> spp. como patógeno de alto riesgo..... | 10 |
| 2.8 Otitis felina: complejo de otitis felino | 12 |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 14 |
| 4. HIPÓTESIS | 15 |
| 5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN..... | 15 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL..... | 15 |
| 5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 15 |

| | |
|---|----|
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS. | 16 |
| LUGAR DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS | 16 |
| ÁREA Y TIEMPO DE MUESTREO | 16 |
| METODOLOGÍA | 17 |
| 6.1.1 Toma de muestras hisopado. | 17 |
| 6.1.2 Procesamiento de muestras hisopado | 17 |
| 6.2.1 Toma de muestras hisopado ótico. | 18 |
| 6.2.1 Procesamiento de muestras hisopado ótico. | 18 |
| 6.3.1 Toma de muestras sanguíneas | 20 |
| 6.3.2 Procesamiento de muestras sanguíneas para detección de FIV | 21 |
| 6.3.3 Procesamiento de muestras sanguíneas para detección de FeLV..... | 22 |
| 6.4.4 Estandarización de control positivo gen <i>gpd1 felis catus</i> y cuantificación de DNA. | 23 |
| 6.4.2 Estandarización de controles positivos FeLV. | 24 |
| 6.4.3 Estandarización de control positivo FIV | 25 |
| 7. RESULTADOS | 26 |
| 7.1. Inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa de Virus de Inmunodeficiencia Felino y Virus de Leucemia Felino..... | 26 |
| 7.2. PCR y electroforesis FIV de muestras con inmunoensayo cromatográfico..... | 27 |
| 7.3. PCR y electroforesis FeLV de muestras con inmunoensayo cromatográfico. | 29 |
| 7.4. PCR como método de detección de <i>Cryptococcus</i> spp. en otitis. | 31 |
| 7.5. PCR como método de detección de <i>Malassezia</i> spp. en otitis..... | 32 |
| 7.6. Cultivos micológicos a partir de descamaciones corporales | 34 |
| 8. DISCUSIÓN | 37 |
| 9. CONCLUSIONES | 40 |
| 10. PERSPECTIVA | 41 |

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 42

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Ilustración 1. Mapa genómico de enFeLV comparado con los subgrupos de FeLV. Se han descrito cinco cepas de FeLV, de las cuales todas difieren genéticamente de enFeLV. La cepa que llega a ser su análogo es FeLV-A, presenta ligeros cambios de nucleótidos en LTR, gag y env. FeLV-B es el resultado de la recombinación de enFeLV + FeLV-A, en la cual la zona que está mayormente conservada en esta recombinación es el 5'. FeLV-C /T presentan inserciones focales, sustituciones y deleciones en ciertas regiones de env. La estrella nos ayuda a identificar la presencia de SNP's (Chiu et al, 2018). | 8 |
| Ilustración 2. Clasificatoria de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> | 11 |
| Ilustración 3. Ciclo de vida <i>Cryptococcus</i> spp. (Gyawali et al, 2013) (Chung et al, 2023)..... | 12 |
| Ilustración 4. Productos amplificados a 600 pb de ADN de la región D1/D2 26S del DNA ribosomal de <i>Malassezia</i> spp..Carril 1 MPM, carril 2 control positivo(C.P.) carriles 3-9 muestras de oído izquierdo y derecho, carril 10 control negativo. 20 | 20 |
| Ilustración 5. Estandarización control positivo FeLV. Gel de agarosa 1.5% donde se realizó electroforesis para la visualización de PCR mediante extracción de ADN de vacuna Leukocell Virbac..... | 24 |
| Ilustración 6. Gradiente FIV. Amplificación de productos a 224 pb; control positivo a partir de muestra de ADN de felino positivo a FIV. | 25 |
| Ilustración 7. Resultados PCR- electroforesis para detección de FIV mediante sangre completa. Carril 1: MPM, carril 2 al 8 muestras, carril 9 control negativo. | 28 |
| Ilustración 8. Reamplificación de muestra positiva a Felv, mediante extracción de ADN de linfocitos (células blancas), con la técnica fenol- cloroformo y electroforésis con gel de agarosa 1.5%. | 29 |
| Ilustración 9. Imagen de resultados de técnica PCR para detección de <i>Cryptococcus</i> spp. mediante electroforesis en agarosa 1.5%..... | 32 |
| Ilustración 10. Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico a 10x, con tinción azul. A,B) <i>Aspergillus nigger</i> , C)Hifas imperfectas/ hongo imperfecto, D) <i>Cladosporium</i> spp. | 36 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Taxonomía <i>Felis catus</i> | 2 |
| Tabla 2. Taxonomía completa del Reino Riboviria, en el cual se muestran los géneros <i>Gammaretrovirus</i> (FeLV) y <i>Lentivirus</i> (FIV). *Géneros virales oncogénicos. (Current ICTV Taxonomy Release ICTV, s. f.)..... | 5 |
| Tabla 3. Protocolo de termociclador para PCR de <i>Malassezia</i> spp. (El termociclador fue configurado en grados centígrados). | 19 |
| Tabla 4. Protocolo de termociclador para PCR de <i>Cryptococcus</i> (El termociclador fue configurado en grados centígrados) | 19 |
| Tabla 5. Primers utilizados para la detección de <i>Malassezia</i> spp. y <i>Cryptococcus</i> , mediante PCR y electroforesis utilizando gel de agarosa al 1.5%. | 20 |
| Tabla 6. Protocolo de termociclador para PCR de los patógenos FIV/ FeLV (El termociclador fue configurado en grados centígrados). | 22 |
| Tabla 7. Primers utilizados para control positivo del gen <i>felis catus</i> (<i>Gdp1</i>), mediante PCR y electroforesis utilizando gel de agarosa al 1.5%. | 23 |
| Tabla 8. Primers utilizados para la detección de FIV/ FeLV, mediante PCR y electroforesis utilizando gel de agarosa al 1.5%. | 23 |
| Tabla 9. Resultado de inmunoensayo cromatográfico para la detección de FIV. | 26 |
| Tabla 10. Tabla resultados FIV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico. Aquellos verdaderamente positivos son 21, de estos 15 resultaron negativos al inmunoensayo cromatográfico y solamente 6 resultaron positivos. Los verdaderos negativos son 12, de los cuales 11 resultaron negativos a ambas pruebas y uno dio falso positivo en el ensayo inmunocromatográfico. | 28 |
| Tabla 11. Tabla resultados FeLV, mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico. Los verdaderos positivos son 2, los cuales resultaron positivos a ambas pruebas, Aquellos resultantes positivos en el inmunoensayo cromatográfico pero negativos en PCR son 12. Verdaderos negativos resultaron 19. Cabe mencionar que para detección temprano de FeLV como se realizó en dicho trabajo es más acertado el inmunoensayo cromatográfico que la prueba PCR. | 30 |
| Tabla 12. Resultados PCR y electroforésis para detección de FIV/ FeLV. | 30 |

Tabla 13. Tabla resultados de Cryptococcus spp. y su incidencia con el tipo de ambiente/ vivienda. Se observó una mayor presencia del patógeno en aquellos felinos que tienen acceso al exterior (parques, calle, áreas comunes, etc.) Como dicho patógeno no es posible compararlo con alguna otra técnica, es por eso por lo que en este trabajo nos basamos en el tipo de ambiente en el que normalmente anda el felino para tabular la incidencia del patógeno. 31

Tabla 14. Tabla de resultados de Malassezia spp. y su incidencia con el tipo de ambiente/ vivienda. Se observó una mayor presencia del patógeno en aquellos felinos que tienen acceso al exterior (parques, calle, áreas comunes, etc.) Como dicho patógeno no es posible compararlo con alguna otra técnica, es por eso por lo que en este trabajo nos basamos en el tipo de ambiente en el que normalmente anda el felino para tabular la incidencia del patógeno. 33

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

| SÍMBOLO ABREVIATURA | O | DESCRIPCIÓN |
|------------------------|-------------|--|
| | FIV | Virus Inmunodeficiencia Felino |
| | FeLV | Virus Leucemia Felino |
| | M. canis | Microsporium canis |
| | C. albicans | Candida albicans |
| T. mentagrophytes | | Trychophyton mentagrophytes |
| | CA | Proteína mayor de la cápside |
| | NC | Proteína nucleocápside |
| | MA | Proteína de matriz |
| | RT | Trascriptasa reversa |
| | IN | Integrasa |
| | TM | Glycoproteína transmembrana |
| | SU | Glycoproteína receptora de unión/ glicoproteínas de superficie antigénicas |
| | ABG | Azul de bromofenol con glicerol |
| | MPM | Marcador de peso molecular |
| | pb | Pares de bases |
| | SNP's | Polimorfismo de nucleótido simple |

RESUMEN

En los últimos años se ha detectado un alza poblacional de felinos en los hogares mexicanos, según el INEGI, se tiene un registro de 80 millones de mascotas, de las cuales 16.2 millones son felinos, así mismo, se cree que 400 mil de estos pueden deambular en las calles; lo cual nos traslada al estudio de interés, la asociación entre enfermedades virales (Virus de Inmunodeficiencia Felino y Virus de leucemia Felino) con agentes fúngicos (zoonóticos) y otitis provocadas por levaduras.

Se han realizado estudios con anterioridad, uno de los pioneros en revisar la asociación entre estos agentes patógenos fue Mancianti et al en 1992, donde de un grupo de 90 felinos (55 seropositivos FIV, 35 seronegativos FIV) fueron muestreados para examinar la microbiota fúngica, en el cual los tres agentes fúngicos mayormente aislados fueron *M. canis* con un 74% (Seropositivos) y 25% (seronegativos); *C. albicans* con un 23% (seropositivos) y 4% (seronegativos); *C. neoformans* con un 17% (seropositivos) y 0% (seronegativos). Ellos comenzaron con la ideología que el gato es un importante portador de enfermedades zoonóticas, principalmente aquellos felinos con los cuales no se tiene un control de ser completamente de interior. En el 2000, sierra et al, realizaron un estudio en el cual fueron examinados 85 felinos, de los cuales 10 resultaron positivos a FeIV, 24 positivos a FIV y un solo felino resultó positivo a ambas infecciones virales; en estos grupos *Malassezia* spp. presentó una incidencia del 43.6%. En un estudio más reciente, en el 2019, Ruiz *et al*, realizaron un estudio en el cual registraban la presencia tanto de dermatofitos e infección viral FIV/FeIV, en dicho estudio trabajaron con 35 gatos, de los cuales 24 presentaban FeLV, 9 presentaban FIV y solamente dos portaban ambos virus, de dicho grupo de 35 felinos, solamente 24 resultaron con presencia de dermatofitos zoonóticos, 22 contaban con presencia de *Microsporum canis* y solamente 2 con presencia de *Trichophyton mentagrophytes*.

Resultados/conclusion

En investigaciones anteriores Sierra et al (2000) encontraron que los patógenos mayormente encontrados en su trabajo fueron *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Malassezia* spp., *Microsporum* spp y *Cryptococcus* spp

se obtuvo un gran resultado de *Aspergillus nigger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp. esto pudo ser provocado por el tipo de condiciones climatológicas y el tipo de enfermedad sistémica que son capaces de inmunosuprimir el sistema inmunológico dermatológico, sin embargo, se encontró un 11.6% de hongos

imperfectos, los cuales provenían de muestras positivas en lámpara de Wood (método de detección rápida de algunos hongos como *T. mentagrophytes*, *M. canis*, con lo cual pudiéramos tener un indicio de dichos hongos. Ruiz y colaboradores realizaron un trabajo en el cual aislaron hongos dermatofitos y hongos no dermatofitos, en felinos con infecciones y coinfecciones por FIV/ FeLV, de los cuales un 68.6% resultó positivo a presencia de algún dermatofito, ellos mencionan que existe una asociación entre la positividad de FIV/ FeLV y la presencia de estos dermatofitos; comparado con nuestro trabajo donde si se obtuvo gran presencia de hongos no dermatofitos causantes de lesiones en los cuales observamos asociación entre la positividad de FIV/ FeLV y la presencia de estos. En últimas investigaciones se ha descubierto que *Cryptococcus* ha ido en aumento en problemas zoonóticos, los cuales han alarmado fuertemente a la sociedad médica, tanto veterinaria como humana, esto debido a que se ha visto un gran número de pacientes positivos a VIH, enfermedades autoinmunes, con problemas causados por *Cryptococcus* spp. claro está que no solamente en humanos, ya que se ha documentado en animales también, sin embargo, se ha observado que existe muy poca documentación en felinos, Se observó un 70% de positividad en los 60 felinos, de los cuales la mayoría tenía la tendencia de salir de casa hacia parques o contacto con otro tipo de animales, . En nuestro estudio los sitios de aislamiento fue cerumen ótico proveniente de infecciones (otitis), lo cual se clasifica como una zona atípica de aparición; Sánchez y colaboradores (2016) describieron el problema que causa una baja en células blancas, esto causa que cualquier agente habitante normal de la microbiota de la piel puede llegar a ser microorganismos patógeno, ya que no se mantiene el equilibrio homeostático; el cual puede verse afectado por infecciones virales, en gatos dos de las infecciones virales de mayor ocurrencia y permanencia en el sistema inmune son FIV/ FeLV. Sánchez y colaboradores (2016) describieron el problema que causa una baja en células blancas, esto causa que cualquier agente habitante normal de la microbiota de la piel puede llegar a ser microorganismos patógeno, ya que no se mantiene el equilibrio homeostático; el cual puede verse afectado por infecciones virales, en gatos dos de las infecciones virales de mayor ocurrencia y permanencia en el sistema inmune son FIV/ FeLV (Fenner,2012). Cavalcante y colaboradores (2018) mencionan que para poder encontrar FeLV en sangre mediante técnica de PCR debe estar en el periodo de latencia del virus, sin embargo en nuestro

trabajo observamos que el felino debe estar en periodo de viremia, sin embargo, se observó que algunos de los felinos muestreados, pese a presentar sinología y resultar positivos en el ensayo inmunocromatográfico la prueba PCR resulta negativa, esto ya que posiblemente la toma de muestra fue muy temprana o inclusive la viremia no era tan alta por ser inicio infeccioso en el cual solamente se puede detectar mediante prueba rápida

