



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



MEMORIA DE TITULO

**“ENSAYO DE PCR PARA DETERMINAR LA PRESENCIA Y LA
IDENTIDAD DE MYCOPLASMA HEMOTROPICO EN GATOS DE
ISRAEL”**

**Alumna:
ORIT WITMAN
Los Naranjos 077, Esmeralda
Colina
8447066**

**Profesora Guía:
Dra. Ana María Ramírez K.
Departamento de Patología Animal**

Santiago, Chile

2010



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



MEMORIA DE TITULO

**“ENSAYO DE PCR PARA DETERMINAR LA PRESENCIA Y LA
IDENTIDAD DE MYCOPLASMA HEMOTROPICO EN GATOS DE
ISRAEL”**

Memoria para optar al
Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

ORIT WITMAN

	Nota	Firma
Profesor guía: Dra. Ana María Ramírez	_____	_____
Profesor consejero: Dr. Gustavo Farías	_____	_____
Profesor consejero: Dr. Eduardo Kessi	_____	_____

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a la Escuela de Medicina Veterinaria de Koret de la Universidad Hebrea de Jerusalén en Israel por permitirme realizar mi proyecto de título en sus establecimientos.

A los profesores Dr. Gad Baneth y Dr. Shimon Harrus, que me incorporaron a su equipo de trabajo, financiaron el proyecto y me guiaron.

A la Dra. Gila Bar Gal por sus consejos técnicos y su participación.

A la Dra. Osnat Eyal, por las instrucciones técnicas y la ayuda a lo largo de todo el proyecto.

Al Dr. Danny Morick por el apoyo técnico y por la participación en la recolección de muestras.

Al Dr. Eyal Klement por guiarme en el análisis estadístico.

A la Dra. Severine Tasker de la Universidad de Bristol, R.U, por la información y la donación de muestras de control.

Gracias a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile, principalmente al Dr. Raggi, que me permitió realizar mi proyecto fuera de las fronteras de Chile, considerando mis condiciones personales.

A la Dra. Ana María Ramírez por acompañar este proyecto, aconsejar, apoyar y comunicar a la distancia mis inquietudes.

Al Dr. Víctor Toledo por su ayuda y motivación.

INDICE.

1.1. Resumen	1
1.2. Summary	2
2. Introducción	3
3. Revisión bibliográfica	4
3.1. Historia	4
3.2. Morfología	4
3.3. Reclasificación.....	5
3.4. Estudios filogenéticos	6
3.5. Estudios complementarios: Epidemiología y patogénesis:	7
3.5.1. Efecto clínico.....	7
3.5.2. Prevalencia	8
3.5.3. Factores de riesgo	8
3.5.4 Asociación con enfermedades retro virales	9
3.5.5 Transmisión y reservorios	10
4. Objetivos del trabajo	11
5. Materiales y métodos	12
5.1. Colección de muestras sanguíneas	12
5.2. Extracción de ADN	12
5.3. Ensayo de PCR.....	13
5.3.1 Ensayo de PCR para <i>Mycoplasma</i> hemotrópico	13
5.3.2 Ensayo de PCR para VIF	14
5.4. Separación de los productos	15
5.5. Purificación de los productos	15
5.6. Secuenciación de los productos	16
5.7. Alineamiento e identificación de las secuencias	16
5.8. Prueba serológica de ViLeF	17
5.9. Análisis estadístico	17
6. Resultados	18
6.1. Composición de la población general de los gatos.....	18
6.2 Análisis demográfico de la población general de los gatos y segmentación en subgrupos y subpoblaciones.....	19
6.3. Extracción de ADN desde las muestras sanguíneas.....	22
6.4. Definición del estado retroviral de los gatos.....	24
6.4.1 Ensayo de PCR para VIF	24
6.4.2. Prueba serológica de ViLeF	25
6.5. Ensayo de PCR para <i>Mycoplasmas</i> hemotrópicos	26
6.5.1. PCR de las muestras de control positivo	26
6.5.2. PCR para <i>Mycoplasma</i> hemotrópico en la población general de los gatos...26	
6.6. Prevalencia de <i>Mycoplasma</i> hemotrópico	28
6.7 Secuenciación, alineamiento y prevalencia de las especies de <i>Mycoplasma</i> hemotrópico	31
6.7.1. Secuenciación y alineamiento de los productos de PCR	31
6.7.2. Prevalencia de las especies de <i>Mycoplasma</i> hemotrópico	32
7. Discusión	39
8. Conclusiones	44
9. Bibliografía	45
10. Anexo N° 1	47

1.1. RESUMEN.

Mycoplasma hemotrópico (previamente llamado *Haemobartonella*) es el agente causal de la Anemia Infecciosa Felina (AIF). Tres especies o especies candidatas han sido reconocidas en los felinos: *Mycoplasma haemofelis* (*M haemofelis*), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (*CM haemominutum*) y *Candidatus Mycoplasma turicensis* (*CM turicensis*). Este estudio ha sido el primero en realizar ensayo de PCR para la detección de *Mycoplasmas* hemotrópicos en Israel. Los objetivos de este estudio fueron la evaluación de la prevalencia e identidad de los *Mycoplasmas* hemotrópicos presentes en los gatos de Israel y comparar la prevalencia y la distribución de las especies en diferentes poblaciones de gatos.

Muestras de sangre de gatos de diferentes orígenes de acuerdo a su origen, género y edad fueron colectadas y el ensayo de PCR fue realizado utilizando partidores universales de *Mycoplasma*. Además, se realizó un ensayo de PCR para la detección del Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF) y un ensayo serológico de detección del Virus de la Leucemia Felina (ViLeF). Todos los productos de PCR (*Mycoplasma* y VIF) fueron secuenciados para alcanzar una identificación a nivel de la especie.

En el total de muestras evaluadas (n=55), se encontró una prevalencia de 49% de *Mycoplasma* hemotrópico, así como, las tres especies de *Mycoplasmas* hemotrópicos internacionalmente conocidas, mientras que la especie *CM turicensis* fue encontrada por primera vez en Israel. Una diferencia significativa ($P \leq 0,005$) se encontró en la prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico en gatos de los distintos orígenes. En las muestras de gatos provenientes tanto del Hospital Veterinario de Bet Dagan o desde el banco de sangre, en los machos y con estatus de VIF positivo, la especie de mayor prevalencia fue *CM haemominutum*, mientras que en las muestras obtenidas desde gatos callejeros y negativos a VIF, *CM turicensis* fue la especie más prevalente.

Así en este estudio se concluye que la prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico en gatos en Israel parece ser alta. Las tres especies conocidas de *Mycoplasma* hemotrópico que los afectan, están presentes en Israel y su prevalencia es aparentemente diferente en gatos de distintas poblaciones.

1.2. SUMMARY.

Molecular survey of hemotrophic *Mycoplasma* species in cats from Israel.

Hemotrophic *Mycoplasmas* (previously *Haemobartonella*) are the causative agents of “Feline Infectious Anemia”. Three spp. or candidate spp. have been recognized in cats: *Mycoplasma haemofelis* (*M haemofelis*), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (*CM haemominutum*) and *Candidatus Mycoplasma turicensis* (*CM Turicensis*). This is the first survey of feline hemotrophic *Mycoplasma* spp. performed in Israel using PCR. The goals of the study were to evaluate the prevalence and identity of the hemotrophic *Mycoplasma* in cats in Israel and to compare the prevalence and spp. distribution in different cat populations.

Blood samples of cats from different sources were collected and PCR was performed using universal *Mycoplasma* primers. Feline immunodeficiency virus (FIV) detection was also performed by PCR. Feline leukemia virus was detected by ELISA. All PCR products (*Mycoplasma* and FIV) were sequenced to achieve identification at the species level.

A 49% prevalence rate of hemotrophic *mycoplasmas* was found among all samples evaluated (n=55). The three internationally known hemotrophic *Mycoplasma* spp. were found and *CM turicensis* was identified for the first time in Israel. The samples were divided into distinct sub-groups according to their origin, gender, age and their FIV status. Significant differences ($P \leq 0,005$) were found among the hemotrophic *Mycoplasma* spp. prevalent in cats from different sources. In cats from the veterinary hospital or blood bank, males and FIV positive cats, the most prevalent spp. was *CM haemominutum*, while in stray cats and FIV-negative cats, *CM turicensis* was the most prevalent sp.

The conclusion of this study is that the prevalence of hemotrophic *Mycoplasma* infection in cats in Israel appears to be high. The three known hemotrophic *Mycoplasma* spp. which infect cats are present in Israel and their prevalence is apparently different in cats from distinct populations.

2. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años existe un creciente interés en el agente causal de la “Anemia Infecciosa Felina” (“Hemobartonellosis”), que tras años de ser considerado como *Haemobartonella*, perteneciente al orden *Rickettsia*, fue reclasificado como “*Mycoplasma hemotrópico*” (también llamado “**Hemoplasma**”). La reclasificación se logró a través del uso de ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que puso en evidencia la verdadera naturaleza del agente al analizar un fragmento de su ADN y reconocer la semejanza estructural que tiene a los miembros del género *Mycoplasma*.

Antiguamente, el reconocimiento del agente y el diagnóstico definitivo de la enfermedad, se realizaban solamente por la observación directa de un frotis sanguíneo por microscopía, prueba que tiene una sensibilidad limitada, consecuentemente la investigación sobre la enfermedad y el agente etiológico, no daba certeza alguna sobre sus verdaderas características. En cambio, con el uso de PCR se obtiene una alta sensibilidad, además, se genera un producto que se puede secuenciar, comparar y analizar filogenéticamente. Esto ha permitido comprobar la existencia de distintas especies y variedades de hemoplasma. Por el mismo motivo, el PCR ha permitido conocer la prevalencia, analizar los factores de riesgo, los cuadros clínicos generados, las relaciones que tiene con otros agentes y enfermedades, entre otros, lo que explica el aumento actual de las investigaciones sobre el tema.

Al analizar los resultados de los estudios realizados en distintos lugares del mundo, se encuentran valores y conclusiones muy variados, lo que sugiere la importancia que tienen la geografía, el clima, el estatus sanitario y la distribución de las distintas especies de hemoplasma.

Este estudio fue realizado en la Escuela de Medicina Veterinaria de Koret en Rehovot, Israel, y fue el primer ensayo de PCR en *Mycoplasma hemotrópico* en gatos realizado en este país. El ensayo tuvo la finalidad de comprobar la presencia y definir la identidad del agente, información que en un futuro cercano permitirá continuar analizando a las variedades de *Mycoplasma hemotrópico* presentes en el país y realizar estudios relacionados con las distintas características de la enfermedad y su epidemiología.

3. REVISION BIBLIOGRAFICA.

3.1. Historia.

Los organismos antiguamente conocidos como *Haemobartonella* sp y *Eperythrozoon* sp son pequeñas bacterias pleomórficas que parasitan a los glóbulos rojos de un amplio rango de animales vertebrados. Estos parásitos sanguíneos fueron observados por primera vez en ratones (*E. coccoides*) y perros (*H. canis*) en Alemania en 1928. Desde entonces, la presencia de estos parásitos fue descrita en cerdos, ovejas, cabras, bovinos, llamas y alpacas, gatos, perros, ratas, monos e incluso en seres humanos, en todo el mundo. En el año 1953, Flint y Moss reconocieron a *H. felis* como el agente causal de la “Anemia Infecciosa Felina”, una enfermedad contagiosa en los gatos. Dos especies de *Haemobartonella* han sido descritas en gatos; el organismo “Ohio” o la forma grande de *H. felis*, el agente causal de la enfermedad y el organismo “California” o la forma pequeña, que parece tener virulencia baja (Messick, 2004).

3.2. Morfología.

Los organismos son gram-negativos, parásitos obligados de los glóbulos rojos que no han crecido con éxito en ningún medio de cultivo. Pueden tener una forma de rueda, esférica o de anillo y se sitúan individualmente o en cadenas sobre la superficie del glóbulo rojo. La diferenciación morfológica entre los dos géneros se basaba en la forma de presentación sobre la superficie de los glóbulos rojos, siendo la más frecuente en forma de anillos o libres en el plasma sanguíneo en *Eperythrozoon* sp en comparación a *Hemobartonella* sp (Messick, 2004).

Los hallazgos ultraestructurales muestran que los organismos son redondos a elongados, de diámetro entre 0,3 y 3 μm y son rodeados por una sola membrana limitante. A pesar de no tener núcleo, pequeños gránulos y algunas estructuras filamentosas se encuentran en sus citoplasmas. Los parásitos se adhieren, pero no penetran la superficie de los glóbulos rojos. Se encuentran en pequeñas depresiones y en los profundos pliegues de la superficie, con una zona de separación de 15 a 25 nm entre el parásito y la membrana del glóbulo rojo. Delicadas fibrillas se extienden desde el parásito a esa zona, adjuntando el organismo a su célula hospedera (Messick, 2004).

3.3. Reclasificación.

La confusión sobre la verdadera naturaleza de este agente ha persistido durante los últimos 50 años. Hasta el año 1993, el orden Rickettsiales contenía 3 familias: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* y *Anaplasmataceae*. Las bacterias hemotrópicas, *Hemobartonella* y *Eperythrozoon*, estaban clasificadas como miembros de la familia *Anaplasmataceae*, en base a sus características biológicas y fenotípicas, como son el pequeño tamaño, la tinción gram negativa, el parasitismo de los glóbulos rojos y la transmisión mediante artrópodos hematófagos (Willi *et al.*, 2007). Sin embargo, se sostenía una larga sospecha de que este agente no era un parásito rickettsial y parecía estar más relacionado con los miembros de la clase Mollicutes. Esta sospecha se basó en la ausencia de parasitismo intracelular, su pequeño tamaño, la falta de pared celular y de flagelo, la resistencia a la penicilina y sus análogos y su susceptibilidad a las tetraciclinas (Messick, 2004).

Como los hemoplasmas no se han logrado cultivar con éxito en agar ni en cultivo celular, el único medio de diagnóstico de los animales infectados era la identificación microscópica de frótis sanguíneo teñido con Giemsa, siendo un método de poca sensibilidad de detección. El diagnóstico también se complicaba por la carencia de una parasitemia identificable en los estados latentes o crónicos de la enfermedad y la rápida pérdida de la parasitemia luego de la presentación de los signos clínicos en los gatos con cuadros agudos. La falta de un examen eficiente para el diagnóstico de cuadros agudos y crónicos, resultó en una enorme controversia en la consideración del verdadero impacto de esta enfermedad en la población de los felinos (Messick *et al.*, 1998).

Sólo recientemente, un preciso y objetivo medio de clasificación filogenética de bacterias hizo posible su identificación, a través del análisis de la secuencia del gen 16S ARN ribosomal (ARNr). En 1997, Rikihisa *et al.*, reportaron por primera vez la secuencia del gen 16S ARNr de *Haemobartonella* sp y *Eperythrozoon* sp. La secuencia se obtuvo mediante el uso de ensayo de PCR y el consecuente análisis de productos amplificados, secuenciados y comparados con secuencias conocidas de distintas bacterias (*Anaplasma marginale*, *Mycoplasma muris*, *Bartonella henselae*, *Ureaplasma canigenitalum*, entre otras) (Messick, 2004), determinando que en base a las secuencias encontradas, que generaron muy pequeña similitud con los organismos Rickettsiales,

ellos no pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* o siquiera al orden *Rickettsia* y su relación filogenética es más cercana a los *Mycoplasmas* (Rikihisa *et al.*, 1997).

Posteriormente, fue propuesto que la clasificación taxonómica debía ser modificada para reflejar los nuevos conocimientos de la afiliación filogenética de *Haemobartonella* sp y *Eperythrozoon* sp con el género *Mycoplasma* y que la designación “Candidatus” sería adjuntada a las especies que fueran nuevas y/o no completamente descritas. Entonces, *H. felis* (Organismo Ohio o forma grande) fue transferido al género *Mycoplasma* como *Mycoplasma haemofelis* (*M haemofelis*) y el organismo California o la forma pequeña, que es una especie con caracterización incompleta, fue designada como “Candidatus *Mycoplasma haemominutum*” (*CM haemominutum*) (Messick, 2004).

3.4. Estudios Filogenéticos.

En el 2003, se publicó un análisis de las especies conocidas de hemoplasma, incluyendo muestras de sangre de gatos y perros de Europa, Australia, África y Asia, en el cual fue construido un árbol filogenético, revelando una división de estos organismos en dos grupos distintos. En uno se encontraron los aislados consistentes con *CM haemominutum* y en el otro, los aislados consistentes con *M haemofelis*. Este estudio reportó además, sobre la existencia de un patógeno hemotrópico con una secuencia del gen 16S ARNr, casi idéntica a las descritas en Estados Unidos, en perros y gatos de Alemania, Reino Unido, Francia, Australia, Sudáfrica e Israel (Tasker *et al.*, 2003a), a pesar de encontrar grandes diferencias porcentuales entre las secuencias de nucleótidos aisladas, que generan en el autor inquietud sobre los criterios de definición de nuevas especies de hemoplasma.

En el 2005, se descubrió una tercera especie de hemoplasma felino aislada desde una muestra de sangre obtenida de un gato con signos clínicos de una severa anemia hemolítica en Suiza, que luego fue nombrada: “Candidatus *Mycoplasma turicensis*” (*CM turicensis*) (Willi *et al.*, 2005). Posteriormente, en 2006, este agente fue aislado desde muestras de sangre de gatos de tres continentes distintos (Europa, Australia y África), demostrando que la infección con *CM turicensis* en gatos existe en una amplia área geográfica (Willi *et al.*, 2006b).

3.5 Estudios complementarios.

3.5.1. Efecto clínico.

Siendo el PCR un medio de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad (Tasker *et al.*, 2003b), da la certeza necesaria en el reconocimiento del agente y facilita la investigación sobre las distintas características del organismo y de la enfermedad. Además, permite distinguir en forma confiable entre las distintas especies de hemoplasma y así, especificar cuál está presente en cada muestra y si la infección es simple (de una especie) o mixta (coinfeción) (Tasker *et al.*, 2003b). Esto ha permitido estudiar el efecto patológico de cada especie, ya que se sabe que los hemoplasmas causan un gran rango de cuadros clínicos, desde asintomáticos a severos y posiblemente fatales. En los felinos, la infección aguda está asociada a una parasitemia masiva de *M haemofelis*. Los gatos infectados presentan anemia hemolítica severa y las principales manifestaciones clínicas son taquipnea, letargia, depresión, anorexia, mucosas pálidas, ictericia, emaciación, deshidratación y esplenomegalia (Harrus *et al.*, 2002). En cambio, una infección con *CM haemominutum* en animal sano sólo genera leves signos clínicos. La infección crónica con hemoplasma se caracteriza por bajo o indetectable número de parásitos en los frótis sanguíneos (independiente a su especie) y por signos de anemia leve o un cuadro asintomático. Además, existe un estado de portador en los gatos que se recuperan de la enfermedad aguda, incluso cuando se realiza un tratamiento antibiótico efectivo (Messick, 2004).

En el caso de una infección natural con *CM turicensis*, Willi *et al.* (2006a) describieron una carga parasitaria sanguínea significativamente más baja que la encontrada con *M haemofelis* y *CM haemominutum* y no encontraron una correlación entre la infección y un bajo volumen globular aglomerado (VGA). En cambio, una transmisión experimental de *CM turicensis* a gatos libres de patógenos, resultó en el desarrollo de anemia moderada a marcada en todos ellos. Anemia más severa y una mayor bacteremia fueron observadas en un gato que fue previamente inmunocomprometido a través de la administración de corticoesteroides. El potencial patógeno de esta especie, parece depender de cofactores tales como inmunosupresión o coinfección con otros hemoplasmas (Willi *et al.*, 2007).

A través del PCR se ha reconocido la existencia de casos de coinfección, con dos e incluso tres especies de hemoplasma, generándose un efecto aditivo y cuadros clínicos

más severos. La existencia de la coinfección, sugiere al menos tres alternativas: que no existe una protección inmunológica cruzada entre las distintas especies, que tienen similares rutas de transmisión o que la infección con una especie, aumenta la susceptibilidad a las otras especies (Willi *et al.*, 2006b).

3.5.2. Prevalencia.

La prevalencia de la infección muestra mucha variación entre los distintos estudios. Así, en el Reino Unido varió entre 5,15 a 42% cuando el diagnóstico se realizó por observación directa (Tasker *et al.*, 2003b). Sin embargo, los resultados también son variados al estudiarla mediante ensayo de PCR. Algunas prevalencias publicadas son las siguientes; En Estados Unidos en 2001 se reportó un 19,5%, en Reino Unido en 2003 un 18,5% (Tasker *et al.*, 2003b), mientras Willi *et al.*, 2005 reportaron un 8,5 % en Suiza. Estas diferencias sugieren que pueden existir variaciones geográficas en la prevalencia de las distintas especies de hemoplasma (Tasker *et al.*, 2003b). Además, Willi *et al.*, (2006b) al comparar las prevalencias de Sudáfrica, Reino Unido, Australia y distintas regiones de Suiza, encontraron mayores prevalencias en países con climas más cálidos, sugiriendo que los artrópodos hematófagos presentes pueden tener un importante rol en la transmisión de hemoplasma, existiendo un mayor número o distintas variedades de ellos en estos climas.

Un estudio reciente realizado en Brasil, en que se investigó la prevalencia y los factores de riesgo de la infección, utilizó PCR específico para *M haemofelis* y *CM haemominutum* en gatos, los que también fueron probados para la presencia del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y el virus de la leucemia felina (ViLeF) mediante un ELISA comercial.

Este estudio reflejó prevalencias de 4,0, 2,6, 12,5 y 7,8% de *M haemofelis* y de 32, 5,1, 50 y 5,2% de *CM haemominutum* en grupos de gatos positivos a VIF, positivos a ViLeF, positivos a VIF y ViLeF y negativos a VIF y ViLeF, respectivamente (Macieira *et al.*, 2007).

3.5.3. Factores de riesgo.

Numerosos estudios buscan demostrar los factores de riesgo de la infección con hemoplasma. En un análisis multivariable realizado por Tasker *et al.*, (2003b), aun

cuando en estudios previos determinaron que los gatos jóvenes tenían mayor predisposición a la infección, demostró que gatos de mayor edad presentan mayor prevalencia de hemoplasma. Esto puede ser explicado por una mayor exposición al agente a medida que pasa el tiempo, además de que no ocurre una eliminación completa del *Mycoplasma* hemotrópico luego de la recuperación y, por lo tanto, el gato se mantiene positivo. La edad se considera como un factor de confusión porque los animales jóvenes son significativamente más sanos y se sabe que el estado de salud es un factor de riesgo, ya que el estrés, la inmunosupresión y las enfermedades concomitantes desencadenan la infección con hemoplasma y la presentación de signos clínicos. Al comparar gatos mestizos con los de razas finas, los autores no encontraron diferencias significativas. Algunos estudios postulan que no existe predisposición por sexo, sin embargo, se encontró una mayor prevalencia en los gatos machos. Otro factor importante es el clima y la presencia de artrópodos hematófagos, siendo estos vectores mecánicos y responsables de la transmisión indirecta, considerada como el principal medio de transporte del agente entre los gatos (Willi *et al.*, 2006a).

3.5.4. Asociación con enfermedades retrovirales.

Las infecciones con hemoplasmas raramente causan una enfermedad fulminante en un hospedero sano. Se relacionan más frecuentemente con enfermedades de curso crónico con gran variedad de signos clínicos. De hecho, en el pasado, los *Mycoplasmas* se consideraban como "parásitos ideales" por vivir en armonía relativa con sus hospederos. Sin embargo, la asociación de una infección latente de hemoplasma con una enfermedad, tanto en animales sanos como en inmunocomprometidos está emergiendo últimamente.

En los felinos, a pesar de que *M haemofelis* causa una enfermedad primaria, también es común reconocerlo como un patógeno que actúa en conjunto con los agentes retrovirales, incluyendo VIF y ViLeF, así como con otras enfermedades debilitantes.

En un estudio realizado en Brasil se demostró que gatos portadores de VIF y portadores de ambos VIF y ViLeF, se encontraron en un riesgo mayor de estar infectados con hemoplasmas que los gatos con estatus retroviral negativo, principalmente debido a infección con *CM haemominutum* (Macieira *et al.*, 2007).