1. INTRODUCCION

Las infecciones virales en felinos han ido en aumento, esto de la mano de infecciones oportunistas (bacterias, hongos y levaduras), una de las principales causas es debido al aumento de felinos rescatados e introducidos a un hogar con otro felino completamente sano, esto sin previa revisión médica. Según el INEGI en el 2021, se registraron 80 millones de mascotas, de las cuales 16.2 millones son felinos, así mismo, se cree que 400 mil de estos tienen acceso al exterior. Teniendo en cuenta dichos aspectos podemos ampliar un poco más el panorama hacia la salud integral del felino, dado que el estar en un ambiente “exterior” llega a causar estrés debido desde la búsqueda de alimento, hasta tener que ganar territorio entre otras especies animales y congéneres, esto puede ser efecto inmunosupresor para el felino, con esto tenemos una mayor probabilidad de que el hospedador pueda presentar tanto infecciones virales como infecciones por hongos y/o bacterias oportunista y/o infectante. A través de los años se ha descrito como la PCR una de las pruebas de oro para la detección de enfermedades, sin embargo, en los últimos años se han ido implementando tecnologías en pruebas rápidas para una oportuna detección de agentes bacterianos o virales y su pronto tratamiento médico. En este trabajo nos centraremos en infecciones virales (Inmunodeficiencia felino, Leucemia Felino) detección mediante ensayo inmunocromatográfico y PCR; e infecciones por y levaduras (*Malassezia* spp. y *Cryptococcus*) para detección mediante PCR.

2. ANTECEDENTES (LITERATURA REVISADA)

2.1 Historia *Felis catus*

Hace aproximadamente 55.8 millones de años en el periodo del Eoceno existió el *Miacis*, se cree eran excelentes trepadores y cazadores, esto por la estructura anatómica que poseían; ya que presentaban un tronco pequeño y alargado, extremidades largas, garras compuestas para atrapar presas pequeñas a medianas y sobre todo un cráneo con una cavidad cerebral diseñada para un cerebro más desarrollado que el de otros carnívoros y una dentadura diseñada específicamente para morder y desgarrar. Posteriormente este evolucionó en el *Cynodictis*, el cual apareció hace 25-55 millones de años. Este al igual que el *Miacis* presentaba un tronco pequeño y alargado, Con miembros un poco más cortos, aún presentaban garras afiladas, sin embargo, su característica era que estas eran retractiles lo cual posiblemente les fuera de mayor ayuda al momento de cazar presas; Cabe destacar que del *Cynodictis* surgen dos ramas, la *Felidae* y *Canidae*. Seguido tenemos al *Smilodon* el cual es el precursor de toda la familia *Felidae*. El *Smilodon* surgió hace aproximadamente 30 millones de años durante

| Taxonomía | |
|-------------|------------------|
| Reino | Animalia |
| Filo | Chordata |
| Subfilo | Vertebrata |
| Clase | Mammalia |
| Subclase | Theria |
| Infraclasse | Placentalia |
| Orden | Carnivora |
| Suborden | Feliformia |
| Familia | Felidae |
| Subfamilia | Felinae |
| Género | Felis |
| Especie | Felis silvestris |
| Subespecie | F.S. catus |

Tabla 1. Taxonomía *Felis catus*

la era del Pleistoceno, esta especie tiene distintas zonas geográficas en las cuales se han encontrado fósiles, las principales, occidente y américa. Este en comparación con sus antepasados es que presenta un tronco mucho más moloso, extremidades con articulaciones más protegidas para impactos más fuertes, así mismo un cráneo más grande con su principal característica, unos caninos extremadamente largos con los cuales podían infligir daño a zonas mayormente irrigadas con facilidad y causar la muerte rápida de la presa (Sánchez et al, 1998). Seguido del *Smilodon* tenemos al *Dinictis*, este se tienen registros de hace 1.6 millones de años o un poco más, el cual comparado con el *Smilodon* ya era un poco más pequeño, comparable con el tamaño de una pantera o un zorro, sin embargo, seguían presentando caninos muy alargados, ya no eran animales tan molosos sin embargo continuaban con fuerza para seguir siendo buenos cazadores y depredadores. De estos surge la especie *Felis silvestris*, la cual es la mayormente emparentada con el felino actual, este también llamado gato montés/ gato salvaje, su principal distribución es en occidente y África. Presentan capas de pelo espesas, colas pobladas y anilladas, las tonalidades del manto van del gris al gris atigrado; lo cual les aporta buen camuflaje en su hábitat. Su peso va de los 2,8kg- 5,8 kg. Se cree que el felino actual viene de la hibridación de dos subespecies del *Felis silvestris*, las cuales son *Felis silvestris silvestris* y *Felis silvestris lybica*; Esto ya que *Felis silvestris silvestris* son felinos con temperamento muy explosivo, el cual es más tímido y huraño, difícil de contener a pesar de intentar ser criados desde cachorros, comparados con los *Felis silvestris lybica* que son felinos más apacibles, estos llegan a presentar comportamientos menos agresivos comparados con *Felis silvestris silvestris* y se han logrado domesticar unos cuantos especímenes pese a su naturaleza salvaje (Turner et al, 2014).

2.2 Población felina en la actualidad y su impacto en la salud felina

Según el INEGI en el 2021, se registraron 80 millones de mascotas, de las cuales 16.2 millones son felinos, así mismo, se cree que 400 mil de estos tienen acceso al exterior. En base a dichas cifras podemos observar que pese a que una gran cantidad de felinos son de completo interior existen algunos que tienden a salir de sus hogares; así mismo, no están exentos a que en algún hogar exista un felino 100% de interior y otro que si tenga ímpetu por salir de casa. Estos comportamientos se originan desde cachorro, ya que los felinos que desde nacimiento se encuentran en un hogar establecido o que llegaron a nacer en un hogar con una zona preestablecida para su destete son aquellos con los que se llega a tener menor problema, sin embargo, no están libres de crisis de estrés, los cuales pueden ser desde un cambio de alimentación, cambio de zona del área de juegos, hasta introducir una mascota nueva al hogar. Comparados con aquellos felinos que tienden a salir de casa, estos generalmente son felinos que son adoptados de las calles o que no tuvieron una zona segura al momento de su destete; estos llegan a sufrir un poco más las crisis de estrés, esto debido a que el hecho de ser encerrado le es un estrés, alimentos poco palatables comparadas con comida que pudiesen encontrar en los basureros, adaptaciones humano-felino ó felino- felino. Teniendo en cuenta dichos aspectos podemos ampliar un poco más el panorama hacia la salud integral del felino; Sánchez define el estrés como un estado que ocurre cuando un individuo percibe las demandas de una situación que excede sus recursos; esto ya que puede ejercer un efecto inmunosupresor haciendo al organismo vulnerable contra infecciones virales, micóticas, bacterianas e inclusive células neoplásicas. En este caso un eje común que entra en acción es el Hipotalámico- pituitario – adrenal, el cual estimula la excreción de corticoesteroides (ej. Cortisol), los cuales incrementan niveles de glucosa en sangre, inhibiendo así la liberación de interleucinas e interferones, lo que nos da como resultado unos linfocitos débiles lo cual hará que interactúen en menor proporción con los agentes invasores (Sánchez et al 2006). Con esto tenemos una mayor probabilidad de que el hospedador pueda presentar tanto infecciones virales como infecciones por hongos y/o bacterias oportunistas y/o infectante. En este trabajo nos centraremos en infecciones virales (Inmunodeficiencia felina, Leucemia Felina) e infecciones por hongos y levaduras (*Malassezia spp.* y *Cryptococcus*).

2.3. Clasificación viral (Retrovirus)

Tanto a FIV como a FeLV podemos encontrarlos en la misma familia, ambos pertenecientes a la Familia *Retroviridae*, La cual se encuentra en el Reino *Riboviria* (Véase tabla 2).

2.4. Virus Inmunodeficiencia Felino

Los viriones de FIV tienen un diámetro de 60nm, dentro de esto tenemos su material genético, en el cual encontramos cuatro genes principales y gen accesorio para la codificación de las proteínas viriónicas; Estos genes son *gag*, *pro*, *pol*, *env* y *vif* (gen accesorio) (Taylan, 2020; Fenner 2012). El gen *gag* (asociado a antígeno) produce

todas las poliproteínas no glicosiladas (MA, CA, NC). El gen *pro* codifica una proteasa que facilita la maduración de proteínas víricas. El gen *pol* codifica proteínas multifuncionales como RT y funciones de enzima integrasa. El gen *env* codifica SU/ TM (Fenner, 2012). El gen *vif* puede lograr el impedimento de la actividad antiviral de las células huésped, esto mediante la interacción con la apolipoproteína B mRNA (Taylan, 2020). Este virus es un virus de hebra simple RNA y mide 9.5kb aproximadamente. En la actualidad se conocen siete cepas (A, B, C, D, E, F y U-NZenv), de las cuales su distribución es mundial, sin embargo, podemos observar que en ciertos países se puede presentar más una cepa que otra. Al momento tenemos que los subtipos A y B son mayormente encontrados en Estados Unidos, Canadá y México; los subtipos B y E en

Taxonomía del Reino viral Riboviria.

| | |
|---|---|
| Reino <i>Riboviria</i> | |
| Reino <i>Pararnavirae</i> | |
| Filo <i>Artverviricota</i> | |
| Clase <i>Revtraviricetes</i> | |
| Orden <i>Ortervirales</i> | |
| Familia <i>Retroviridae</i> | |
| Subfamilia <i>Orthoretrovirinae</i> | Subfamilia <i>Spumaretrovirinae</i> |
| Género <i>Alpharetrovirus</i> * | Género <i>Spumavirus</i> |
| Género <i>Betaretrovirus</i> * | |
| Género <i>Gammaretrovirus</i> * (Virus Leucemia Felino) | |
| Género <i>Deltaretrovirus</i> * | |
| Género <i>Epsilonretrovirus</i> * | |
| Género <i>Lentivirus</i> (Virus Inmunodeficiencia Felino) | |

Tabla 2. Taxonomía completa del Reino Riboviria, en el cual se muestran los géneros *Gammaretrovirus* (FeLV) y *Lentivirus* (FIV). *Géneros virales oncogénicos. (Current ICTV Taxonomy Release | ICTV, s. f.)

África; subtipos B, C y D en el continente asiático; y en el continente europeo se observan los subtipos A, B, C y D (Greene, 2012). Dichas cepas están formadas en base a la caracterización del dominio V3-V5 del gen *env*. En otros estudios se ha demostrado que en las cepas A-E el gen *gag* ha sido utilizado para dicha caracterización poliproteica. En este estudio fueron utilizadas las secuencias diseñadas por LIU et al, 2020 (véase tabla 5), las cuales según el estudio realizado están diseñadas para detectar cualquiera de las cepas que se encuentran mundialmente. Unas de las proteínas más importantes para la unión virus – célula, son aquellas proteínas producidas por el gen *Env* (Celma et al, 2007). Una de las principales características es que *Env* es un precursor altamente glicosilado para SU y TM (Verschoor et al., 1993). La traducción del gen *Env* abre un marco de lectura el cual da como resultado una proteína de aproximadamente 150kDa y procesado para retirar un péptido de señal N-terminal largo quedando en 130 kDa; teniendo ya la molécula *Env* 130kDa es procesada a dos polipéptidos de 95 kDa y 36 kDa, estos correspondientes a SU y TM respectivamente (Verschoor et al., 1993). Así mismo, se ha demostrado que *Env* es precursor de la infección celular, esto ya que dichas proteínas se unen al receptor de quimiocina CXCR4, así mismo estas proteínas son las determinantes del tropismo viral y su patogénesis (Celma et al, 2007). Se ha detectado que FIV tiene el mismo mecanismo de acción que HIV-1; así mismo se tienen registros que FIV tiene la capacidad de infectar rápido y poder crear una viremia sistémica durante el periodo agudo de la infección, esto, para posteriormente perdurar en el torrente sanguíneo periférico y tejidos adyacentes. Anteriormente se creía que la célula predilecta del virus donde se podía encontrar el ADN proviral era en linfocitos CD4+, sin embargo, se ha descubierto que también se puede obtener de células B, monocitos y macrófagos (Eckstrand et al., 2017), sin embargo, en investigaciones de Hart y Nolte (1995) ellos demostraron que el virus podía también causar la baja de eritrocitos y a la par de hemoglobina.

2.5. Virus de Leucemia Felino

El virus de Leucemia felino pertenece al género Gammaretrovirus; este es un virus oncogénico. Uno de sus aspectos más importantes a considerar es el método de brote de la célula donde se replicó, ya que este presenta una proteína especial, la cual es llamada grupo Pr65 gag (comprendido por las proteínas p15MA, pp12, p27 CA, p10 NC; el cual es precursor de la formación de la envoltura vírica, tomando como base la bicapa lipídica de la célula. Así mismo se añade el grupo ENV (compuesto por las proteínas gp 70/ p15E) el cual atraviesa la membrana y se posiciona transmembrana en la cara externa de la envoltura virionica (Willett et al, 2013). El tamaño del virus y virión de FeLV es el mismo que el de FIV; sin embargo, su gran diferencia y lo que lo hace único, es su método de ingreso a la célula, ya que, dependiendo de la cepa viral será el método de ingreso a la célula y así mismo su método de infección. Este virus posee dos marcos de lectura, uno para el gen *gag/pol* y otro que codifica el transcrito *env* (Chiu et al, 2018). Actualmente se conocen seis tipos de FeLV, los cuales son A, B, C, D, E y T (Ortiz, et al, 2022). Al igual que FIV, FeLV también presenta su región SU/gp70, la cual es factor importante, ya que debido a las variaciones que este llega a presentar son los sitios de unión y tropismo celular que llegue a presentar dicha cepa. FeLV-A ENV se une a células que presenten interacciones con transportador de tiamina (THTR1), FeLV-B presenta un tropismo a simporte de vía fosfato (Pit-1 y ocasionalmente a Pit-2), mientras que FeLV-C utiliza el trasportador haem (hematopoyético) (FLVCR1) (Willett et al, 2013). Cabe mencionar que, FeLV se encuentra presente en el genoma del gato denominado enFeLV, el cual es básicamente el homólogo de FeLV- A; enFeLV presenta elementos no funcionales (Ortiz, et al, 2022), los cuales se transmiten de generación en generación como parte de los cromosomas felinos; Así mismo, se ha descubierto que la cepa FeLV-B emerge a partir de la combinación de la envoltura de FeLV-A y los transcritos de enFeLV (este proceso ocurre durante la síntesis de DNA dirigido por la transcriptasa reversa viral, seguido de un acoplamiento de genoma viral endógeno y exógeno (Ortiz, et al, 2022).

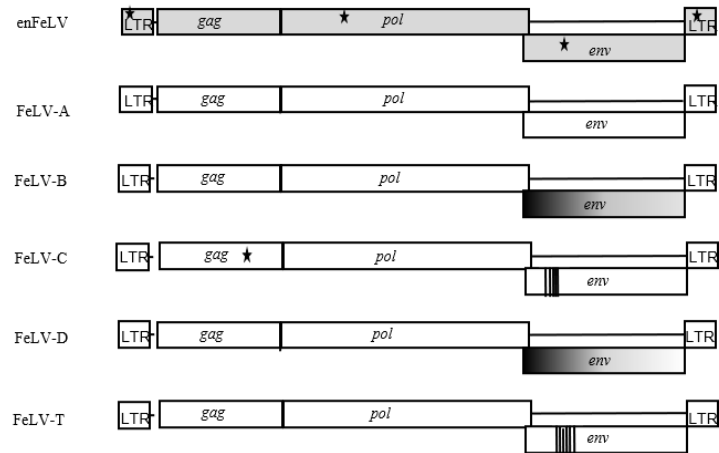


Ilustración 1. Mapa genómico de enFeLV comparado con los subgrupos de FeLV. Se han descrito cinco cepas de FeLV, de las cuales todas difieren genéticamente de enFeLV. La cepa que llega a ser su análogo es FeLV-A, presenta ligeros cambios de nucleótidos en LTR, *gag* y *env*. FeLV-B es el resultado de la recombinación de enFeLV + FeLV-A, en la cual la zona que está mayormente conservada en esta recombinación es el 5'. FeLV-C /T presentan inserciones focales, sustituciones y deleciones en ciertas regiones de *env*. La estrella nos ayuda a identificar la presencia de SNP's (Chiu et al, 2018).

2.6. Dermatología felina: Dermatofitosis y otitis

En la dermatología felina es necesario tener identificadas las lesiones típicas de cada patógeno o tener el conocimiento sobre dermatología para poder identificar casos de problemas dermatológicos provocados por patógenos, problemas hormonales o autoinducido. Una dermatofitosis puede ser definida como la infección del folículo piloso y el estrato córneo, dentro de la cual se encuentran lesiones focales, multifocales y generalizadas; causando así alopecia, eritema, seborrea y costras. Para una mejor identificación de estos se debe seguir un algoritmo, dentro del cual los casos más frecuentes son: 1) supuesto contagio a humanos, 2) animales rescatados (cachorros), 3) casos complicados/ ya tratados; para estos debemos tener en cuenta que existen tanto factores intrínsecos como extrínsecos. Se conoce una clasificación rápida para estas infecciones:

Infección simple

El animal se presenta sano, no estresado, no inmunocomprometido (viral o bacteriano), las lesiones son evidentes, pero no llegan a ser extensas.

Infección complicada

Los animales presentan enfermedades coexistentes, generalmente se presentan en animales de pelo largo, pelo enmarañado y con falta de aseo; las lesiones son extensas y son dermatofitosis recidivantes. Dentro de la etiología de las dermatofitosis, actualmente se conocen 3 géneros (*Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*) de los cuales 38 especies llegan a ser patógenas, sin embargo, actualmente se ha observado que dentro de estas 13 son las más comunes en infectar (caninos y felinos: *M. canis*, *T. inderdigitale*, *T. erinacei*, *M. persicolor*, *T. rubrum*; Hombre; *T. rubrum*, *M.canis*.). Algunos factores que impiden su infección son el aseo, alimentación y no contacto con animales infectados. La forma más común de su propagación es mediante zonas infectadas con escamas de otros animales y contacto directo.

Método de infección

Usualmente los dermatofitos llegan mediante escamas infectadas de otros animales, se liberan y adhieren a los corneocitos del huésped, esto mediante proteasas, lipasas, elastasas, colaganesas, queratinasas, fosfatasas y esteraras, las cuales causan que las uniones entre los queratinocitos se vean afectadas por su degradación, posteriormente ocurre la germinación del hongo la cual va de 6-24 horas, en estas el dermatofito va creando hifas cortas así estos puedan ingresar al estrato lúcido y granuloso de la piel, lo cual ya está siendo considerado una invasión a la queratina. Ya en el estrato lúcido y granuloso se van produciendo hifas y esporas para la intercomunicación de estos (Mao et al, 2014). Los dermatofitos producen enzimas proteolíticas, su principal objetivo es facilitar la adhesión a los queratinocitos, estratos lúcido y basal, produciendo así una respuesta inmune innata; estas enzimas producen estratos queratinosos, para así producir péptidos que son hidrolizados a aminoácidos, estos son utilizados por el dermatofito como fuente de carbono, nitrógeno y azufre.

2.7 *Cryptococcus* spp. como patógeno de alto riesgo.

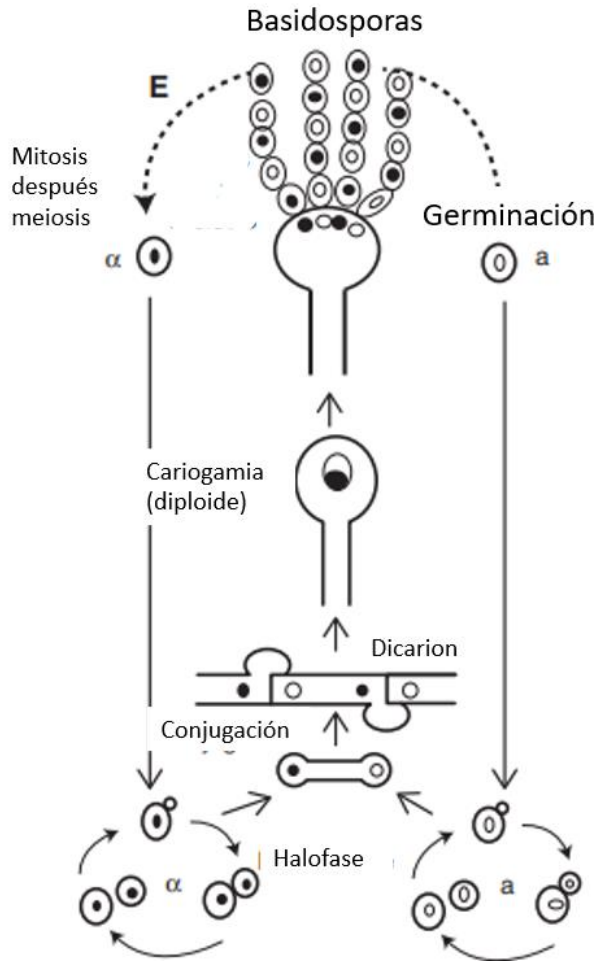
La enfermedad que causa este hongo se conoce como criptococosis y puede afectar a personas con sistemas inmunológicos debilitados, como pacientes con VIH/SIDA, cáncer, diabetes, o aquellos que han recibido trasplantes de órganos. También puede afectar a personas que están sanas, pero que han estado expuestas a grandes cantidades de esporas de *Cryptococcus*, como en caso de trabajadores de la agricultura o de la construcción. La criptococosis puede afectar diferentes partes del cuerpo, pero es más comúnmente una infección pulmonar que se disemina al cerebro, causando meningitis criptocócica. Esta es una enfermedad grave y potencialmente mortal si no se trata adecuadamente. Además, *Cryptococcus* puede ser una causa importante de infecciones oportunistas en pacientes con SIDA, y es una de las principales causas de muerte en personas que viven con VIH/SIDA en todo el mundo (Park et al, 2009). Por lo tanto, es importante tomar medidas para prevenir la criptococosis en personas con sistemas inmunológicos debilitados, como la educación sobre los riesgos de la exposición a esporas de *Cryptococcus* y la profilaxis antifúngica en pacientes

de alto riesgo. También es fundamental para la salud pública la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos para la criptococosis, especialmente en áreas donde la enfermedad es endémica. El *Cryptococcus neoformans*, el hongo más comúnmente asociado con la enfermedad en humanos se encuentra en el medio ambiente, especialmente en el suelo y los excrementos de aves. La infección por *Cryptococcus* generalmente ocurre cuando las personas inhalan las esporas del hongo que se encuentran en el aire; en el caso de felinos estos pueden ser inhalados o ingeridos. Este es clasificado como orden Tremelales, familia Filobasidiaceae, en el género *Filobasidiella*, especies *neoformans* y *bacillospora*, conocidos también como *Filobasidiella neoformans* con los serotipos A y D; también se encuentra *F. bacillospora*, en la cual se encuentran los serotipos B y C. Y como estado amorfo *Cryptococcus*, especies *C. neoformans*, *C. Gatti*.

| Serotipo | Especies y variedades | Tipos moleculares |
|----------|---|----------------------------|
| A | <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> | VN I, VN II |
| B | <i>C. gattii</i> | VG I, VG II; VG III, VG IV |
| C | <i>C. gattii</i> | VG I, VG II, VG III; VG IV |
| D | <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> | VN IV |
| AD | <i>C. neoformans</i> | VN III |

Ilustración 2. Clasificatoria de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Al ser levaduras haploides heterotálicas tienen la capacidad de poseer dos tipos de apareamiento “MAT α ” y “MATa”, cabe destacar que aquellas que predominan en el medio ambiente son aquellas que poseen el apareamiento “MAT α ” (Gyawali *et al*, 2013), las células haploides conservan un apareamiento asexual, esto hasta que lleguen al medio o sustrato células con feromonas diferentes a las suyas, estas pueden ser MFa para las de apareamiento mediante MATa y MF α para aquellas de apareamiento MAT α ; Como respuestas a estas feromonas las células MATa experimentan crecimiento isotrópico; las células MAT α crean tubos de conjugación. Esto, con la finalidad de fusionarse creando hifas dicarióticas con conexiones tipo almeja. Una parte fundamental de dicha fusión entre los dos tipos de células es la eliminación de las mitocondrias MATa, esto con la finalidad que



los productos pasen por un ciclo de división meiótica pudiendo así obtener productos meióticos “MATa” y “MATα” (Ver ilustración 3.) (Gyawali *et al*, 2013).

Ilustración 3. Ciclo de vida *Cryptococcus* spp. (Gyawali *et al*, 2013) (Chung *et al*, 2023)

2.8 Otitis felina: complejo de otitis felino

La otitis externa es la inflamación de canal ótico externo, fuera de la membrana timpánica y en ocasiones se ve involucrado el pabellón auricular. Sus causas pueden ser primarias o secundarias, con un gran número de factores predisponentes o perpetuantes (Hiblu *et al*, 2020). Como causas primarias se pueden observar cuerpos extraños, parásitos, hongos, alergias, enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunomediadas, desordenes glandulares y endócrinos y virus (Mascarenhas *et al*, 2019). Dentro de uno de los retos más grandes de controlar este tipo de complejos está la resistencia a antibacterianos y antifúngicos (Hiblu *et al*, 2020), ya que existe un uso indiscriminado de diversos

productos para controlar las otitis en felinos, esto sin hacer uso de algún antibiograma como estudio previo para la debida identificación del agente y posteriormente realizar una terapia antimicrobiana/antifúngica/ antiparasitaria debida. Algunos de los síntomas pueden incluir el prurito intenso de oídos, secreción del canal auricular, mal olor, enrojecimiento, inflamación y dolor al tacto.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la poca información que se encuentra en el estado de Nuevo León acerca de los felinos con Virus de Inmunodeficiencia Felino y Virus de Leucemia Felino, en este trabajo se busca determinar la asociación entre aquellos felinos positivos a Virus de Inmunodeficiencia Felino y Virus de Leucemia Felino que presenten dermatopatías causadas por agentes fúngicos con importancia zoonótica y/o otitis provocadas por *Malassezia* spp. y *Cryptococcus*.