En el caso de una infección experimental, gatos infectados con ViLeF y *CM haemominutum*, desarrollaron una anemia más severa que gatos infectados solo con el

parásito (Messick, 2004). La infección con ViLeF se ha demostrado como un factor de riesgo de la Anemia Infecciosa Felina, ya que al generar inmunosupresión contribuye a la infección con hemoplasma e induce la presentación de signos clínicos, que además son más severos que en una infección causada únicamente por hemoplasma. Harrus *et al.*, (2002), no encontraron diferencias hematológicas o clínicas significativas entre gatos con estatus de VIF negativo y VIF positivo, pero los últimos demostraron tendencia a una reducida sobrevivencia.

3.5.5. Transmisión y reservorios.

Las rutas de transmisión de los hemoplasmas son aún pobremente comprendidas. La transmisión experimental por las vías intravenosa, intraperitoneal y oral, utilizando sangre infectada se ha demostrado exitosa. También ha sido reportada la transmisión iatrogénica por transfusión sanguínea (Willi *et al.* 2007).

Los artrópodos hematófagos han sido propuestos como el medio natural de la transmisión del agente entre gatos. ADN de *CM haemominutum* y de *M haemofelis* han sido detectados en pulgas (*Ctenocephalides felis*) colectadas desde gatos y en heces de pulgas, pero el intento de transmitir *M haemofelis* y *CM haemominutum* entre gatos, a través de la actividad hematófaga de *C. Felis*, no fue concluyente (Willi *et al.* 2007).

Existe una creciente evidencia de transmisión directa de hemoplasma entre gatos. Se ha logrado detectar ADN de hemoplasma en la saliva de animales infectados y la asociación de la infección de hemoplasma con el género masculino, acceso a la calle y la presencia de abscesos luego de mordeduras de gatos, apoya esta teoría. Se cree que la conducta agresiva, más que el uso compartido de utensilios de comida, es necesaria para la transmisión directa de hemoplasma (Willi *et al.*, 2006a y 2007).

4. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la presencia y la identidad de *Mycoplasma* hemotrópico en sangre de gatos en Israel.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Estimar el número de gatos positivos a *Mycoplasma* hemotrópico.
2. Revelar la identidad de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico presentes en Israel.
3. Comparar la prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico y de cada especie de *Mycoplasma* hemotrópico en gatos de distintas poblaciones.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1. Colección de muestras sanguíneas.

Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos de ensayo con EDTA, desde 55 gatos provenientes de diferentes lugares de Israel, 29 de los cuales correspondieron a individuos enfermos admitidos en el Hospital Veterinario de la Escuela de Veterinaria (Bet Dagan) de la Universidad Hebrea de Jerusalén y a gatos descartados de la lista de donantes del banco de sangre, que fueron elegidos tras resultar positivos a VIF por un ensayo serológico (ELISA). Los 26 gatos restantes fueron individuos alojados en una gatería de una sociedad protectora, en la ciudad de Tel Aviv ("Tzaar Baalei Jaim"). Se recolectó toda la información disponible sobre cada gato: identificación (género, edad y raza), localización y estado de salud (presencia de signos clínicos y volumen globular aglomerado (VGA)).

5.2. Extracción de ADN.

Se utilizó el método de fenol-cloroformo para la extracción del ADN desde las muestras de sangre entera, adaptando el protocolo descrito por Gal *et al.*, (2007), que se explica a continuación: las muestras fueron homogeneizadas y el ADN fue extraído desde 100 μ L de sangre mediante la agregación de 300 μ L de tampón lítico (50 mM NaCl (Sigma®)), 50 mM Tris (Sigma®), 10 mM EDTA [pH = 8,0] (Sigma®), proteinasa K (GE healthcare®) en una concentración final de 250 μ g/mL y Triton X-100 (20%) (Sigma®) en una concentración final de 1%. Después de 2 h de incubación a 56° C y la inactivación de la proteinasa K en 90° C por 10 min, se agregaron 300 μ L de una mezcla de fenol (Sigma®) (75%), cloroformo (Sigma®) (24%) e isoamilalcohol (Sigma®) (1%) que luego fue mezclada y centrifugada (12.000 xg) por 3 min. Se colectó el sobrenadante y fueron agregados 300 μ L de una mezcla de fenol (50%), cloroformo (48%) e isoamilalcohol (2%) que luego fue mezclada y centrifugada (12.000 xg) por 3 min. El sobrenadante fue colectado y se agregaron 300 μ L de una mezcla de cloroformo (96%) e isoamilalcohol (4%), que nuevamente fue mezclada y centrifugada (12.000 xg) por 3 min. El sobrenadante fue colectado y se agregó un volumen (1:10) de acetato de Na (WWR international Ltd. ®) (3 M) y luego un volumen de isopropanol (100%) (Sigma®) (a -20° C). La mezcla fue incubada durante la noche a -20° C. Se realizó una centrifugación (14.000 xg) a 4° C por 30 min, el sobrenadante fue

descartado, el pellet fue lavado con 150 μ L de etanol (Bio Lab, Ltda. ®) (75%, -20° C) y centrifugado (13.000 xg) por 15 min. El sobrenadante se descartó nuevamente y el pellet se dejó secar. El ADN fue resuspendido con 30 μ L de H₂O desionizada y destilada durante 1 h a 37° C.

En cada sesión de extracción de ADN, fue incluida una muestra de control negativo que no incluía sangre (el volumen correspondiente (100 μ L) fue sustituido con H₂O destilada), para permitir la detección de una contaminación en caso que la hubiera.

Finalizada cada sesión de extracción, la concentración de ADN en los productos de todas las muestras fue evaluada mediante el uso de un espectrofotómetro (WPA UV1101 Biotechphotometer®) que sirvió para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica, relativos a dos haces de radiaciones (260 y 280 λ). Al proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida, se registra la información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra (pureza) y se indica la cantidad de la sustancia presente.

5.3. Ensayo de PCR.

5.3.1. Ensayo de PCR para *Mycoplasma hemotrópico*.

Al ser esta investigación la primera de utilizar el método molecular de PCR para la detección de hemoplasma que se realiza en Israel, se decidió utilizar partidores universales para el género *Mycoplasma*, descritos a continuación: Directo = ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA (posiciones 352 a 373 en #U95297); Reverso = ACGCCCAATAAATCCG(A/G)ATAAT (posiciones 544 a 523) (Metabion/ IDT), diseñados específicamente para amplificar el gen 16S ARNr por Jensen *et al.* en 2000.

Estos partidores fueron elegidos por falta de conocimientos previos sobre las variedades de hemoplasma presentes en la población de gatos en Israel y su uso permitió la formación de un producto (amplicón) para cualquier variedad de hemoplasma que se presentase en las muestras sanguíneas. Cada amplicón producido por estos partidores, fue secuenciado y comparado con las especies de hemoplasma previamente conocidas y de esta manera, fueron identificados.

Mezcla de reacción.

La amplificación del ADN fue realizada en una mezcla de reacción de volumen total de 25 μ L, compuesta por: 50 ng de ADN templado (5 μ L), 12,5 μ L de una mezcla industrial para PCR (X2 Taq Master Mix purple, Lamda biotech®) que contiene: 10mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100, 1,5mM MgCl₂, 200 μ L dNTP, 1,5 unidades/50 μ L de Taq ADN polimerasa, trazas de marcador rojo y azul y estabilizadores de enzimas. Además, se adicionaron 1,5 μ L de Cl₂Mg en 50mM (EURx®) y 10 pmoles de cada partidor.

Protocolo de termociclación.

El protocolo de termociclación utilizado fue el siguiente: 10 min de incubación a 20° C seguidos por 2 min de desnaturación a 95° C, luego 45 ciclos de 1 min de desnaturación a 95° C, 1 min de apareamiento a 60° C y 30 seg de extensión a 72° C (Jensen *et al.*, 2000). El procedimiento fue realizado en un termociclador T1 de Biometra®.

Muestras de control.

En los ensayos de PCR fue incluido ADN de muestras de control positivo de cada una de las especies conocidas de *Mycoplasma hemotrópica*, obtenidas desde gatos positivos y comprobados en PCR en tiempo real en la Universidad de Bristol, Inglaterra (generosamente enviadas por Dra. Severine Tasker), que luego fueron sometidos a PCR y sus productos fueron secuenciados para obtener una referencia. Además, se utilizó como controles negativos tubos de ensayo con la mezcla de reactivos excluyendo el ADN. El uso de los tubos de control positivo y negativo es fundamental para asegurar la pureza del proceso y su adecuado funcionamiento técnico.

5.3.2. Ensayo de PCR para VIF.

Para conocer el estatus de VIF de los gatos participantes de este estudio, la existencia de ADN del VIF fue determinada mediante un ensayo de PCR. Las secuencias de bases de los partidores y los protocolos de termociclación fueron entregados como una comunicación personal por la Dra. Gila Bar Gil, que los diseñó y

utilizó en estudios aún no publicados. Los partidores fueron específicos para la detección de los segmentos de la proteína GAG y del gen ENVELOPE del virus cuyo tamaño molecular es de 500 bp cada uno. Todos los pasos previos y posteriores a la termociclación fueron similares a los realizados y descritos para *Mycoplasma hemotrópico*.

5.4. Separación de los productos.

Todos los productos amplificados en PCR fueron separados según su tamaño molecular mediante Electroforesis. Las condiciones específicas del procedimiento fueron las siguientes: Se prepararon geles de agar (SeaKem®) en concentración de 3,5% en una solución tampón Tris HCl-EDTA (Frutarom LTD®, Sigma®, Sigma® respectivamente) teñidos con bromuro de etidio (1mg/ml, HyLabs). Cada gel fue cargado con un marcador de ADN (Bioneer® 25/100bp escala de peso molecular) y con los productos de PCR para ser sometido a la electroforesis por 45 minutos a una potencia de 90 V y 500 A. La visualización de las bandas resultantes se realizó en una cámara oscura de iluminación ultra violeta en la que se tomaron fotografías digitales presentadas y analizadas mediante un programa computarizado (Kodak® 1D 3,6). Las bandas de interés fueron seccionadas y guardadas en tubos de ensayo etiquetados.

5.5. Purificación de los productos.

Las bandas seccionadas fueron procesadas en el “Ultraclean 15 Purification Kit” (MoBioLaboratories, inc. ®) de acuerdo al siguiente protocolo:

Cada tubo de ensayo a utilizar se pesó previa y posteriormente a la agregación del trozo de gel de agar que contenía el ADN a purificar. Se agregaron tres volúmenes de la solución "ULTRA SALT" (sal caotrópica) (por ejemplo, 0,3 ml de “ULTRA SALT” sobre 0,1 gr de gel). Se agitó y se incubó en 55° C por 5 min mezclando hasta que el gel se derritió completamente. En esta etapa los enlaces hidrogenados del gel se rompieron irreversiblemente. Se agregaron 6 µL de la solución de "ULTRA BIND" (Sílice) y se incubó por 5 min a temperatura del ambiente mezclando suavemente. El ADN se enlazó con el sílice de la solución en la presencia de la sal caotrópica. Se centrifugó por 1 min y se colectó el sobrenadante separando el ADN unido al sílice de los restos de agar y la "ULTRA SALT". El pellet se resuspendió por un minuto en la

solución de "ULTRA WASH" (Etanol 50% y solución tampón), se agitó por 10 seg y se colectó el sobrenadante. Esto se repitió dos veces para lograr desechar toda la solución. El ADN se purificó manteniendo su unión a sílice. El pellet se resuspendió en 12 μ L de H₂O estéril, rompiendo el pellet mediante una punta de pipeta y agitando la solución manualmente. Se incubó por 5 min a temperatura del ambiente, el ADN se separó del sílice irreversiblemente y mediante 1 min de centrifugación se formó un pellet de sílice. Se aspiró el sobrenadante y se conservó como producto final de ADN. Se determinó la concentración de ADN en la solución final mediante espectrofotometría.

5.6. Secuenciación de los productos.

Este proceso fue realizado en el "Centro de Tecnologías Genéticas" de la Universidad Hebrea de Jerusalén, al cual se envió ADN de cada producto extraído desde el gel diluido a concentración de 20-50 ng/ μ L. La tecnología utilizada fue el "BigDye Terminator Cycle Sequencing chemistry" de "Applied Biosystems" (ABI), "ABI 3700 DNA analyzer" y el "ABI's Data collection and Sequence Analysis software".