4. HIPÓTESIS

Los felinos positivos a FIV y/o FeLV son portadores de agentes fúngicos zoonóticos y cursan con otitis provocada por *Malassezia spp.* y/o *Cryptococcus*.

5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre aquellos felinos positivos a Virus de Inmunodeficiencia Felino y Virus de Leucemia Felino que presenten dermatopatías causadas por agentes fúngicos con importancia zoonótica y/o otitis provocadas por *Malassezia spp.* y *Cryptococcus*

5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar presencia de Virus de Inmunodeficiencia Felino y Virus de Leucemia Felina mediante pruebas SNAP y PCR.
2. Detectar la presencia de *Malassezia spp.* y *Cryptococcus* en pacientes con otitis. (positivos a uno o ambos virus).
3. Detectar la presencia de agentes fúngicos en gatos con dermatitis, positivos a uno o ambos virus.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

LUGAR DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Laboratorio de Genética ubicado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL.

Laboratorio de bacteriología y micología ubicado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL.

Clínicas veterinarias del sector privado.

ÁREA Y TIEMPO DE MUESTREO

Fueron muestreados 60 felinos (*Felis catus*) de los municipios San Nicolás de los Garza, Guadalupe, Apodaca, Monterrey y pesquería del estado de Nuevo León, en los periodos Agosto-Diciembre 2021 y Enero-Junio 2022. A cada felino se le tomaron muestras de sangre, hisopados de oídos para la obtención de cerumen e hisopado de cara-cuello-pecho. Todas las muestras obtenidas fueron procesadas en los laboratorios de microbiología y genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

METODOLOGÍA

6.1.1 Toma de muestras hisopado.

Las muestras fueron tomadas bajo ciertas condiciones del paciente; el paciente debía presentar descamación, así mismo no haber acudido a baño una a dos semanas atrás, presentar descamación (sospecha de problema fúngico). Se utilizaron hisopos estériles sin humedecer, con los cuales se le frotó en las zonas donde existiese más descamación o en su defecto en aquellas zonas donde frecuentan a existir los primeros signos dermatológicos en gatos, como lo son las orejas, nariz, cara, cuello, pecho, lomo y tren anterior. Inmediatamente se tomó la muestra, se almacenó en un tubo rojo sin aditivos añadidos, esto para poder conservar la muestra en humedad y sin que llegase a contaminarse. Se mantuvieron en refrigeración de 2-4°C en su transporte a laboratorio para su procesamiento.

6.1.2 Procesamiento de muestras hisopado

Se elaboró agar avena, los cuales fueron suplementados con oxitetraciclina (0.5g/Lt), este agar fue elaborado a base de agar dextrosa sabourand con avena molida previamente esterilizada, esto para ayudar a la esporulación de los hongos en los medios de cultivo. Para la siembra se realizó dentro de una campana de flujo con mechero, esto para evitar contaminaciones aéreas, se realizó una impronta del hisopo mediante rodamientos suaves en el agar o en su defecto se colocaron las escamas y pelo obtenido del felino. Posterior a su siembra se desinfectó la caja Petri en su exterior con alcohol y se selló con Parafilm. Ya sembradas las muestras y selladas con Parafilm se colocaron a incubar en estufa bacteriológica a 32°C. Todas las muestras se observaron cada tercer día para evitar contaminaciones, en caso de observar cajas Petri contaminadas se realizaba una resiembra de aquellos hongos que queríamos observar, esto durante 14-21 días, tiempo estimado de crecimiento fúngico. Posterior a esto se realizó un microcultivo, en el cual se esterilizaron cajas Petri junto con una “V” de vidrio para realizar la colocación del portaobjetos; Para dichos microcultivos se realizó un agar papa-dextrosa- sabourand, dicho agar fue colocado en cajas Petri para su enfriamiento con aproximadamente 0.3-0.5cm de grosor y cortado en cuadritos de 1cm*1cm, esto para que quedara firme en el cubreobjetos. Sobre estos cuadros de agar se colocaron pequeñas pociones de los hongos y finalmente se les cubrió

con un portaobjetos, esto con la finalidad que los portaobjetos queden impregnados de las diferentes estructuras fúngicas, evitando así la pérdida de muestra o visibilidad debido a la colocación de hongo-agar en las técnicas tradicionales de visualización de hongos; estos se dejaron incubar de 7-12 días a 32°C, posteriormente se retiró el cubreobjetos, al cual se le colocó una gota con azul de bromofenol y se fijó en un portaobjetos para así poder realizar la identificación mediante microscopio.

6.2.1 Toma de muestras hisopado ótico.

Las muestras fueron tomadas mediante un hisopado ótico, para esto fue necesario mantener a la mascota en posición esfinge o con ayuda de una bolsa de contención para felinos; se utilizaron hisopos estériles sin humedecer, con los cuales se tomó muestra de cerumen ótico haciendo ligera presión de forma circular en el conducto auditivo externo, esto para poder tomar lo máximo de muestra. Dichas muestras fueron etiquetadas igual que las muestras de hisopado de piel y las muestras sanguíneas. Se mantuvieron en refrigeración de 2-4°C en su transporte a laboratorio para su procesamiento.

6.2.1 Procesamiento de muestras hisopado ótico.

Todas las muestras de cerumen ótico fueron resuspendidas en 800 µl de agua destilada estéril, se agitaron durante 1 minuto en vórtex, se tomaron 500 µl de agua con cerumen suspendido en este; seguido de esto las muestras fueron etiquetadas para realizar extracción de ADN. se le añadieron 500 µl buffer de extracción, posteriormente se reserva a baño maría (65°C durante una hora); Saliendo del baño maría se añaden 500 µl de fenol-cloroformo (el cual fue previamente homogenizado) y se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos, pasado este tiempo se recolectan 350 µl del sobrenadante y se coloca en otro tubo eppendorf, al cual se le agregaron 65 µl acetato de sodio y 75 µl NaCl; se agitó suavemente por inversión y se coloca en congelador, a una temperatura de -20°C, durante 30 minutos, posteriormente, se retira del congelador y se lleva a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos; finalizado este tiempo se recolectaron 500 µl de sobrenadante, el

cual se colocaron en un tubo eppendorf nuevo junto con 270 µl de isopropanol y se dejó en congelación a -20°C durante 24 horas; pasado este tiempo nuevamente se llevó a centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 10 minutos. Como últimos pasos, se decanta todo el isopropanol para posteriormente añadir 500 µl de etanol al 70%, lleva nuevamente a centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos, Finalmente se decantó el isopropanol y se colocó en una estufa para secar a 37°C durante 15-30 minutos, Ya seco de residuos de alcohol se le colocaron 30 µl de TE. (Ferrer et al, 2001). Todos los productos de ADN fueron almacenados en congelación para posteriormente amplificar dichos productos mediante PCR convencional. Estas muestras fueron sometidas a la técnica de PCR con oligonucleótidos para la detección de *Malassezia spp.* (ver tabla 3) y *Cryptococcus* (ver tabla 4). Posteriormente a la técnica de PCR se realizó técnica de electroforesis a 120w durante 40 minutos con gel de agarosa al 1.5%, esto para observar aquellos productos que, si amplificaron en la PCR, los cuales son tomados como positivos;

| PATÓGENO | | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | | Elongación final | Conservación |
|------------------------|------|-------------------|--------------|-----------|-----|------------------|--------------|
| <i>Malassezia spp.</i> | 94° | 94° | 51° | 72° | 30x | 72° | 4° |
| | 5:00 | 0:45 | 1:00 | 3:00 | | 10:00 | ∞ |

Tabla 3. Protocolo de termociclador para PCR de *Malassezia spp.* (El termociclador fue configurado en grados centígrados).

| PATÓGENO | | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | | Elongación final | Conservación |
|---------------------|------|-------------------|--------------|-----------|-----|------------------|--------------|
| <i>Cryptococcus</i> | 94° | 94° | 65° | 72° | 34x | 72° | 4° |
| | 1:00 | 1:00 | 0:30 | 1:00 | | 15:00 | ∞ |

Tabla 4. Protocolo de termociclador para PCR de *Cryptococcus* (El termociclador fue configurado en grados centígrados)

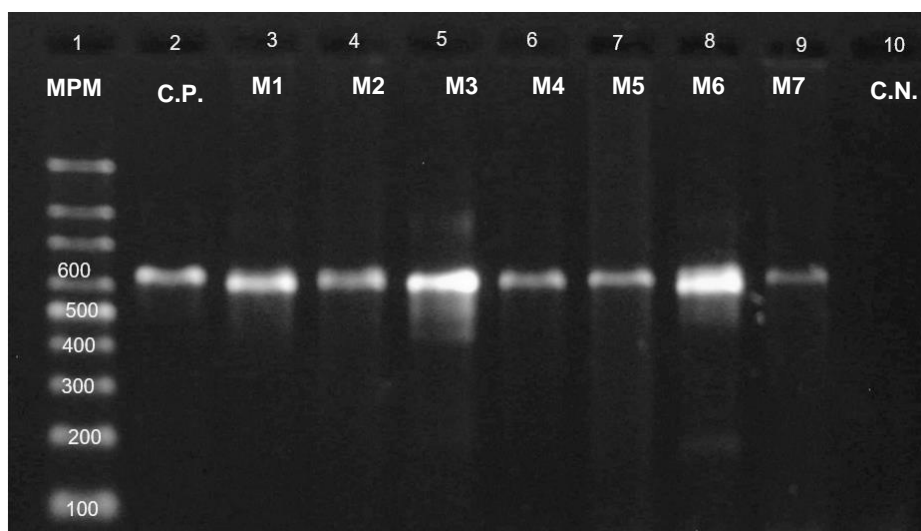


Ilustración 4. Productos amplificados a 600 pb de ADN de la región D1/D2 26S del DNA ribosomal de *Malassezia* spp..Carril 1 MPM, carril 2 control positivo(C.P.) carriles 3-9 muestras de oído izquierdo y derecho, carril 10 control negativo.

Primers para técnica PCR para la detección de nucleótidos de *Malassezia*. Spp. Y *Cryptococcus*

| PATÓGENO | PRIMER | SECUENCIA (5´-3´) | PRODUCTO (pb) | Accession GenBank |
|------------------------|---------|--------------------------|---------------|-------------------|
| <i>Malassezia</i> spp. | Forward | GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG | 600 | (Escareño, 2005) |
| | Reverse | GGTCCGTGTTTCAAGACGG | | |
| <i>Cryptococcus</i> | Forward | CCTTGCCGAAGTTCGAAACG | 387 | HM132030.1 |
| | Reverse | AATCGGTGGTTGGATTCAGTGT | | |

Tabla 5. Primers utilizados para la detección de *Malassezia* spp. y *Cryptococcus*, mediante PCR y electroforesis utilizando gel de agarosa al 1.5%.

6.3.1 Toma de muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas fueron tomadas mediante venopunción de la vena cefálica con catéter de 24G marca INTROCAN y depositadas en microtubos (capacidad de 1.3ml) suplementados con EDTA. Dicha muestra fue almacenada en refrigeración de 0-8°.

6.3.2 Procesamiento de muestras sanguíneas para detección de FIV

Posterior a la recolecta las muestras fueron etiquetadas para realizar extracción de ADN, esto bajo la técnica de fenol-cloroformo, en la cual inicialmente se realizó una lisis eritrocitaria, en la cual por cada 1 ml de sangre se añaden 4 ml de buffer lisis de eritrocitos (BLE) y se agita en vórtex durante 20 segundos, posteriormente se centrifuga a 8,000 rpm durante 7 minutos, se decanta el sobrenadante y se repite el proceso, esto hasta obtener un pellet claro. Ya obtenido el pellet claro se comienza con los pasos de la técnica tradicional de fenol cloroformo, en la cual se le añadieron 500 µl buffer de extracción, posteriormente se reserva a baño maría (65°C durante una hora); Saliendo del baño maría se añaden 500 µl de fenol- cloroformo (el cual fue previamente homogenizado) y se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos, pasado este tiempo se recolectan 350 µl del sobrenadante y se coloca en otro tubo eppendorf, al cual se le agregaron 65 µl acetato de sodio y 75 µl NaCl; se agitó suavemente por inversión y se coloca en congelador, a una temperatura de -20°C, durante 30 minutos, posteriormente, se retira del congelador y se lleva a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos; finalizado este tiempo se recolectaron 500 µl de sobrenadante, el cual se colocaron en un tubo eppendorf nuevo junto con 270 µl de isopropanol y se dejó en congelación a -20°C durante 24 horas; pasado este tiempo nuevamente se llevó a centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 10 minutos. Como últimos pasos, se decanta todo el isopropanol para posteriormente añadir 500 µl de etanol al 70%, lleva nuevamente a centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos, Finalmente se decantó el isopropanol y se colocó en una estufa para secar a 37°C durante 15-30 minutos, Ya seco de residuos de alcohol se colocaron 30 µl de TE. (Ferrer et al, 2001). Todos los productos de ADN fueron almacenados en congelación para posteriormente amplificar dichos productos mediante PCR convencional. Estas muestras fueron sometidas a la técnica de PCR con oligonucleótidos para la detección de Virus Inmunodeficiencia Felino (véase tabla 5). Posteriormente a la técnica de PCR se realizó técnica de electroforesis a 120w durante 90 minutos con gel de agarosa al 1.5%, esto para observar aquellos productos que, si amplificaron en la PCR, los cuales son tomados como positivos. Se logró realizar prueba SNAP SNAP Ab FIV/ Ag FeLV marca BIONOTE a 30 de los felinos muestreados.

| PATÓGENO | | | | | 34x | Elongación final | Conservación |
|---|-------------------|--------------|-----------|------|-----|------------------|--------------|
| | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | | | | |
| Virus Inmunodeficiencia Felino Virus Leucemia Felino | 95° | 95° | 57° | 72° | | 72° | 12° |
| | 3:00 | 0:30 | 0:30 | 1:00 | | 5:00 | ∞ |

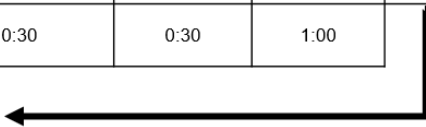


Tabla 6. Protocolo de termociclador para PCR de los patógenos FIV/ FeLV (El termociclador fue configurado en grados centígrados).

6.3.3 Procesamiento de muestras sanguíneas para detección de FeLV

Posterior a la recolecta las muestras fueron etiquetadas para realizar extracción de ADN. Esta se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, ya obtenido el sedimento con el sobrenadante se le agregó 0.50 ml de trizol. Se dejó reposar en refrigeración durante 40 minutos. Seguido de la estabilización con TRIZOL se realizó una extracción de ADN con técnica de fenol- cloroformo, pasando directamente a las sales, se tomaron 350 µl del sobrenadante y se le agregaron 65 µl acetato de sodio y 75 µl NaCl; se agitó suavemente por inversión y se coloca en congelador, a una temperatura de - 20°C, durante 30 minutos, posteriormente, se retira del congelador y se lleva a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos; finalizado este tiempo se recolectaron 500 µl de sobrenadante, el cual se colocaron en un tubo eppendorf nuevo junto con 270 µl de isopropanol y se dejó en congelación a -20°C durante 24 horas; pasado este tiempo nuevamente se llevó a centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 10 minutos. Como últimos pasos, se decanta todo el isopropanol para posteriormente añadir 500 µl de etanol al 70%, lleva nuevamente a centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos, Finalmente se decantó el isopropanol y se colocó en una estufa para secar a 37°C durante 15-30 minutos, Ya seco de residuos de alcohol se colocaron 30 µl de TE. (Ferrer et al, 2001). Todos los productos de ADN fueron almacenados en congelación para posteriormente amplificar dichos productos mediante PCR convencional. Estas muestras fueron sometidas a la técnica de PCR con oligonucleótidos para la detección de Virus Leucemia

Felino (véase tabla 5). Posteriormente a la técnica de PCR se realizó técnica de electroforesis a 120w durante 90 minutos con gel de agarosa al 1.5%, esto para observar aquellos productos que, si amplificaron en la PCR, los cuales son tomados como positivos.

6.4.4 Estandarización de control positivo gen *gdp1 felis catus* y cuantificación de DNA.

Como método de control de calidad de las muestras se realizó una cuantificación de DNA mediante espectrofotómetro EPOCH, en el cual se busca que las muestras tuviesen 1.4 ng/uL- 2.0 ng/uL para ser considerada muestra con buen contenido de ADN y pudiese ser procesado para la técnica de PCR. Dicha estandarización es para poder mantener un buen control de calidad de las muestras.

Así mismo se realizó la técnica de PCR con primers para detección de *Felis catus* (véase tabla 6)

Primers para técnica PCR para la detección de nucleótidos de *Felis catus*

| PATÓGENO | PRIMER | SECUENCIA (5'-3') | PRODUCTO (pb) | Accession GenBank |
|-------------------------|---------|---------------------|---------------|-------------------|
| Gdp1 <i>Felis catus</i> | Forward | GTGGAGAGGGAATGTATTT | 514 | |
| | Reverse | CCTTCTTCCCATCCTACAC | | |

Tabla 7. Primers utilizados para control positivo del gen *felis catus* (*Gdp1*), mediante PCR y electroforesis utilizando gel de agarosa al 1.5%.

Primers para técnica PCR para la detección de nucleótidos de Virus de Inmunodeficiencia felino y Virus de Leucemia felino

| PATÓGENO | PRIMER | SECUENCIA (5'-3') | PRODUCTO (pb) | Accession GenBank |
|--------------------------------|---------|--------------------|---------------|---------------------------|
| Virus Inmunodeficiencia Felino | Forward | CTAGGAGGTGAGGAAGTT | 224 | X57002.1 |
| | Reverse | GCTTGTTGTTCTTGAGTT | | |
| Virus Leucemia Felino | Forward | CCAGAATGAGGGGAACA | 212 | (LIU <i>et al</i> , 2020) |
| | Reverse | CGTGCCTGACATATAGC | | |

Tabla 8. Primers utilizados para la detección de FIV/ FeLV, mediante PCR y electroforesis utilizando gel de agarosa al 1.5%.

6.4.2 Estandarización de controles positivos FeLV.

Se realizó una extracción de ADN de vacuna Leukocell marca Virbac, la cepa de esta es Kawakami- Theilen. Esta se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, ya obtenido el sedimento con el sobrenadante se le agregó 0.50 ml de trizol. Se dejó reposar en refrigeración durante 40 minutos. Seguido de la estabilización con TRIzol se realizó una extracción de ADN con técnica de fenol- cloroformo, se recolectaron 350 μ l del sobrenadante y se colocaron en otro tubo eppendorf, al cual se le agregaron 65 μ l acetato de sodio y 75 μ l NaCl; se agitó suavemente por inversión y fue colocado en congelador, a una temperatura de -20°C , durante 30 minutos, posteriormente, se retira del congelador y se lleva a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos; finalizado este tiempo se recolectaron 500 μ l de sobrenadante, el cual se colocaron en un tubo eppendorf nuevo junto con 270 μ l de isopropanol y se dejó en congelación a -20°C durante 24 horas; pasado este tiempo nuevamente se llevó a centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 10 minutos. Como últimos pasos, se decanta todo el isopropanol para posteriormente añadir 500 μ l de etanol al 70%, lleva nuevamente a centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos, Finalmente se decantó el isopropanol y se colocó en una estufa para secar a 37°C durante 15-30 minutos, Ya seco de residuos de alcohol se le colocaron 30 μ l de agua libre de nucleasas. Ya con los tubos eppendorf con ADN se cuantificó la cantidad de DNA del cual se obtuvieron dsDNA 1.10 ng/uL y dsDNA 1.58 ng/uL. Finalmente se realizó una electroforesis con gel de agarosa 1.5%, en la cual se logró observar el control positivo a 212bp (Ver ilustración 3).

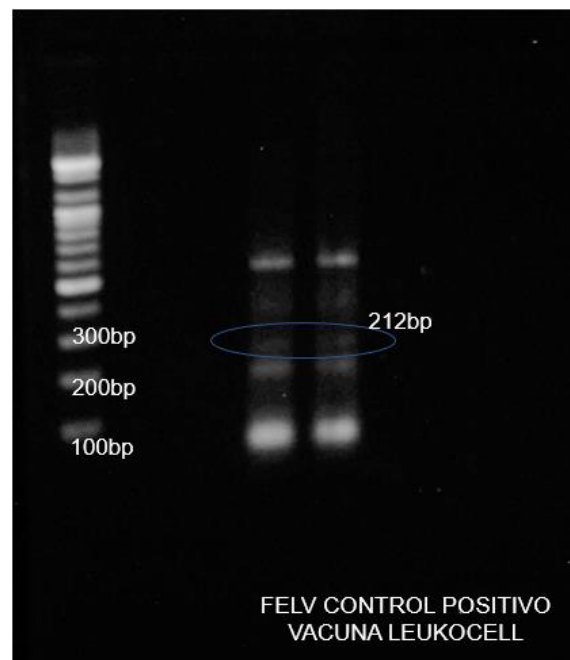


Ilustración 5. Estandarización control positivo FeLV. Gel de agarosa 1.5% donde se realizó electroforesis para la visualización de PCR mediante extracción de ADN de vacuna Leukocell Virbac.

6.4.3 Estandarización de control positivo FIV

Se realizó una extracción de ADN de muestra sanguínea de un paciente que resultó positivo a FIV en tres pruebas SNAP, las cuales se le realizaron con un intervalo de 8 días entre cada una. La técnica de extracción de ADN fue mediante fenol-cloroformo, ya obtenido el material genético se realizó una PCR (véase tabla 6. Protocolo de termociclador) con los primers para FIV (véase tabla 5), finalizado el proceso en el termociclador las muestras fueron mezcladas con 2 μ l de ABG, 2 μ l de gel red y 2 μ l de muestra de DNA; estos fueron mezclados mediante ligero pipeteo. Teniendo listo el gel de agarosa (con pocillos desmoldados) fue colocado en cámara de electroforesis junto con Buffer al 1%, la cual se mantuvo a 120w durante 40 minutos. Finalizado el tiempo se llevó a la cámara con luz UV para visualizar los productos amplificados, los cuales amplificaron a 224 pb.

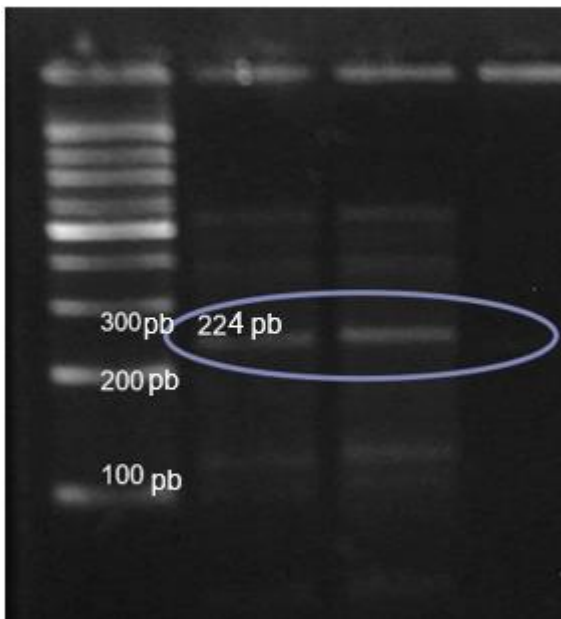


Ilustración 6. Gradiente FIV. Amplificación de productos a 224 pb; control positivo a partir de muestra de ADN de felino positivo a FIV.

7. RESULTADOS

7.1. Inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa de Virus de Inmunodeficiencia Felino y Virus de Leucemia Felino

De los 60 felinos muestreados solamente a 33 de ellos se les realizó ensayo inmunocromatográfico para la detección cualitativa de FIV/ FeLV. Como resultado de esto podemos observar que se obtuvieron un mayor número de resultados negativos en detección de FIV; con FeLV podemos observar que es mayor el número de resultados positivos que negativos (véase ilustración 3), de dichos resultados solamente 7 de 30 son positivos a ambos agentes virales en el ensayo inmunocromatográfico.

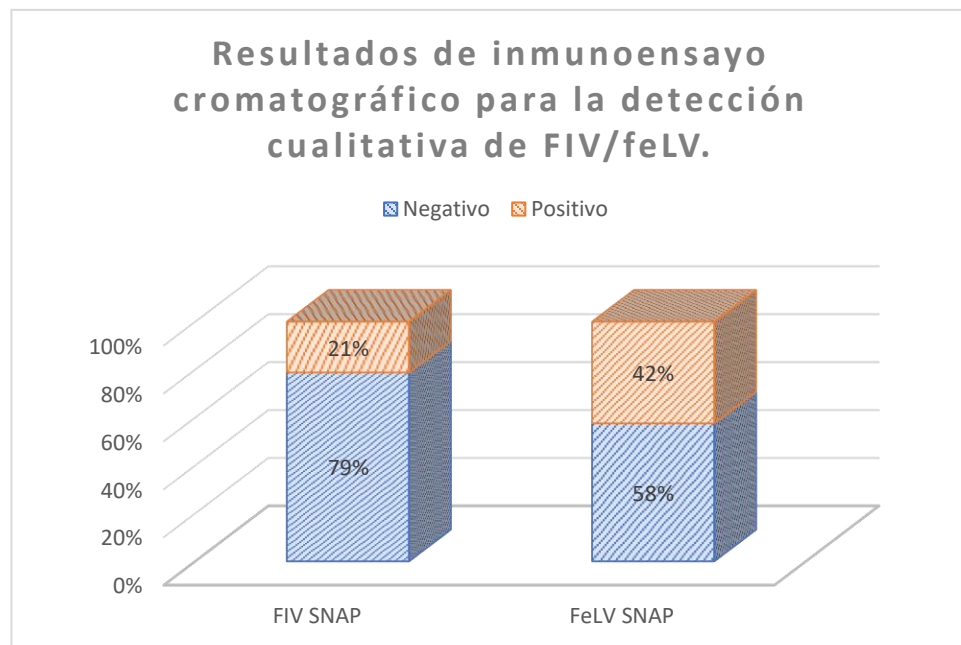


Tabla 9. Resultado de inmunoensayo cromatográfico para la detección de FIV.