En el proceso, el ADN fue químicamente etiquetado con marcadores fluorescentes y luego se realizó una electroforesis en capilares finos con cristales de sílice. A continuación, el ADN pasó por una célula de detección con luz de láser, la que generó fluorescencia que fue detectada por una cámara, transformando la imagen generada en información por una estación computacional que la analizó y presentó como una secuencia de bases y un electroferograma. (Anexo N°1).

5.7. Alineamiento e identificación de las secuencias de ADN.

La identificación de la secuencias se realizó mediante el programa de computación llamado "Sequence scanner software V.1.", que permite abrir, analizar, editar y almacenar las secuencias obtenidas en el ABI, preparando la información para ser comparada con las secuencias disponibles en el banco genético (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST). Este programa reconoce regiones de similitud entre secuencias mediante la comparación de secuencias de nucleótidos o proteínas, con las secuencias

existentes en la base de datos y calcula la importancia estadística de esa similitud. (Anexo N°1).

5.8. Prueba serológica de ViLeF.

La prueba serológica de ViLeF fue realizada mediante un kit comercial (SNAP® FIV/FeLV combo, IDEXX Laboratories) que utiliza ELISA para la detección de la presencia de antígenos del virus en sangre, suero o plasma del gato examinado. El protocolo del ensayo es el siguiente: se mezclan 3 gotas de muestra (sangre, suero o plasma) con 4 gotas del reactivo conjugado en un tubo, se agrega en la ventana de aplicación de muestra en el aparato. Cuando una coloración azul aparece en el círculo de activación, se presiona el aparato para lograr su nivelación. Se esperan 10 minutos para ver el resultado del ensayo. La interpretación del ensayo depende del número y la ubicación de los círculos azules que aparecen, pudiendo detectar la presencia de antígenos de ViLeF y de anticuerpos contra VIF, como se describe en la figura N° 1.

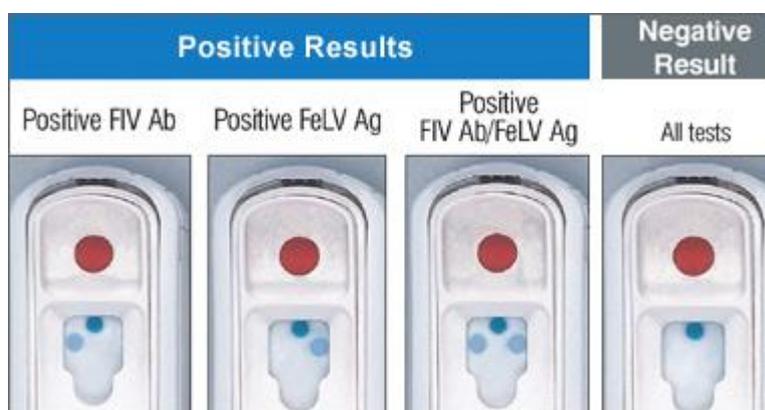


Figura N° 1. Interpretación de los resultados del ensayo de ViLeF/ VIF. (Obtenido del sitio web de IDEXX Laboratories®)

5.9. Análisis estadístico.

Un objetivo determinado en este ensayo, fue la comparación de las prevalencias de *Mycoplasma* hemotrópico y sus especies, en los diferentes segmentos de la población de los gatos. Para lograrlo los resultados fueron comparados mediante la prueba estadística de Chi cuadrado (X^2), mediante el programa computacional SPSS. Esta

prueba permite analizar si las diferencias en el número de variables categóricas existentes en distintos grupos, se debe realmente a la pertenencia en el grupo o del azar. Todas las comparaciones se realizaron en tablas de 2 filas por 2 columnas y por lo tanto el grado de libertad (GL) fue siempre igual a 1. El nivel de significancia predeterminado fue el de 0,05 (5%), determinando el nivel de probabilidad. En todas las comparaciones, la hipótesis nula (H0) es que las diferencias encontradas son independientes al grupo y la H1 es que las diferencias encontradas son asociadas a la pertenencia a grupos distintos.

La prueba de X^2 permitió además comparar la composición demográfica de los grupos formados para caracterizarlos y comprobar que se diferencian entre sí, entregando los valores de Riesgo Relativo (RR) y los intervalos de confianza 95% (CI 95%) de pertenecer a cada categoría en las subpoblaciones analizadas.

La prueba de X^2 fue utilizada nuevamente al comparar los resultados obtenidos en este ensayo con los publicados en la literatura (resultado obtenido versus esperado), definiendo si las diferencias encontradas tienen validez estadística (ver discusión).

6. RESULTADOS.

6.1. Composición de la población general de gatos.

Los 55 ejemplares muestreados formaron el grupo llamado “Población general de gatos” y toda la información accesible fue recolectada, archivada y es presentada en la tabla N° 1. A continuación, se realizó una segmentación según las variadas características y una agrupación en distintos subgrupos y subpoblaciones que serán analizados individualmente y comparadamente en este trabajo.

Tabla N° 1. Muestras y datos recolectados de los gatos.

N° de serie	N° de Muestra	Origen Muestra	Edad	Género	Domicilio	Estado clínico
1	1018	H.V	4a	M	Ramat Gan	Eutanasiado
2	4230	B.S	N/I	M	Lod	Sano
3	1456	H.V	1.5a	M	Rehovot	Problemas dentales (HTC 22%)
4	1692	H.V	8a	M	Tel Aviv	Apatía, anorexia, periuria, shock (HTC 9.67%)
5	1832	H.V	10a	M	Reut	Letargia, apatía, anorexia (HTC 28%)
6	3916	B.S	N/I	M	Lod	Sano
7	4180	B.S	N/I	M	Volcani Inst.	Sano

8	5066	B.S	N/I	M	Volcani inst	Sano
9	5141	B.S	N/I	M	Lod	Sano
10	7174	B.S	N/I	M	Rishon Letzion	Sano
11	0068	H.V	8a	M	Nes Tziona	Problemas bucales, anorexia
12	7618	H.V	1a	M	Kiriat Tivon	Opacidad corneal, glaucoma (HTC 40.8)
13	219	H.V	5a	M	N/I	N/I
14	234	H.V	N/I	N/I	N/I	N/I
15	80293793	H.V	N/I	N/I	N/I	N/I
16	60049	H.V	N/I	N/I	N/I	N/I
17	9774	H.V	7.5a	F	Tel Aviv	IRC, apatía, anorexia, depresión, Buena condición física, anemia (HTC 14.8%)
18	1019	H.V	12a	M	Nes Tziona	Sano
19	3991	H.V	5a	M	Ramat Gan	,Depresión, anorexia, FLUDT
20	1028	B.S	N/I	N/I		Sano
21	9949	B.S	N/I	M	Volcani Inst.	Sano
22	1104	H.V	4a	M	Bet Dagan	Hiporexia, apatía, vómitos, palidez de membranas (HTC 33%)
23	3625	H.V	6m	M	Rehovot	Atropello, trauma espinal, (HTC 41%)
24	4050	H.V	N/I	N/I	N/I	N/I
25	61939	H.V	N/I	N/I	N/I	N/I
26	9530	H.V	N/I	N/I	N/I	N/I
27	60041	H.V	N/I	M	N/I	N/I
28	43866	H.V	17a	F	N/I	N/I
29	0063	H.V	10a	M	N/I	Atropello, Gingivitis, anorexia, micción forzada, (HTC 31.8%)
30	070504-04	S.P	6m	M	Tel Aviv	N/I
31	070517-07	S.P	3a	F	Tel Aviv	N/I
32	070517-08	S.P	6m	F	Tel Aviv	N/I
33	070525-03	S.P	8m	F	Tel Aviv	N/I
34	070601-01	S.P	4m	F	Tel Aviv	N/I
35	070608-02	S.P	8m	F	Tel Aviv	N/I
36	070628-02	S.P	1a	F	Tel Aviv	N/I
37	070517-10	S.P	2m	M	Tel Aviv	N/I
38	070504-05	S.P	6m	M	Tel Aviv	N/I
39	070608-01	S.P	4m	F	Tel Aviv	N/I
40	070601-05	S.P	4m	F	Tel Aviv	N/I
41	070601-07	S.P	1a	F	Tel Aviv	N/I
42	070525-02	S.P	3a	M	Tel Aviv	N/I
43	070608-04	S.P	4m	F	Tel Aviv	N/I
44	070621-04	S.P	2m	M	Tel Aviv	N/I
45	070628-01	S.P	3a	F	Tel Aviv	N/I
46	070628-03	S.P	6m	F	Tel Aviv	N/I
47	070628-05	S.P	6m	M	Tel Aviv	N/I
48	070628-06	S.P	4m	M	Tel Aviv	N/I
49	070621-01	S.P	5m	F	Tel Aviv	N/I
50	070621-02	S.P	3m	F	Tel Aviv	N/I
51	070621-05	S.P	2m	F	Tel Aviv	N/I

52	070608-03	S.P	4m	M	Tel Aviv	N/I
53	070601-03	S.P	4m	F	Tel Aviv	N/I
54	070601-02	S.P	4m	M	Tel Aviv	N/I
55	070601-06	S.P	2a	F	Tel Aviv	N/I

H.V- Hospital Veterinario, B.S- Banco de Sangre, S.P- Sociedad Protectora, a- año, m- meses, M- masculino, F- femenino, N/I- no hay información.

6.2 Análisis demográfico de la población general de los gatos y segmentación en subgrupos y subpoblaciones.

La información recolectada sobre los gatos, principalmente la edad y el género, fue analizada en la población general de los gatos. Se calculó una edad promedio de 3 años y 8 meses de vida y una mayor participación de gatos machos (60,41%). Para lograr un análisis más detallado, la población general de los gatos fue segmentada en subpoblaciones y en subgrupos (tabla N° 3). Los gatos fueron divididos en las subpoblaciones 1 y 2 de acuerdo a sus orígenes. La subpoblación 1 (n=29) incluyó a los gatos provenientes del Hospital Veterinario o del Banco de Sangre (gatos N° serie 1-29 en la tabla N° 1) seleccionados por positividad serológica a VIF, resultando un grupo con un promedio de edad de 6,5 años y con 91% de gatos machos. Al dividir esta subpoblación en categorías de edad, el 92,3% fueron mayores que un año de vida. Además, se encontraron prevalencias de 96,5% (28/29) de VIF mediante PCR y de 35,7% de ViLeF mediante una prueba serológica en esta subpoblación. La subpoblación 2 (n=26), incluyó a los gatos callejeros alojados en una gatería de la sociedad protectora de animales (gatos N° serie 30-55 en tabla N° 1). En esta subpoblación, la división en categorías de edad demostró un 23% de gatos mayores que un año de vida (con promedio de 9 meses) y solo un 34,6% de los gatos fueron machos. Además, se encontraron prevalencias de 11,5% de VIF (3/26) y de 58% de ViLeF (15/26). La diferencia en prevalencia de gatos machos entre las dos subpoblaciones de origen, fue examinada mediante la prueba de Chi cuadrado y generó un resultado de $P < 0,001$ determinando que existe una diferencia significativa en la participación de machos y hembras en las dos subpoblaciones, habiendo un riesgo mayor de ser macho en la subpoblación 1 que en la subpoblación 2 (RR=2,626; CI95%=1,52-4,353). La diferencia en la división en categorías de edad se encontró un riesgo relativo de ser mayor que un año 4 veces mayor al pertenecer a la subpoblación 1 en relación a la subpoblación 2

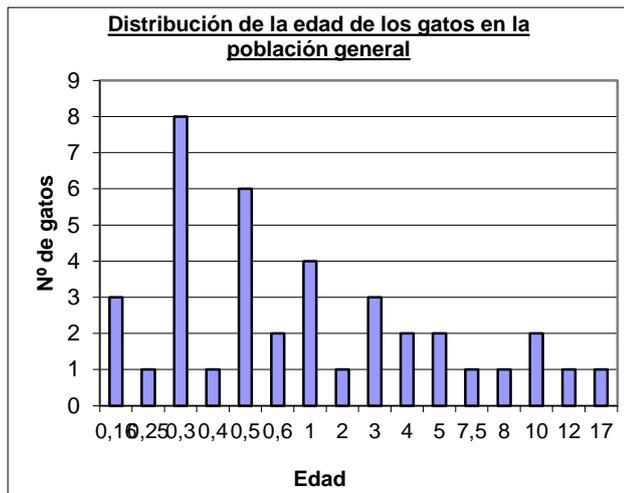
(RR=4,0; CI95%=1,95-8,21), una diferencia altamente significativa en la composición de las subpoblaciones ($P<0,001$).