7.2. PCR y electroforesis FIV de muestras con inmunoensayo cromatográfico.

De las extracciones de ADN de muestras de sangre completa se realizó la técnica de PCR convencional (véase la tabla 6) con primers específicos para la detección de FIV (véase tabla 6), para verificar los resultados de dicha técnica se realizó electroforesis. Se observó que con la técnica de PCR la detección de FIV es más certera, esto, ya que se obtuvo un 56.66% como resultado positivo, esto ya que felinos en fase aguda pueden ser negativos al inmunoensayo cromatográfico, sin embargo, ser positivos a la prueba PCR. Para poder obtener buenos resultados en una PCR para detección de FIV encontramos que es ideal una extracción de ADN a partir de sangre completa; se ha demostrado que este virus es epiteliotrópico y puede llegar a infectar también los eritrocitos bajando así los niveles de hemoglobina y eritrocitos (Hart & Nolte, 1995), por lo cual, lo hace un virus más estable al momento de la extracción de ADN; así mismo, no se necesita mucho cuidado de temperaturas frías para mantener estable dicha extracción. De los 33 pacientes muestreados, 6 pacientes resultaron positivos a ambas pruebas, tanto ensayo inmunocromatográfico como a PCR, solo uno resultó positivo en el ensayo inmunocromatográfico pero negativo a la PCR; Resultaron 15 aquellos negativos al ensayo inmunocromatográfico pero positivos al PCR y finalmente de los negativos en el ensayo inmunocromatográfico y negativos en la PCR fueron 11 felinos. La prevalencia del grupo enfermo es de 63.64%. el nivel de significancia del grupo es de $p=0.1713$, por lo tanto, no se observó diferencia significativa.

Resultados PCR-electroforesis para detección FIV mediante sangre completa

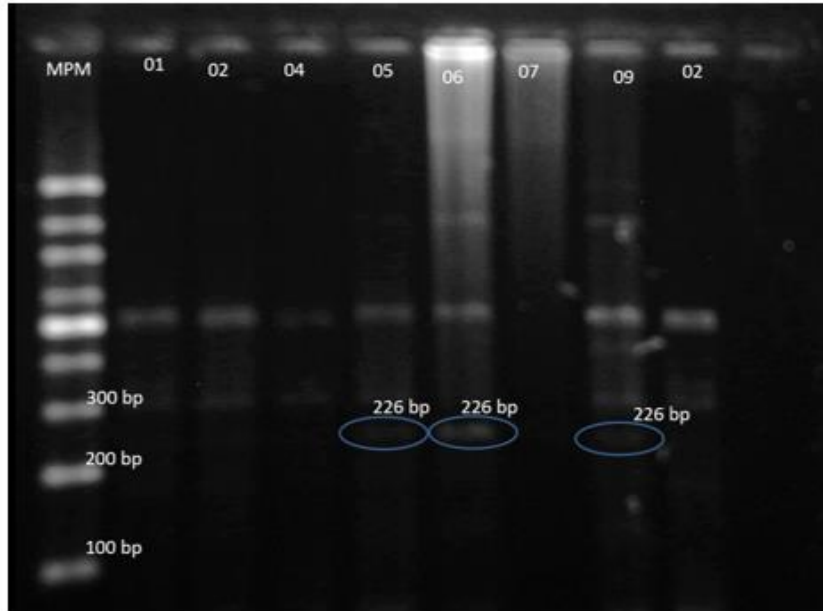


Ilustración 7. Resultados PCR- electroforesis para detección de FIV mediante sangre completa. Carril 1: MPM, carril 2 al 8 muestras, carril 9 control negativo.

Tabla resultados FIV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico

| | SNAP FIV POSITIVO | SNAP FIV NEGATIVO | TOTAL |
|------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| PCR FIV POSITIVO | 6 | 15 | 21 63.64% |
| PCR FIV NEGATIVO | 1 | 11 | 12 36.36% |
| TOTAL | 7 21.2% | 26 78.79% | 33 100% |

Tabla 10. Tabla resultados FIV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico. Aquellos verdaderamente positivos son 21, de estos 15 resultaron negativos al inmunoensayo cromatográfico y solamente 6 resultaron positivos. Los verdaderos negativos son 12, de los cuales 11 resultaron negativos a ambas pruebas y uno dio falso positivo en el ensayo inmunocromatográfico.

7.3. PCR y electroforesis FeLV de muestras con inmunoensayo cromatográfico.

De las extracciones de ADN de muestras de suero sanguíneo (línea celular blanca) se realizó la técnica de PCR convencional (véase la tabla 6) con primers específicos para la detección de FeLV (véase tabla 6), para verificar los resultados de dicha técnica se realizó electroforesis. En el cual se observó que de los 14 resultados positivos en el inmunoensayo cromatográfico solamente tres muestras resultaron positivas en la técnica de PCR, esto debido a los estadios infecciosos del virus, ya que, en la fase inicial o aguda de la

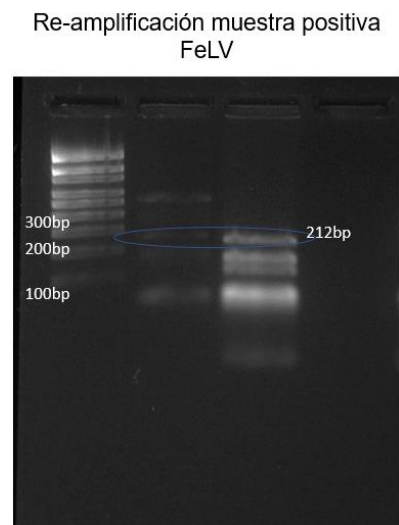


Ilustración 8. Reamplificación de muestra positiva a FeLV, mediante extracción de ADN de linfocitos (células blancas), con la técnica fenol- cloroformo y electroforésis con gel de agarosa 1.5%.

infección, la enfermedad es detectable mediante el inmunoensayo cromatográfico, cuando la enfermedad se encuentra en fase persistente/ persistentemente infectante es cuando puede ser detectada mediante técnica PCR/ inmunoensayo cromatográfico, ya que se aloja en cualquier fluidos o tejido, de los cuales se puede tomar muestra de saliva, heces, conjuntiva y sangre y los pacientes saldrán positivos. De los resultados positivos se realizó una reamplificación para poder obtener una imagen más nítida. Cabe resaltar que para poder obtener

resultados en PCR para detección de FeLV, se debe realizar la extracción de ADN a partir de suero sanguíneo y no sangre completa, ya que así evitamos una desestabilización de los linfocitos pudiendo obtener el mayor material genético a partir de estos sin tener contaminaciones eritrocitarias. De los 33 pacientes muestreados, 2 pacientes resultaron positivos a ambas pruebas, tanto ensayo inmunocromatográfico como a PCR, 12 resultó positivo en el ensayo inmunocromatográfico pero negativo a la PCR; No se observaron resultados negativos al ensayo inmunocromatográfico pero positivos al PCR y finalmente de los negativos en el ensayo inmunocromatográfico y negativos en la PCR fueron 19 felinos. Chi cuadrada es igual a 4.68. El nivel de significancia del grupo es de $p=3.84$, por lo tanto, no se observó diferencia significativa. Como el valor de la chi-cuadrado obtenido es mayor que el valor crítico, podemos rechazar la hipótesis nula de que no hay asociación entre las variables.

Podemos concluir que hay una asociación significativa entre el resultado del ensayo inmunocromatográfico y el resultado de la PCR en los pacientes evaluados.

Tabla resultados FeLV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico

| | SNAP FeLV POSITIVO | SANP FeLV NEGATIVO | TOTAL |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| PCR FeLV POSITIVO | 2 | 0 | 2 6.06% |
| PCR FeLV NEGATIVO | 12 | 19 | 31 93.94% |
| TOTAL | 14 42.42% | 19 57.58% | 33 100% |

Tabla 11. Tabla resultados FeLV, mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico. Los verdaderos positivos son 2, los cuales resultaron positivos a ambas pruebas, Aquellos resultantes positivos en el inmunoensayo cromatográfico pero negativos en PCR son 12. Verdaderos negativos resultaron 19. Cabe mencionar que para detección temprano de FeLV como se realizó en dicho trabajo es más acertado el inmunoensayo cromatográfico que la prueba PCR.

7.4 PCR como método de detección de FIV/FeLV en sangre de felinos

De las extracciones de ADN de muestras de suero sanguíneo (línea celular blanca) y sangre completa, se realizó la técnica de PCR convencional (véase la tabla 6) con primers específicos para la detección de FIV/ FeLV (véase tabla 6), para verificar los resultados de dicha técnica se realizó electroforesis. De los 60 pacientes que fueron muestreados se obtuvieron los siguientes resultados, en los cuales se obtuvo un total de 32 felinos positivos a FIV y 28 negativos. En comparación con FeLV el cual se obtuvieron 4 felinos positivos a FeLV y 56 negativos (véase tabla 12).

Tabla resultados FIV/ FeLV, mediante prueba PCR

| | PCR FIV POSITIVO | PCR FIV NEGATIVO | TOTAL |
|-------------------|------------------|------------------|--------------|
| PCR FeLV POSITIVO | 4 | 0 | 4 6.66% |
| PCR FeLV NEGATIVO | 28 | 28 | 56 93.33% |
| TOTAL | 32 53.3% | 28 46.7% | 60 100% |

Tabla 12. Resultados PCR y electroforésis para detección de FIV/ FeLV.

7.5. PCR como método de detección de *Cryptococcus* spp. en otitis.

De los 60 pacientes muestreados, 11 felinos resultaron positivos siendo de vivienda interior, 15 siendo de vivienda exterior y 16 siendo de ambos tipos de vivienda, dando un total de 45 felinos positivos a *Cryptococcus* spp; de aquellos negativos 7 son de vivienda interior, 5 de vivienda exterior y 6 son de ambos tipos de viviendas, dando un total de 18 felinos negativos a *Cryptococcus* spp. $X^2=3.655$, nivel de significancia del grupo es de $p=5.991$. se puede concluir que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de que no hay asociación entre la ubicación y el resultado de la prueba de *Cryptococcus* spp. en los individuos. Es decir, no hay diferencias significativas en los resultados de la prueba de *Cryptococcus* spp. según la ubicación de los individuos. Con esto podemos observar que no se puede afirmar que las variables cualitativas estén significativamente asociadas. A pesar de que los resultados de la gráfica sean notables, no podemos asegurar que exista una correlación entre su tipo de vivienda y la presencia de *Cryptococcus* spp. Sin embargo, podemos observar que aquellos que tienen contacto con el ambiente externo son mayor portadores de este microorganismo, esto ya que se puede tomar de zonas contaminadas y/o zonas públicas, posteriormente por el tipo de higiene del felino o con el rascado este puede hacer que este se albergue en la piel ya sea como comensal o como patógeno.

Tabla resultados *Cryptococcus* spp. mediante PCR y su incidencia con el tipo de ambiente/ vivienda

| | PCR <i>Cryptococcus</i> POSITIVO | PCR <i>Cryptococcus</i> NEGATIVO | |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| INTERIOR | 11 | 7 | 18 30.00% |
| EXTERIOR | 15 | 5 | 20 33.33% |
| AMBOS | 16 | 6 | 22 36.67% |
| | 42 70.00% | 18 30.00% | 60 100% |

Tabla 13. Tabla resultados de *Cryptococcus* spp. y su incidencia con el tipo de ambiente/ vivienda. Se observó una mayor presencia del patógeno en aquellos felinos que tienen acceso al exterior (parques, calle, áreas comunes, etc.) Como dicho patógeno no es posible compararlo con alguna otra técnica, es por eso

por lo que en este trabajo nos basamos en el tipo de ambiente en el que normalmente anda el felino para tabular la incidencia del patógeno.

Resultados PCR/ electroforesis para detección de *Cryptococcus* spp.

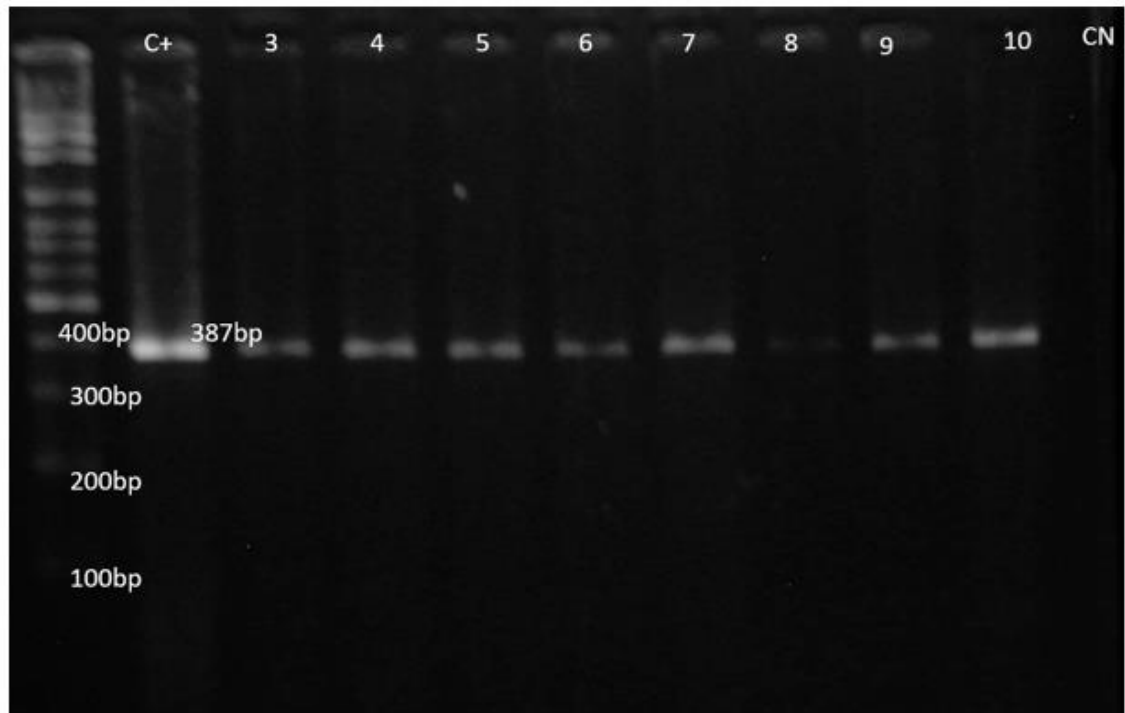


Ilustración 9. Imagen de resultados de técnica PCR para detección de *Cryptococcus* spp. mediante electroforesis en agarosa 1.5%.

7.6. PCR como método de detección de *Malassezia* spp. en otitis.

De los 60 pacientes muestreados, 13 felinos resultaron positivos siendo de vivienda interior, 18 siendo de vivienda exterior y 19 siendo de ambos tipos de vivienda; de aquellos negativos 5 son de vivienda interior, 2 de vivienda exterior y 3 son de ambos tipos de viviendas. $X^2=8.11$, nivel de significancia del grupo es de $p=5.99$. Como nuestra chi cuadrada calculada (8.11) es mayor que el valor crítico (5.99), podemos rechazar la hipótesis nula de que no hay relación entre la ubicación y el resultado de la prueba de *Malassezia* spp. Por lo tanto, concluimos que hay una asociación significativa entre la ubicación y el resultado de la prueba de *Malassezia* spp.

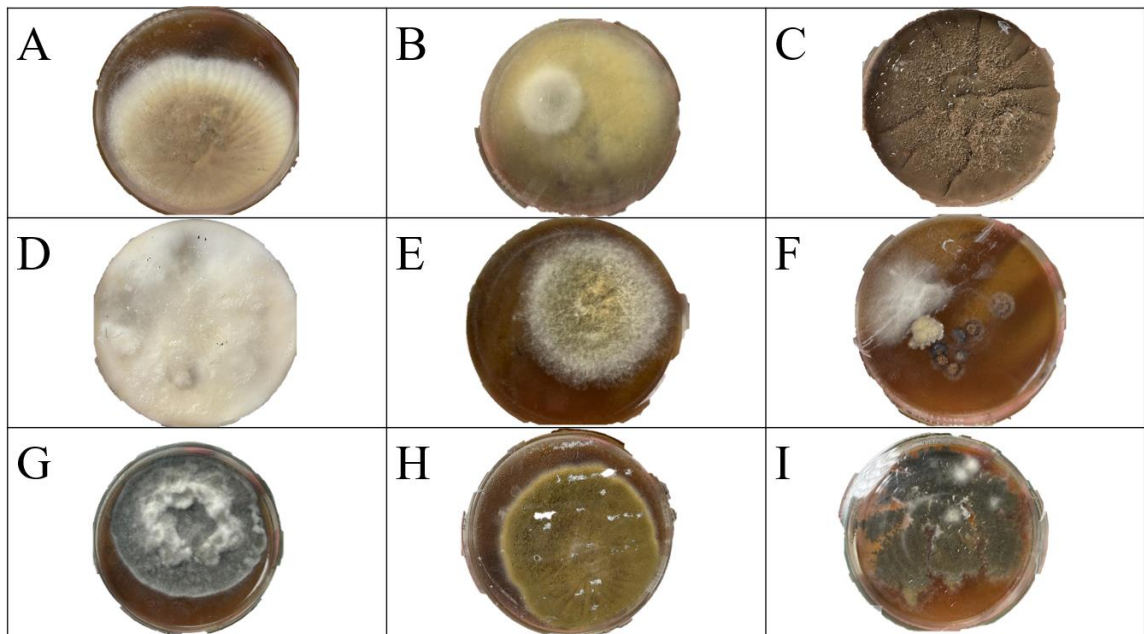
Tabla resultados *Malassezia* spp. mediante PCR y su incidencia con el tipo de ambiente/ vivienda

| | PCR <i>Malassezia</i> spp. POSITIVO | PCR <i>Malassezia</i> spp. NEGATIVO | |
|----------|--|--|--------------|
| INTERIOR | 13 | 5 | 18 30.00% |
| EXTERIOR | 18 | 2 | 20 33.33% |
| AMBOS | 19 | 3 | 22 36.67% |
| | 50 83.33 % | 10 16.67% | 60 100% |

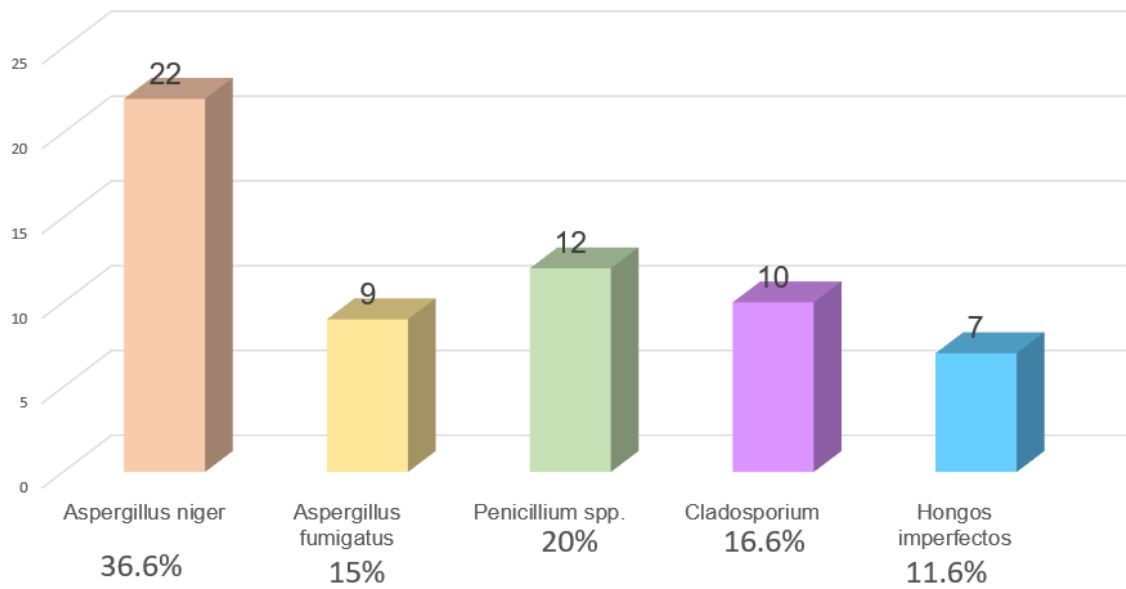
Tabla 14. Tabla de resultados de *Malassezia* spp. y su incidencia con el tipo de ambiente/ vivienda. Se observó una mayor presencia del patógeno en aquellos felinos que tienen acceso al exterior (parques, calle, áreas comunes, etc.) Como dicho patógeno no es posible compararlo con alguna otra técnica, es por eso por lo que en este trabajo nos basamos en el tipo de ambiente en el que normalmente anda el felino para tabular la incidencia del patógeno.

7.7. Cultivos micológicos a partir de descamaciones corporales

De los cultivos realizados en agar avena, los cuales proveen de la suficiente humedad al hongo para una pronta esporulación y rápido crecimiento de colonias (Boerjesson et al., 1993) (Zhao et al., 2022) el cual lo pudimos observar a partir del tercer día de siembra, en el cual muchas de las muestras fueron catalogadas como hongos imperfectos, esto debido a que su esporulación o crecimiento no denotaba ser característico de ningún hongo conocido, al séptimo día en casi la mayoría de las muestras ya se había obtenido una colonia considerable, para la cual ya se podía catalogar el tipo de hongo. En nuestro trabajo se observó una gran presencia de *Aspergillus* spp. con el 51.6% de los resultados, así mismo se observó crecimiento de otros hongos como *Penicillium* spp con un 20%, *Cladosporium* spp. con un 16.6 % de incidencia y finalmente un 11.6 % de hongos imperfectos, los cuales fueron denominados así ya que pese a llevar más de 15 días en incubación y existir crecimiento de colonias, al momento de la observación bajo microscopio no presentan una morfología exacta.



Cultivos micológicos a partir de descamaciones corporales



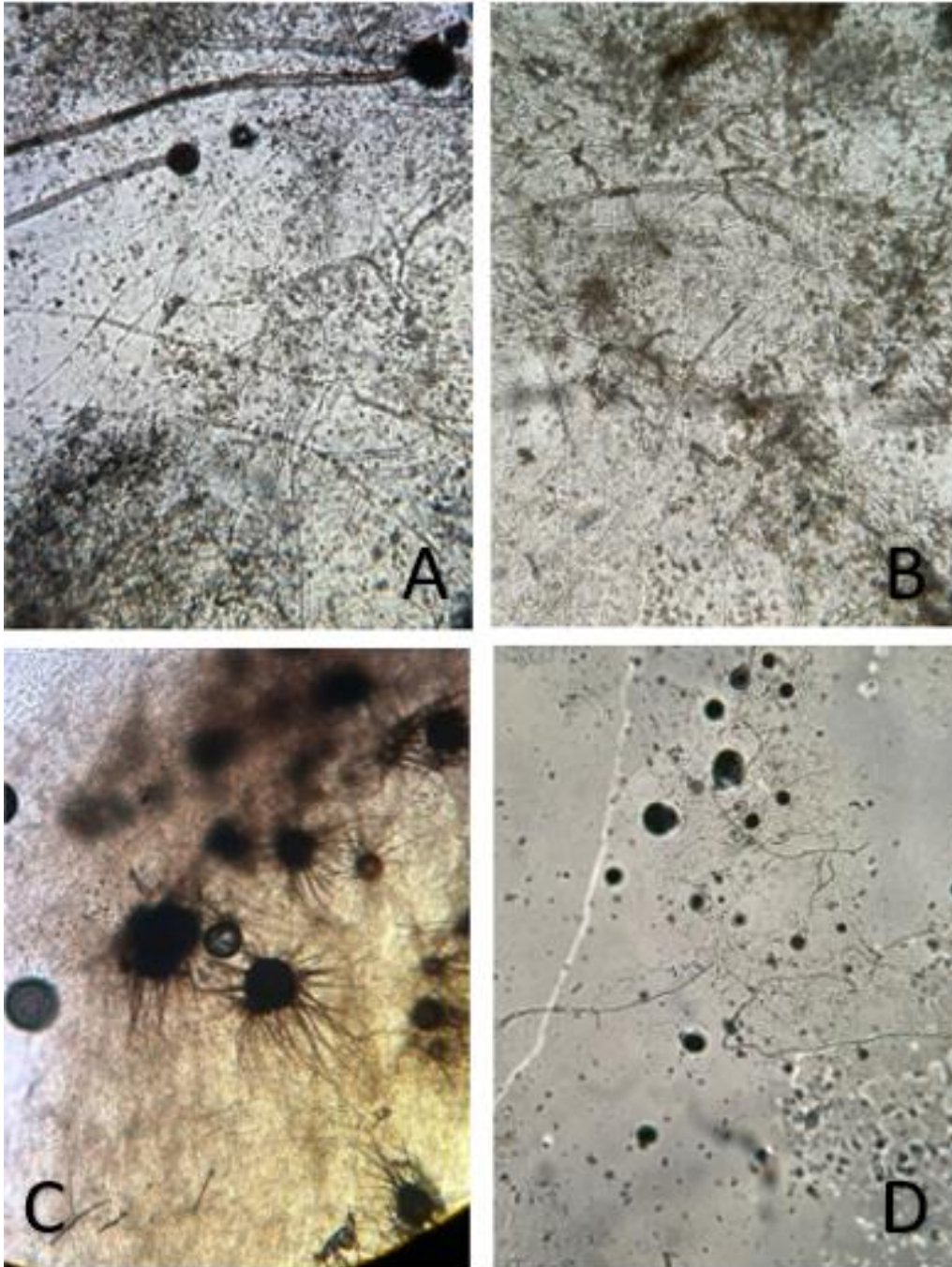


Ilustración 10. Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico a 10x, con tinción azul de bromofenol. A,B) *Aspergillus niger*, C) Hifas imperfectas/ hongo imperfecto, D) *Cladosporium* spp.

8. DISCUSIÓN

En investigaciones anteriores Sierra et al (2000) encontraron que los patógenos mayormente encontrados en su trabajo fueron *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Malassezia* spp., *Microsporum* spp y *Cryptococcus* spp.; Las muestras tomadas fueron de oídos y descamaciones corporales en ambientes estériles tal y como ellos lo realizaron; esto para recudir el riesgo de sesgo y poder realizar una mejor comparativa en cuestión de las zonas geográficas y climatológicas, de lo cual se obtuvo un gran resultado de *Aspergillus nigger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp. esto pudo ser provocado por el tipo de condiciones climatológicas y el tipo de enfermedad sistémica que son capaces de inmunosuprimir el sistema inmunológico dermatológico, sin embargo, se encontró un 11.6% de hongos imperfectos, los cuales provenían de muestras positivas en lámpara de Wood (método de detección rápida de algunos hongos como *T. mentagrophytes*, *M. canis* en consultorio, con lo cual pudiéramos tener un indicio de dichos hongos, pese a tener todas las condiciones específicas para que dichos hongos creciesen tales como un medio estéril (siembra en campana de flujo), agar suplementado con antibiótico y avena estéril; Así mismo cabe destacar que dichos hongos (*Aspergillus nigger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp.) pueden ser causantes de severas infecciones fúngicas tanto dermatológicas como ungueales en el ser humano, esto por el contacto con las lesiones ya sea de los animales o con escamas infectadas de los mismos (Umme et al, 2011). Ruiz y colaboradores realizaron un trabajo en el cual aislaron hongos dermatofitos y hongos no dermatofitos, en felinos con infecciones y coinfecciones por FIV/ FeLV, de los cuales un 68.6% resultó positivo a presencia de algún dermatofito, ellos mencionan que existe una asociación entre la positividad de FIV/ FeLV y la presencia de estos dermatofitos; comparado con nuestro trabajo donde si se obtuvo gran presencia de hongos no dermatofitos causantes de lesiones en los cuales observamos asociación entre la positividad de FIV/ FeLV y la presencia de estos. Sin embargo, una de las causas por las cuales no pudiéramos encontrar tantos casos provocados por *M. canis* pudiese ser que las condiciones climatológicas en las que se realizaron dichos estudios.