La población general fue dividida además en subgrupos de acuerdo a la edad y el género de los gatos. La división en dos subgrupos según la categoría de la edad se encontró necesaria debido al gran rango de edad de los gatos muestreados, incluyendo gatos desde 2 meses de vida hasta un gato de 17 años (tabla N° 2 y gráfico N° 1). El criterio de la división fue la edad de un año de vida (incluyendo los gatos de un año con los gatos mayores a un año), logrando así una comparación entre los gatos adultos ($n=18$) y los gatos jóvenes ($n=21$). Los subgrupos divididos según el género de los gatos, se formaron tomando en cuenta solamente los gatos de género conocido, formando un grupo de machos ($n=29$) y otro de hembras ($n=19$).

Tabla N° 2. Distribución de la edad de los gatos en la población general.

Edad en años	N° de gatos
0,16	3
0,25	1
0,3	8
0,4	1
0,5	6
0,6	2
1	4
2	1
3	3
4	2
5	2
7,5	1
8	1
10	2
12	1
17	1

Gráfico N° 1.



Posteriormente, la población general fue segmentada en subpoblaciones de acuerdo a los resultados del ensayo de PCR para VIF y la prueba serológica de ViLeF: la subpoblación VIF positivo (n=31) fue compuesta por 87,5% de gatos mayores de un año de edad, con un promedio de 5,4 años y 83,3% de machos en comparación a la subpoblación VIF negativo (n=24) con un promedio de edad de 9 meses (17,4% mayores que un año) y 37,5% de machos. Estos valores fueron comparados y se encontró una diferencia significativa en la categoría de edad (porcentaje de gatos adultos) entre ambas subpoblaciones ($P < 0,001$) y una diferencia significativa en la prevalencia de machos y hembras en los distintos grupos ($P = 0,001$). Se entiende que el riesgo relativo de ser gato macho ($RR = 2,222$; $CI_{95\%} 1,29-3,84$) y de ser gato adulto ($RR = 5,031$; $CI_{95\%} = 2,03-12,5$) es mayor en la subpoblación VIF positivo que en la VIF negativo.

Otras subpoblaciones se definieron de acuerdo al estado de ViLeF. La subpoblación ViLeF positivo (n=25), con 27,8% de gatos mayores que un año de vida y un promedio de edad de 1,48 años y 60% de machos, en comparación con la subpoblación ViLeF negativo (n=29) con 60% de gatos adultos, con un promedio de edad de 2,8 años y 63% de machos, siendo la diferencia de categoría de edad significativa ($P = 0,046$) y la diferencia de géneros no significativa ($P = 0,836$). Se entiende que el riesgo relativo de ser gato joven es mayor en la subpoblación ViLeF positivo que en la ViLeF negativo ($RR = 1,8$; $CI_{95\%} = 0,98-3,32$).

Finalmente, se dividió la población general por el estado retroviral (RV), considerando un estado retroviral positivo al presentar al menos uno de los dos agentes

retrovirales estudiados (VIF y ViLeF) y comparándolos con los gatos de estado retroviral negativo. En la subpoblación de estado retroviral positivo (n=45 gatos del total de 55 gatos), se encontró 51,7% de gatos mayores de un año, con un promedio de edad de 3,26 años y 71,1% de machos y en la subpoblación de estado retroviral negativo (n=10), el 30% fueron mayores que un año, con promedio de edad de 1,08 años y el 20% de machos. La diferencia de categoría de edad no se encontró significativa (P=0,235) y el porcentaje de machos si lo fue (P=0,003; RR=3,553; CI95%=1,01-12,48).

Tabla N° 3. Estudio demográfico de los grupos segmentados.

Población	Género (%)		Categoría de edad (%)		Promedio de edad (años)	Total (N)
	Machos	Hembras	<año	>año		
Todos los gatos	60,41	39,59	53,8	46,2	3,65	55
Origen 1	90,9*	9,1	7,7	92,3""	6,5	29
Origen 2	34,6*	65,4	77,0	23,0""	0,8	26
Machos	100,0	0,0	45,0	55,0	3,31	29
Hembras	0,0	100,0	63,16	36,84	2,06	19
Edad < 1año	42,86	57,14	100,0	0,0	0,38	21
Edad > 1año	61,1	38,8	0,0	100,0	5,13	18
RV +	71,1**	28,94	48,27	51,42	3,26	45
RV -	20,0**	80,0	70,0	30,0	1,08	10
VIF+	83,3+	16,6	12,5	87,5"	5,4	31
VIF -	37,5+	62,5	82,6	17,4"	0,8	24
ViLeF+	60,0	40,0	72,2++	27,8	1,48	25
ViLeF -	62,96	37,03	40,0++	60,0	2,8	29
VIF + ViLeF+	83,0	17,0	20,0	80,0	4,46	11

*P<0,001; "P<0,001; **P=0,003; +P=0,001; ++P= 0,046; ""P<0,001

6.3. Extracción de ADN desde las muestras sanguíneas.

En la tabla N° 4, se presentan los resultados de la extracción de ADN desde las muestras sanguíneas. Las primeras columnas ("260λ" y "280λ"), entregan los resultados de las mediciones de la absorción lumínica detectada en estas dos longitudes de onda. La relación entre ambas (260/280), representa el grado de pureza del ADN obtenido, pudiendo detectar la presencia de residuos de distinta naturaleza, resultantes de la destrucción celular realizada durante el proceso de extracción, que podrían influenciar el proceso de PCR y la siguiente secuenciación. Productos de extracción que arrojaron un valor en la relación de 260/280 igual o mayor a 1,3 se aceptaron y en los de valores

inferiores, la extracción se repitió. Excepcionalmente se aceptó un valor inferior a 1,3 si la muestra de sangre fue escasa o cuando dos ensayos de extracción arrojaron resultados similares. Además, se presenta la concentración obtenida de ADN que permitió calcular la dilución necesaria del ADN para la preparación de los productos con concentración de 10 ng/μL y volumen (5 μL) uniformes en el PCR. Las dos últimas columnas demuestran los volúmenes de productos de extracción (ADN) y de agua destilada utilizados en la dilución.

Tabla N° 4. Resultados de la extracción de ADN.

Identificación		Evaluación del producto de extracción				Dilución a concentración final de 10 ng/μL en 25 μL.	
N° de serie	N° Muestra	260λ	280λ	280/260	Concentración de ADN (ng/μL)	Volumen de ADN (μL)	Volumen de H2O (μL)
1	1018	0,69	0,392	1,76	34,5	7,24	17,75
2	4230	0,84	0,67	1,25	42,1	5,93	19,06
3	1456	1,43	1,07	1,33	71,5	3,49	21,50
4	1692	1,006	0,86	1,16	50,3	4,97	20,02
5	1832	1,23	0,88	1,40	61,8	4,04	20,95
6	3916	0,332	0,159	2,09	16,6	15,06	9,93
7	4180	0,341	0,165	2,07	17,1	14,61	10,38
8	5066	0,817	0,427	1,91	40,8	6,12	18,87
9	5141	0,926	0,517	1,91	46,3	5,39	19,60
10	7174	0,495	0,245	1,79	46,3	5,39	19,60
11	0068	1,265	0,848	1,49	63,2	3,95	21,04
12	7618	0,461	0,318	1,45	23,0	10,86	14,13
13	219	3,005	4,932	1,60	246,6	1,70	23,29
14	234	2,051	1,210	1,69	102,6	2,43	22,56
15	80293793	6,260	3,581	1,75	313,0	0,79	24,20
16	60049	0,29	0,19	1,47	14,6	17,12	7,87
17	9774	0,937	0,664	1,41	46,8	5,34	19,65
18	1019	0,805	0,625	1,30	40,3	6,20	18,79
19	3991	0,49	0,39	1,26	24,8	10,08	14,91
20	1028	0,61	0,46	1,32	30,6	8,16	16,83
21	9949	0,47	0,36	1,30	23,9	10,46	14,53
22	1104	1,0	0,76	1,30	50,0	5,00	20,00
23	3625	0,162	0,095	1,70	8,1	25,00	0
24	4050	0,668	0,411	1,63	33,4	7,48	17,51
25	61939	2,20	1,37	1,60	110,3	2,26	22,73
26	9530	1,06	1,68	1,56	53,3	4,69	20,30
27	60041	1,755	1,219	1,44	87,8	2,84	22,15
28	43866	0,61	0,26	1,41	18,8	13,29	11,70
29	0063	0,55	0,44	1,26	27,8	8,99	16,00
30	070504-04	8,291	4,948	1,68	414,5	0,60	24,39
31	070517-07	3,196	2,101	1,52	159,8	1,56	23,43
32	070517-08	5,330	3,529	1,51	266,5	0,93	24,06
33	070525-03	2,39	1,58	1,52	120,0	2,08	22,91

34	070601-01	2,63	1,49	1,76	131,8	1,89	23,10
35	070608-02	14,227	8,066	1,76	711,3	0,35	24,64
36	070628-02	0,17	0,11	1,49	8,7	25,00	0
37	070517-10	0,190	0,121	1,57	9,5	25,00	0
38	070504-05	0,99	0,579	1,71	49,5	5,05	19,94
39	070608-01	0,356	0,228	1,57	17,8	14,04	10,95
40	070601-05	0,53	0,35	1,48	26,6	9,39	15,60
41	070601-07	0,40	0,26	1,53	20,4	12,25	12,74
42	070525-02	0,87	0,56	1,55	43,5	5,74	19,25
43	070608-04	3,211	2,011	1,60	160,5	1,55	23,44
44	070621-04	0,503	0,39	1,30	25,1	9,96	15,03
45	070628-01	0,31	0,19	1,64	15,9	15,72	9,27
46	070628-03	0,48	0,305	1,57	24,0	10,41	14,58
47	070628-05	0,31	0,197	1,61	15,8	15,82	9,17
48	070628-06	0,451	0,345	1,31	22,5	11,11	13,88
49	070621-01	0,43	0,33	1,32	21,7	11,52	13,47
50	070621-02	2,8	2,1	1,32	140,5	1,77	23,22
51	070621-05	1,13	0,63	1,80	56,9	4,39	20,60
52	070608-03	0,874	0,292	1,35	14,6	17,12	7,87
53	070601-03	1,0	0,72	1,40	50,5	4,95	20,04
54	070601-02	1,99	1,29	1,55	99,8	2,50	22,49
55	070601-06	8,27	4,92	1,63	413,7	0,60	24,39

6.4. Definición del estado retroviral de los gatos.

6.4.1 Ensayo de PCR para VIF.

Se consideraron positivos a VIF todos los gatos cuyas muestras generaron secuencias que resultaron altamente similares (>90% de alineamiento en BLAST) a las secuencias registradas en el banco de genes. El estado de VIF detectado en cada una de las muestras es presentado en la tabla N° 5. En la población general de gatos, el 56,4% (31/55) resultaron positivos a VIF. Esta alta prevalencia es altamente afectada por la composición de la subpoblación 1 (n=29), en la que los gatos provenían desde el hospital veterinario o del banco de sangre, siendo seleccionados por tener un estado positivo a VIF determinado mediante prueba serológica. En ellos se encontró una prevalencia de 96,5% (28/29) positivos a VIF mediante PCR. En la subpoblación 2 de gatos provenientes de la sociedad protectora de los animales (n=26), sin información previa al respecto, tres gatos se encontraron positivos a VIF mediante PCR, lo que significa una prevalencia de 11,5%. La diferencia en la prevalencia de VIF entre ambos grupos, es altamente significativa (P<0,001).

6.4.2. Prueba serológica de ViLeF.

La prueba serológica se realizó en 54 de las muestras sanguíneas, obteniendo un resultado de 46,3% (25/54) de positividad en la población general de los gatos (tabla N° 5). Al analizar la prevalencia de ViLeF en las subpoblaciones de origen se encontró 35,7% en la subpoblación 1 versus 58% en la subpoblación 2. Esta diferencia no es estadísticamente significativa ($P=0,172$).

Tabla N° 5. Resumen del estado retroviral (VIF y ViLeF).

N° de serie	N° Muestra	Estado VIF	Estado ViLeF
1	1018	+	-
2	4230	+	-
3	1456	+	-
4	1692	+	-
5	1832	+	-
6	3916	+	-
7	4180	+	-
8	5066	+	-
9	5141	+	+
10	7174	-	+
11	0068	+	+
12	7618	+	+
13	219	+	-
14	234	+	-
15	80293793	+	+
16	60049A	+	-
17	9774	+	-
18	1019	+	+
19	3991	+	-
20	1028	+	+
21	9949	+	-
22	1104	+	-
23	3625	+	-
24	4050	+	+
25	61939	+	+
26	9530	+	+
27	60041	+	-
28	43866	+	N/I
29	0063	+	-
30	070504-04	-	+
31	070517-07	-	+
32	070517-08	-	+
33	070525-03	-	-
34	070601-01	-	-
35	070608-02	-	-

36	070628-02	+	+
37	070517-10	-	+
38	070504-05	-	+
39	070608-01	-	+
40	070601-05	-	-
41	070601-07	+	-
42	070525-02	-	-
43	070608-04	-	-
44	070621-04	-	+
45	070628-01	-	-
46	070628-03	-	+
47	070628-05	-	+
48	070628-06	+	+
49	070621-01	-	+
50	070621-02	-	-
51	070621-05	-	+
52	070608-03	-	-
53	070601-03	-	+
54	070601-02	-	+
55	070601-06	-	-

6.5. Ensayo de PCR para *Mycoplasma* hemotrópico.

6.5.1. PCR de las muestras de control positivo.

El PCR realizado con las muestras de control positivo obtenidas desde la Universidad de Bristol, dio como resultado productos de tamaño de 190 pares de bases (bp) para *CM haemominutum* y de 170 bp para *CM turicensis* y *M haemofelis*, como se observa en la fotografía digital obtenida de la electroforesis presentada en la figura N° 1. Los productos fueron purificados, secuenciados y analizados en BLAST entregando un resultado de 100, 100 y 96% de similitud a las secuencias de *M haemofelis*, *CM haemominutum* y *CM turicensis* respectivamente, registradas en el banco genético (Anexo N° 1).

6.5.2. PCR para *Mycoplasma* hemotrópico en la población general de gatos.

Se realizaron ensayos de PCR con el ADN obtenido desde las muestras de sangre y los productos fueron identificados por electroforesis. Todos los productos que se encontraron positivos fueron purificados desde el gel y luego secuenciados. El 49% de los gatos (27/55) se encontraron positivos a *Mycoplasma* hemotrópico.

Coinfección.

En algunas muestras, el desarrollo de la electroforesis evidenció la presencia de productos de distintos tamaños moleculares, marcando bandas de distintas alturas como se muestra en la figura N° 2. Las bandas fueron cortadas y secuenciadas separadamente. En dos de los casos (7,4% de los gatos positivos) se logró comprobar la presencia simultánea de dos especies de *Mycoplasma* hemotrópico. En uno de los casos se encontró *CM haemominutum* junto con *M haemofelis* y en el otro, se encontró *CM haemominutum* junto con *CM turicensis*.

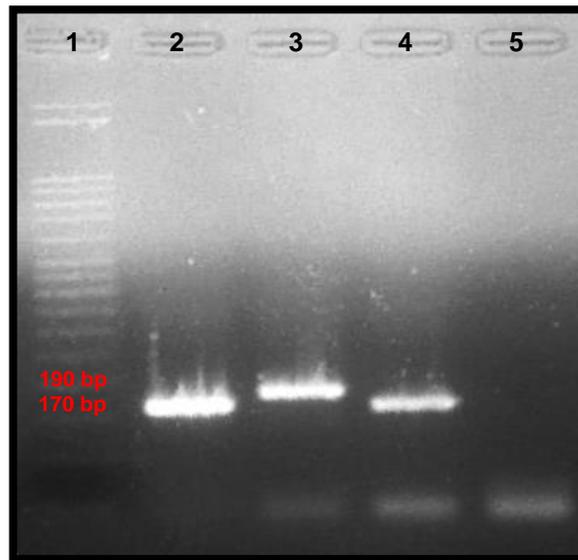


Figura N° 1. Fotografía digital del gel de agar mostrando las bandas fluorescentes de los productos de PCR de los controles positivos y negativos.

1. Escala de peso molecular, 2. *M haemofelis*, 3. *CM haemominutum*, 4. *CM turicensis*, 5. Control negativo.

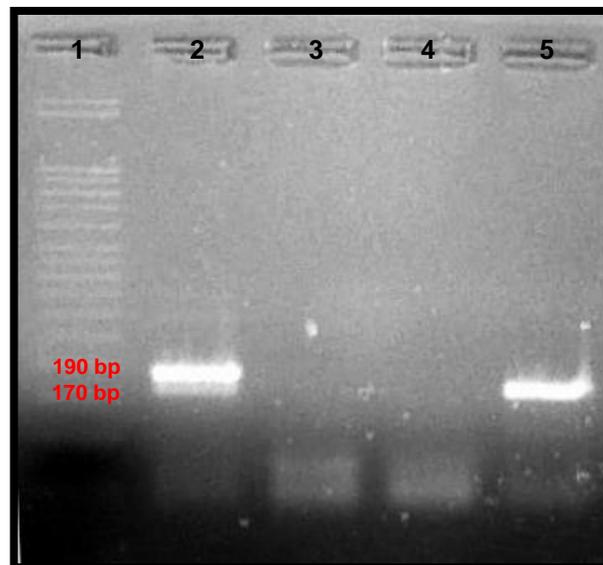


Figura N° 2. Fotografía digital del gel de agar mostrando las bandas fluorescentes de los productos de PCR de muestras de ADN.

1. Escala de peso molecular, 2. Coinfección en una muestra positiva; *CM Haemominutum* y *M haemofelis*, 3. Muestra negativa, 4. Control negativo, 5. Control positivo de *M haemofelis*.

Muestras negativas.

Las 28 muestras presentadas en la tabla N° 6, no generaron ninguna banda en el ensayo de electroforesis, por lo tanto se reconocieron como negativas a *Mycoplasma hemotrópico* y no fueron sometidos a los siguientes pasos del proceso. Cuando los resultados fueron dudosos (banda muy clara o banda en una altura inadecuada) el ensayo de PCR se repitió.

Tabla N° 6. Muestras de resultado negativo.

N° de serie	N° de muestra
1	3991
2	1028
3	9949
4	1104
5	3625
6	4050
7	61939
8	9530
9	60041
10	43866
11	0063
12	9774
13	1692

14	070525-02
15	070608-04
16	070621-04
17	070628-01
18	070628-03
19	070628-05
20	070628-06
21	070621-01
22	070621-02
23	070621-05
24	070608-03
25	070601-03
26	070601-02
27	070601-06
28	070608-02

6.6. Prevalencia de *Mycoplasma hemotrópico*.

Al analizar los resultados de PCR para *Mycoplasma hemotrópico* (tabla N° 7), se encontró una prevalencia de 49% en la población general de gatos (27/55) y en las distintas subpoblaciones y subgrupos se encontraron las siguientes prevalencias: en la subpoblación 1 se observó un 55,2% (16/29) versus 42,3% (11/26) en la subpoblación 2, con una significancia estadística de $P=0,341$ (gráfico N° 2), en los gatos adultos 50% (9/18) versus 38,1% (8/31) en los jóvenes ($P=0,455$) (gráfico N° 4) y en los machos 55,2% (16/29) versus 42,1% (8/19) en las hembras ($P=0,376$) (gráfico N° 5).

Al comparar la prevalencia de *Mycoplasma hemotrópico* en los subgrupos segmentados por el estado retroviral (tabla N° 7), se encontraron los siguientes

resultados: en los gatos de estado de VIF positivo 54,8% (17/31) versus en los VIF negativos 41,7% (10/24) (P=0,333). En los gatos positivos a ViLeF 52% (13/25) versus en los negativos 48,3% (14/29) (P=0,785). En los gatos positivos a retrovirus (que son positivos al menos a un agente retroviral) 53,3% (24/45) versus en los retrovirus negativos 30% (3/10) (P=0,182) (gráfico N° 3). 11 gatos resultaron positivos a ambos agentes retrovirales, 6 de los cuales fueron positivos a *Mycoplasma hemotrópico* (54,5%), en comparación a la prevalencia de 30% encontrada en los gatos negativos a retrovirus (P=0,256).

A pesar de existir una tendencia de mayor prevalencia en algunos de los grupos y un mayor riesgo relativo de contagio con *Mycoplasma hemotrópico* en algunos de los grupos comparados, las diferencias no fueron significativas a la prueba de Chi cuadrado, entendiéndose que son independientes al criterio de la segmentación. Sin embargo, se cree que las diferencias podrían llegar a tener una importancia estadística si se analizaran un número mayor de gatos.

Tabla N° 7. Prevalencia de *Mycoplasma hemotrópico* en las subpoblaciones y subgrupos de gatos.

Categoría	Población General de gatos		SP 1	SP 2	SG < 1 año	SG > 1 año	SG machos	SG hembras
Indicador								
Prevalencia (N/total)	27/55		16/29	11/26	8/21	9/18	16/29	8/19
Prevalencia (%)	49		55,2	42,3	38,1	50	55,2	42,1
Valor de P			0,341		0,455		0,376	
Riesgo relativo			1,304		0,762		0,763	
CI 95%			0,75-2,27		0,37-1,56		0,41-1,42	

Categoría	VIF		ViLeF		RV		VIF + ViLeF	RV
Indicador	+	-	+	-	+	-	+	-
Prevalencia (N/total)	17/31	10/24	13/25	14/29	24/45	3/10	6/11	3/10
Prevalencia (%)	54,8	41,7	52	48,3	53,3	30	54,5	30
Valor de P	0,333		0,785		0,182		0,256	
Riesgo relativo	1,316		1,077		1,778		1,818	
CI 95%	0,34-2,33		0,63-1,83		0,66-4,76		0,61-5,41	

Gráfico N° 2.

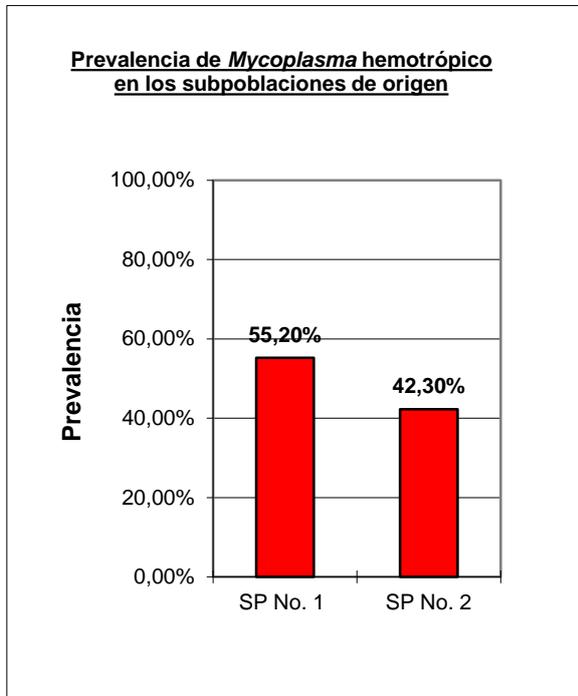


Gráfico N° 3.

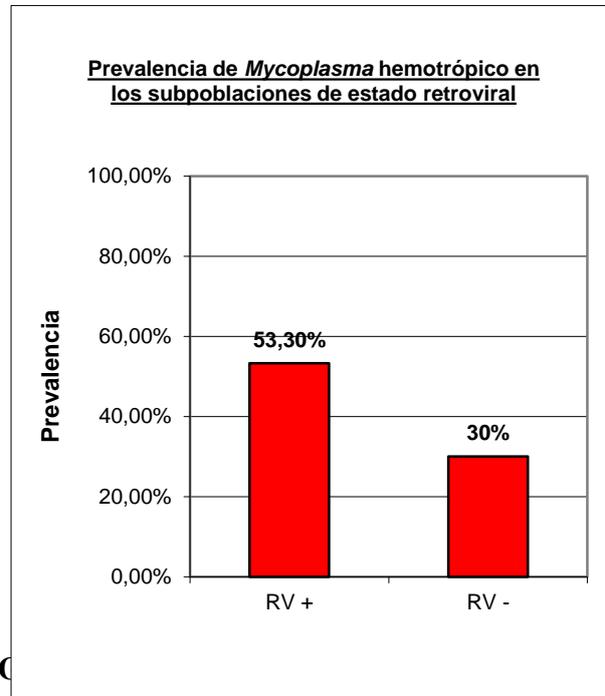


Gráfico N° 4.