En últimas investigaciones se ha descubierto que *Cryptococcus* ha ido en aumento en problemas zoonóticos, los cuales han alarmado fuertemente a la sociedad médica, tanto veterinaria como humana, esto debido a que se ha visto un gran número de pacientes positivos a VIH, enfermedades autoinmunes, con problemas causados por *Cryptococcus* spp. claro está que no solamente en humanos, ya que se ha documentado en animales también, sin embargo, se ha observado que existe muy poca documentación en felinos, en este trabajo nos avocamos a buscar la presencia de *Cryptococcus* spp. en procesos de otitis. Uno de los principales transmisores de este patógeno en felinos son las aves (principalmente el sistema digestivo o sus heces), ya que el felino al ser cazador nato y con acceso al exterior tienden a cazar este tipo de animales, ya sea por hambre o por instinto, afilar sus garras en los árboles, caminar sobre la tierra contaminada. Se observó un 70% de positividad en los 60 felinos, de los cuales la mayoría tenía la tendencia de salir de casa hacia parques o contacto con otro tipo de animales, sin embargo, Reis y colaboradores (2021) mencionan que Norte América es una de las zonas con mayores problemas con *Cryptococcus* spp., Uno de los principales causantes de transmisión es en base al comportamiento felino, como se mencionó anteriormente; así mismo zonas contaminadas o mal manejo de higiene. Se ha observado en perros y gatos una mayor participación de lesiones causadas por *Cryptococcus* spp. en lesiones oro-nasales y digestivas, ya que tienden a oler el suelo o los animales que cazan. En nuestro estudio los sitios de aislamiento fue cerumen ótico proveniente de infecciones (otitis), lo cual se clasifica como una zona atípica de aparición; Así mismo Reis y colaboradores comentan que las afecciones dermatológicas óticas no se encuentran en registros o son muy pocos los registros de estos, por lo cual es un campo de investigación en el cual se pudiera profundizar. Por otro lado, Paulin y colaboradores (2013) comentan que la otitis media o media externa provocada por *Cryptococcus* spp. puede ingresar vía hemática, lo cual deja como vías de infección las rutas oro-nasal, digestivo y cutánea; siendo la primera la más común causando lesiones tumorales altamente invasivos.

Sánchez y colaboradores (2016) describieron el problema que causa una baja en células blancas, esto causa que cualquier agente habitante normal de la microbiota de la piel puede llegar a ser microorganismos patógeno, ya que no se mantiene el equilibrio homeostático; el cual puede verse afectado por infecciones virales, en gatos dos de las infecciones virales

de mayor ocurrencia y permanencia en el sistema inmune son FIV/ FeLV (Fenner,2012). Cavalcante y colaboradores (2018) mencionan que para poder encontrar FeLV en sangre mediante técnica de PCR debe estar en el periodo de latencia del virus, sin embargo en nuestro trabajo observamos que el felino debe estar en periodo de viremia, sin embargo, se observó que algunos de los felinos muestreados, pese a presentar sinología y resultar positivos en el ensayo inmunocromatográfico la prueba PCR resulta negativa, esto ya que posiblemente la toma de muestra fue muy temprana o inclusive la viremia no era tan alta por ser inicio infeccioso en el cual solamente se puede detectar mediante prueba rápida; Así mismo, se observó que al menos para FeLV , la prueba que detectó más positivos fue el ensayo inmunocromatográfico. Se tienen registros donde FIV es capaz de causar anemia o de infectar eritrocitos ya que la infección viral y latencia ocurre mediante contacto con sangre infectada principalmente, es por esto por lo que se cree que se puede realizar una prueba PCR a través de sangre completa y obtener resultados positivos, en nuestro trabajo realizamos técnica de extracción de ADN para identificación de FIV para lo cual se obtuvieron óptimos resultados en la PCR y electroforesis a través de este tipo de extracción de ADN (Eckstrand et al, 2017). Así mismo pudimos rectificar lo que Eckstrand y colaboradores mencionan, ya que para un mejor manejo de las muestras se debe realizar una extracción de ADN de sangre completa para la correcta detección de FIV mediante PCR y electroforesis , comparado con FeLV , en el cual no tiene tropismo por otras células más que aquellas de línea blanca como ya se ha revisado en los estudios de Suhito et al,2008; Willett et al 2013;Chiu et al 2018.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo pudimos observar la eficiencia de los ensayos inmunocromatográficos como método de detección de FIV progresivo y de FeLV en estadios iniciales de la infección. Así mismo podemos asegurar que la PCR sigue siendo la prueba de oro para detección de enfermedades tanto virales como de levaduras. Uno de los hallazgos más importantes en cuestión del método de extracción de ADN para la detección de FIV, se debe realizar extracción de sangre completa para obtener el mayor material genético posible; en cuestión de FeLV es indispensable que la extracción sea a partir de células blancas, (leucocitos). Por otra parte, logramos realizar un registro de datos respecto a *Cryptococcus* spp. y su detección en zonas donde no se tiene material bibliográfico, en el canal ótico felino, pudiera ser tomado como una simbiosis, sin embargo, también pudiera ser tomado como agente causal de otitis. Se tienen registros donde *Malassezia* spp. llega a estar en simbiosis con la piel del felino, sin embargo, en cuestión de otitis llega a ser uno de los principales agentes causales. La temporada climática otoño invierno llega a ser una de las más propensas a que los felinos lleguen a presentar problemas como otitis y dermatosis, esto debido a la humedad que puede llegar a generar el propio acicalamiento del felino. Así mismo se ha demostrado que pese a tener las mismas condiciones climáticas que los trabajos anteriormente realizados podemos no obtener los mismos resultados ya que podría variar el tipo de patógeno.

10. PERSPECTIVA

Esperamos este trabajo sea parteaguas de otros en puerta los cuales puedan aumentar la literatura en cuestión de felinos a nivel global, que puedan ayudar a seguir creciendo la comunidad de investigación en dicho ramo.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashbee, H. R., & Evans, E. G. (2002). Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clinical microbiology reviews*, 15(1), 21–57. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.21-57.2002>
2. Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R. G., & Ryley, J. F. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of general microbiology*, 131(5), 1217–1221. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-5-1217>
3. Bolin, L. L., & Levy, L. S. (2011). Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort. *Viruses*, 3(9), 1681–1698.
4. Coutinho, S. D., & Paula, C. R. (2000). Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Medical mycology*, 38(1), 73–76. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.1.73.76>
5. Mancianti, F., Giannelli, C., Bendinelli, M., & Poli, A. (1992). Mycological findings in feline immunodeficiency virus-infected cats. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 30(3), 257–259. <https://doi.org/10.1080/02681219280000321>
6. Ortega-Pacheco, A., Aguilar-Caballero, A. J., Colin-Flores, R. F., Acosta-Viana, K. Y., Guzman-Marin, E., & Jimenez-Coello, M. (2014). Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. *Journal of feline medicine and surgery*, 16(6), 460–464. <https://doi.org/10.1177/1098612X13509995>
7. Ramírez, H., Autran, M., García, M. M., Carmona, M. Á., Rodríguez, C., & Martínez, H. A. (2016). Genotyping of feline leukemia virus in Mexican housecats. *Archives of virology*, 161(4), 1039–1045. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2740-4>

7. Ruiz, Andrea, Medina, Daniel A, Maier, Liliana, & Thomson, Pamela. (2019). Dermatofitosis en gatos domésticos (*Felis catus*) positivos a retrovirus. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 902-907. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16097>
8. Sierra, P., Guillot, J., Jacob, H., Bussiéras, S., & Chermette, R. (2000). Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. *American journal of veterinary research*, 61(2), 158–161. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.158>
9. Sánchez R., A. E. (1998). Algunos antecedentes sobre el origen y la reproducción del gato domestico (*Felis catus*). *TecnoVet*, 4(2). Recuperado a partir de <https://tecovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/6248>
10. Sánchez Segura, Miriam, González García, René Marcos, Marsán Suárez, Vianed, & Macías Abraham, Consuelo. (2006). Asociación entre el estrés y las enfermedades infecciosas, autoinmunes, neoplásicas y cardiovasculares. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(3) Recuperado en 11 de septiembre de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000300002&lng=es&tlng=es.
11. Celma, C. C., Paladino, M. G., González, S. A. & Affranchino, J. L. (2007, septiembre). Importance of the short cytoplasmic domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion activity and envelope glycoprotein incorporation into virions. *Virology*, 366(2), 405-414. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.019>
12. Liu, C., Liu, Y., Qian, P., Cao, Y., Wang, J., Sun, C., Huang, B., Cui, N., Huo, N., Wu, H., Wang, L., Xi, X., & Tian, K. (2020). Molecular and serological investigation of cat viral infectious diseases in China from 2016

- to 2019. *Transboundary and emerging diseases*, 67(6), 2329–2335.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13667>
13. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. (s. f.). Recuperado 18 de septiembre de 2022, de <https://ictv.global/taxonomy>
 14. B. Taylan Koç, T. Çiğdem Oğuzoğlu, A phylogenetic study of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) among domestic cats in Turkey, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volume 73, 2020, 101544, ISSN 0147-9571, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101544>.
 15. Haraguchi, S., Good, R.A. & Day-Good, N.K. A potent immunosuppressive retroviral peptide: cytokine patterns and signaling pathways. *Immunol Res* 41, 46–55 (2008). <https://doi.org/10.1007/s12026-007-0039-6>
 16. Suhito Fujino, Koichi Ohno, Hajime Tsujimoto, Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Volume 123, Issues 1–2, 2008, Pages 138-143, ISSN 0165-2427, <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.019>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242708000275>)
 17. Sykes, J. E., & Hartmann, K. (2014). Feline Leukemia Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 224–238. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00022-3>.
 18. Kawasaki, J., & Nishigaki, K. (2018). Tracking the Continuous Evolutionary Processes of an Endogenous Retrovirus of the Domestic Cat: ERV-DC. *Viruses*, 10(4), 179. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/v10040179>.
 19. Verschoor, E. J., Hulskotte, E. G., Ederveen, J., Koolen, M. J., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1993). Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. *Virology*, 193(1), 433–438. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1140>
 20. Pancino, G., Camoin, L., & Sonigo, P. (1995). Structural analysis of the principal immunodominant domain of the feline immunodeficiency virus

transmembrane glycoprotein. *Journal of virology*, 69(4), 2110–2118.
<https://doi.org/10.1128/JVI.69.4.2110-2118.1995>

21. Manrique, M. L., Rauddi, M. L., González, S. A., & Affranchino, J. L. (2004). Functional domains in the feline immunodeficiency virus nucleocapsid protein. *Virology*, 327(1), 83–92.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.06.019>
22. Hart, S. & Nolte, I. (1995). Long-Term Treatment of Diseased, FIV-Seropositive Field Cats with Azidothymidine (AZT). *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 42(1-10), 397-409. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1995.tb00392.x>
23. Eckstrand, C. D., Sparger, E. E. & Murphy, B. G. (2017). Central and peripheral reservoirs of feline immunodeficiency virus in cats: a review. *Journal of General Virology*, 98(8), 1985-1996.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000866>
24. Cano-Ortiz, L., Tochetto, C., Roehe, P. M., Franco, A. C., & Junqueira, D. M. (2022). Could Phylogenetic Analysis Be Used for Feline Leukemia Virus (FeLV) Classification? *Viruses*, 14(2), 249. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/v14020249>
25. Willett, B. J. & Hosie, M. J. (2013). Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. *The Veterinary Journal*, 195(1), 16-23.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.004>
26. Chiu, E., Hoover, E., & VandeWoude, S. (2018). A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*, 10(1), 29. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/v10010029>
27. Reis, R. S., Bonna, I. C. F., Antonio, I. M. da S., Pereira, S. A., Nascimento, C. R. S. do, Ferraris, F. K., Brito-Santos, F., et al. (2021). *Cryptococcus neoformans* VNII as the Main Cause of Cryptococcosis in Domestic Cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Fungi*, 7(11), 980. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof7110980>

28. Mao, L., Zhang, L., Li, H., Chen, W., Wang, H., Wu, S., Guo, C., Lu, A., Yang, G., An, L., Abliz, P. & Meng, G. (2014). Pathogenic Fungus *Microsporium canis* Activates the NLRP3 Inflammasome. *Infection and Immunity*, 82(2), 882-892. <https://doi.org/10.1128/iai.01097-13>
29. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525–530.
30. Gyawali R, Lin X. 2013. Prezygotic and postzygotic control of uniparental mitochondrial DNA inheritance in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* 4: e00112–00113.
31. Umme F, Abbasi S, Irfan A, Amjad A, Ikram A, M Nasrullah, Hanif F. Non-dermatophyte moulds as pathogens of onychomycosis. *J Coll Phys Surg Pakistan* 2011;21(10):597-600.
32. Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(7), a019760. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>
33. Paulin, J., Morshed, M., & Armién, A. G. (2013). Otitis interna induced by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in a cat. *Veterinary pathology*, 50(2), 260-263.