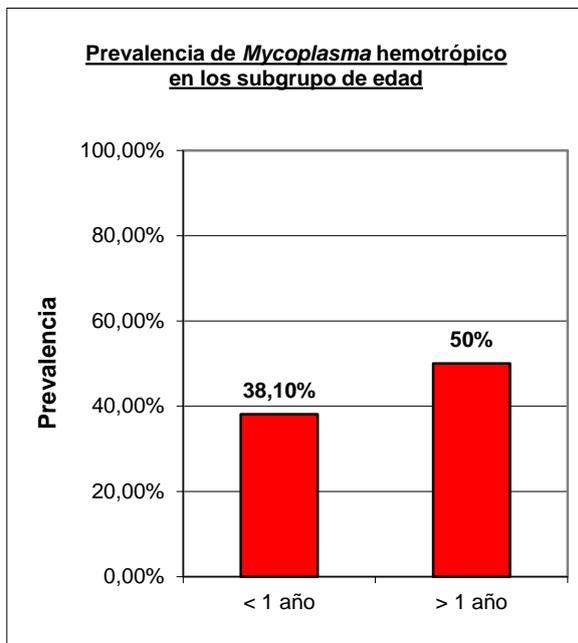
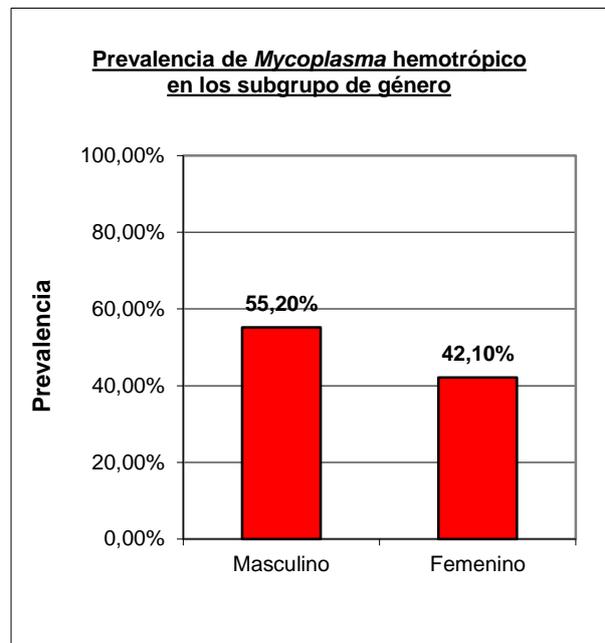


Gráfico N° 5.



6.7. Secuenciación, alineamiento y prevalencia de las especies de *Mycoplasma hemotrópico*.

6.7.1. Secuenciación y alineamiento de los productos de PCR.

Los productos de PCR que resultaron positivos a la electroforesis, fueron secuenciados y analizados en el programa BLAST. Cada muestra analizada generó una lista con los aislados más similares registrados en el banco genético, con el porcentaje de similitud entre ellos y un diagrama de alineamiento para cada aislado (anexo N° 1). En la tabla N° 8, se resumen los resultados de los análisis realizados para todas las muestras positivas. Luego de las columnas de identificación (N° de serie, N° de muestra y N° de secuenciación), se menciona el N° de acceso (en el banco genético) del aislado, al cual se encontró más cercana la secuencia obtenida y la especie de *Mycoplasma hemotrópico* a que pertenece. Además, de la longitud del segmento que se encontró similar y del porcentaje de alineamiento encontrado entre ambos.

Tabla N° 8. Resumen de los resultados del análisis del alineamiento.

N° Serie	N° Muestra	N° Secuenciación	N° De acceso del aislado mas cercano	Especie encontrada de hemoplasma	Longitud del segmento	Alineamiento (%)
1	Control positivo	OWCMH	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	156	100
2	4230	OW005	AB294160.1	<i>CM haemominutum</i>	142	100
3	1456	OW007	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	126	100
4	1832	OW014	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	119	96
5	219A	OW018A	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	171	100
6	5066	OW020	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	171	100
7	234	OW022	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	167	100
8	7618	OW023	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	171	100
9	3916	OW024	AB294160.1	<i>CM haemominutum</i>	170	99
10	7174	OW026	DQ825457.1	<i>CM haemominutum</i>	125	89
11	5141	OW027A	AB294160.1	<i>CM haemominutum</i>	169	100
12	60049	OW028A	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	159	100
13	0068	OW029	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	171	100
14	070601-01	OW032	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	169	100
15	070504-04A	OW034A	AB294160.1	<i>CM haemominutum</i>	160	86
16	070608-01	OW040	AB294159.1	<i>CM haemominutum</i>	154	88
17	1019	OW046	AB294160.1	<i>CM haemominutum</i>	103	100
18	Control positivo	OWCMT	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	136	93
19	1018	OW16A	DQ464425.1	<i>CM turicensis</i>	145	98
20	070628-02	OW009	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	121	97
21	070517-10	OW013	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	116	98

22	070517-08	OW033	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	144	98
23	070504-04B	OW034B	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	144	98
24	070517-07	OW035	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	144	98
25	070525-03	OW036	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	145	99
26	070601-07	OW041	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	139	95
27	070601-05	OW039	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	136	94
28	070504-05	OW038	DQ825450.1	<i>CM turicensis</i>	144	98
29	Control positivo	OWMHF	EU145745.1	<i>M haemofelis</i>	149	100
30	4180	OW025	EU145745.1	<i>M haemofelis</i>	149	100
31	3793	OW021	EU145745.1	<i>M haemofelis</i>	147	99
32	219B	OW018B	EU145745.1	<i>M haemofelis</i>	145	100

6.7.2. Prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico.

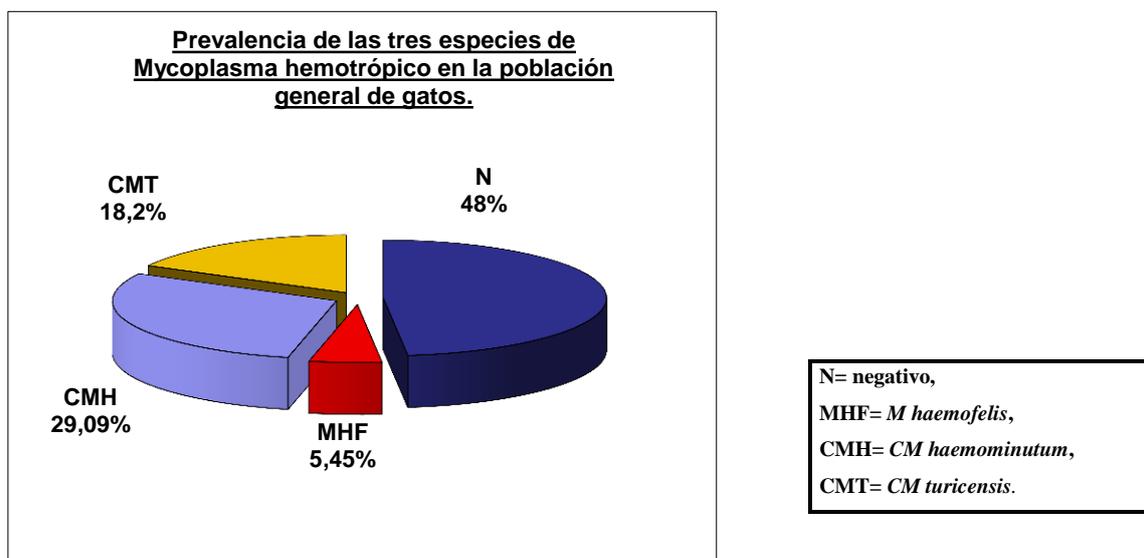
Al conocer la identidad de la especie de *Mycoplasma* hemotrópico encontrado en cada muestra, se procedió a analizar la prevalencia de cada una de las especies en los distintos grupos y su importancia estadística, mediante la prueba de Chi cuadrado.

En la población general de los 55 gatos, se encontraron 28 gatos negativos y 27 gatos positivos a *Mycoplasma* hemotrópico. Entre los gatos positivos 3 (5,45%), 16 (29%) y 10 (18,2%) fueron reconocidos como portadores de *M haemofelis*, *CM haemominutum* y *CM turicensis* respectivamente (cada caso de coinfección se consideró como dos hallazgos independientes de *Mycoplasma* hemotrópico), revelando una diferencia significativa entre la baja prevalencia de *M haemominutum* y las de *CM haemominutum* (P=0,001) y *CM turicensis* (P=0,039), como se presenta en la tabla N° 9 y en el gráfico N° 6.

Tabla N° 9. Prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico en la población general de gatos.

Agente Población General	<i>Mycoplasma</i> hemotrópico		<i>M</i> <i>haemofelis</i>		<i>CM</i> <i>haemominutum</i>		<i>CM</i> <i>turicensis</i>	
	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)
Prevalencia	27/55	49	3/55	5,45*,**	16/55	29,09*	10/55	18,2**
Valor de P	0,001*				0,039**			
Riesgo relativo	0,188				0,3			
CI 95%	0,06-0,61				0,09-1,03			

Gráfico N° 6.

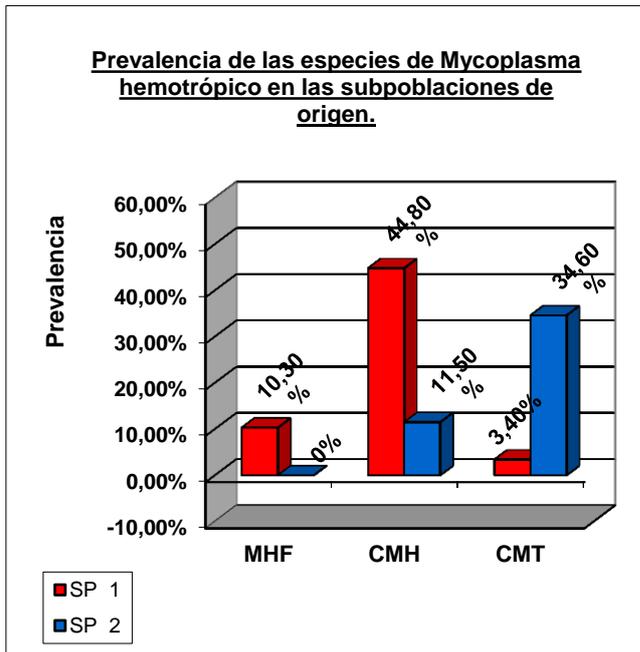


Al analizar las prevalencias (tabla N° 10), la proporción de las distintas especies de *Mycoplasmas* hemotrópicos fue significativamente diferente entre las subpoblaciones 1 y 2, encontrando una prevalencia mayor de *CM haemominutum* en la subpoblación 1 (P=0,007) y de *CM turicensis* en la subpoblación 2 (P=0,003), Comprobando que la pertenencia de un gato a la subpoblación 1 implica un riesgo de portar *CM haemominutum* en 3,9 veces mayor en relación a la subpoblación 2. Mientras que, el riesgo relativo de portar *CM turicensis* es 10 veces menor en la subpoblación 1 en relación a la subpoblación 2 (RR=0,1). La prevalencia de *M haemofelis* no fue significativamente distinta entre las dos subpoblaciones de origen (P=0,092) (tabla N° 10 y gráfico N° 7).

Tabla N° 10. Prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico en las subpoblaciones de origen.

Agente Sub- población	<i>Mycoplasma</i> hemotrópico		<i>M haemofelis</i>		<i>CM haemominutum</i>		<i>CM turicensis</i>	
	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)
SP 1	16/29	55,2	3/29	10,3	13/29	44,8*	1/29	3,4**
SP 2	11/26	42,3	0/26	0	3/26	11,5*	9/26	34,6**
Valor de P	0,341		0,092		0,007*		0,003**	
Riesgo relativo					3,885		0,1	
CI 95%					1,24-12,13		0,01-0,73	

Gráfico N° 7.



Similarmente, en los subgrupos de edad y género se encontraron diferencias en la distribución de las especies (tabla N° 1 y gráficos N° 8 y 9), siendo la especie más prevalente entre los gatos adultos y los machos *CM haemominutum* ($P=0,298$ y $P=0,021$ respectivamente), mientras que en los gatos jóvenes y en las hembras lo fue *CM turicensis* ($P=0,651$ y $P=0,138$ respectivamente). La diferencia de la distribución de las especies entre los subgrupos comparados, se encontró estadísticamente significativa solamente en el caso de la mayor prevalencia de *CM haemominutum* en los gatos machos ($P=0,021$), sugiriendo que existe una relación entre el género masculino y la presencia de *CM haemominutum*. Los gatos machos presentaron un riesgo relativo mayor por 3,931 que en las hembras de presentar esta especie de *Mycoplasma* hemotrópico. En el resto de las comparaciones, se podría deducir que las diferencias encontradas no se deben al criterio de la segmentación y podrían deberse a diferentes factores como el origen y el estado retroviral de los gatos, entre otros.

Tabla N° 11. Prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico en los subgrupos de edad y de género.

Agente Sub-Grupo	<i>Mycoplasma hemotrópico</i>		<i>M haemofelis</i>		<i>CM haemominutum</i>		<i>CM turicensis</i>	
	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)
< 1 año	8/21	38,1	0/21	0	3/21	14,3	6/21	28,6
> 1 año	9/18	50	1/18	5,6	5/18	27,8	4/18	22,2
Valor de P	0,455		0,274		0,298		0,651	
Riesgo relativo	1,313				1,944		0,778	
CI 95%	0,64-2,68				0,54-7,03		0,26-2,33	
Hembras	8/19	42,1	0/19	0	2/19	10,5*	6/19	31,6
Machos	16/29	55,2	2/29	6,9	12/29	41,4*	4/29	13,8
Valor de P	0,376		0,242		0,021*		0,138	
Riesgo relativo	1,31		-		3,931		0,437	
CI 95%	0,7-2,44		-		0,99-15,64		0,14-1,35	

Gráfico N° 8.

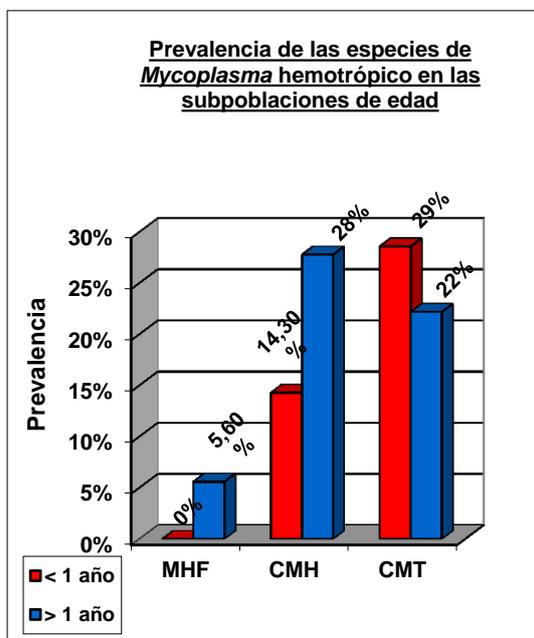
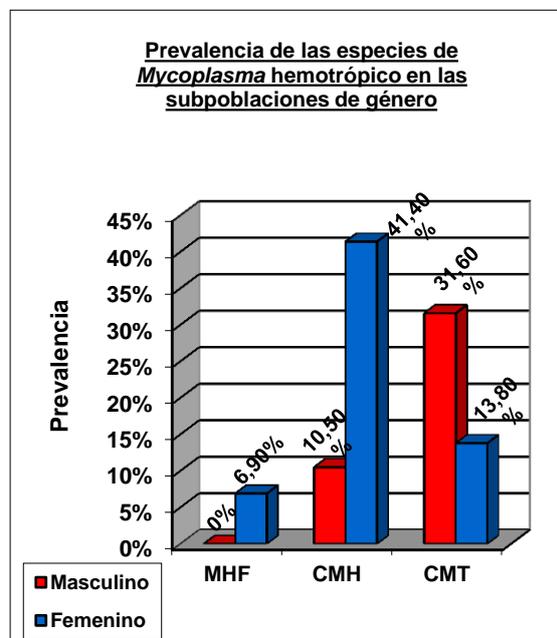


Gráfico N° 9.



Analizando los subgrupos segmentados de acuerdo al estado retroviral de los gatos, se encontraron los siguientes resultados (tabla N° 12):

En los gatos con estado retroviral positivo (que portan al menos un agente retroviral), se encontró una distribución de especies estadísticamente similar a la encontrada en los gatos negativos (*M haemofelis* P=0,401; *CM haemominutum* P=0,142; *CM turicensis* P=0,869) (gráfico N° 10).

En el caso de la segmentación en subpoblaciones de acuerdo al estado de ViLeF, tampoco se encontró una diferencia significativa en la distribución de las especies (*M haemofelis* P=0,643; *CM haemominutum* P=0,808; *CM turicensis* P=0,336) (gráfico N° 11).

Los resultados de mayor interés fueron los encontrados en el caso de la segmentación por el estado de VIF, en el cual las diferencias de distribución de las especies fueron más marcadas. En la subpoblación VIF positivo, se encontró una prevalencia de 38,7% de *CM haemominutum* en comparación al 16,7% en la subpoblación VIF negativo. Así, se encontró un riesgo mayor de 2,3 veces de encontrar esta especie de *Mycoplasma* hemotrópico en el gato portador de VIF que en uno libre de este agente viral (RR=2,323). En cambio, la prevalencia de *CM turicensis* en la subpoblación VIF negativo fue de un 29,2%, mayor a la prevalencia de 9,7% encontrada en la subpoblación VIF positivo (gráfico N° 12), sugiriendo que los gatos libres de VIF tienen riesgo de 3,014 veces mayor a portar *CM turicensis* que los portadores de VIF.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado, los valores de P encontrados en ambos casos fueron levemente superiores al valor crítico de 0,05 (P=0,074 en *CM haemominutum* y P=0,063 en *CM turicensis*) y es posible asumir que se debe al bajo tamaño de las subpoblaciones.

Tabla N° 12. Prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico en las subpoblaciones de acuerdo al estado retroviral.

Agente Sub-población	<i>Mycoplasma hemotrópico</i>		<i>M haemofelis</i>		<i>CM haemominutum</i>		<i>CM turicensis</i>	
	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)	N/total	(%)
RV+	24/45	53,3	3/45	6,7	15/45	33,3	8/45	17,8
RV-	3/10	30,0	0/10	0	1/10	10,0	2/10	20,0
Valor de P	0,182		0,401		0,142		0,869	
Riesgo relativo	1,778		-		3,333		0,889	
CI 95%	0,66-4,76		-		0,5-22,39		0,22-3,57	
ViLeF+	13/25	52,0	1/25	4,0	7/25	28,0	6/25	24,0
ViLeF-	14/29	48,3	2/29	6,9	9/29	31,0	4/29	13,8
Valor de P	0,785		0,643		0,808		0,336	
Riesgo relativo	1,077		0,58		0,902		1,74	
CI 95%	0,63-1,83		0,06-6,02		0,39-2,07		0,55-5,48	
VIF +	17/31	54,8	3/31	9,7	12/31	38,7	3/31	9,7
VIF -	10/24	41,7	0/24	0	4/24	16,7	7/24	29,2
Valor de P	0,333		0,117		0,074		0,063	
Riesgo relativo	1,316		-		2,323		0,332	
CI 95%	0,34-2,33		-		0,86-6,3		0,1-1,15	
VIF+ ViLeF+	6/11	54,5	1/11	9,1	4/11	36,4	1/11	9,1
RV -	3/10	30	0/10	0	1/10	10	2/10	20
Valor de P	0,256		-		0,157		0,476	
Riesgo relativo	0,256		-		3,636		0,455	
CI 95%	0,61-5,41		-		0,48-27,33		0,05-4,28	

Gráfico N° 10.

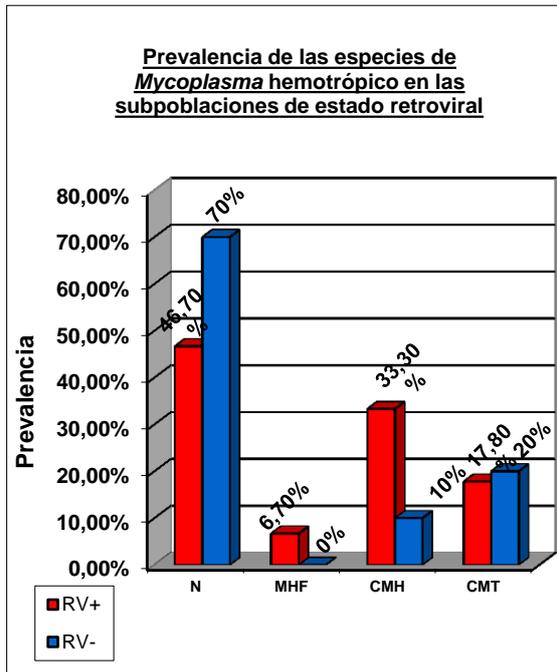


Gráfico N° 11.

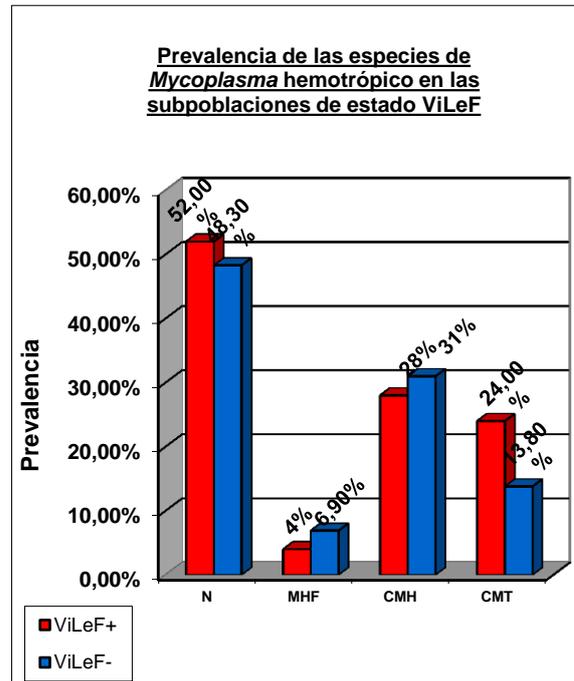


Gráfico N° 12.

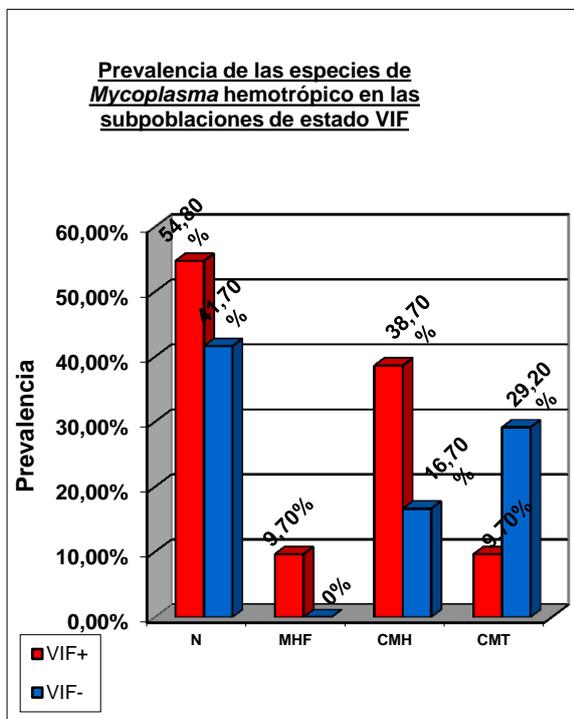
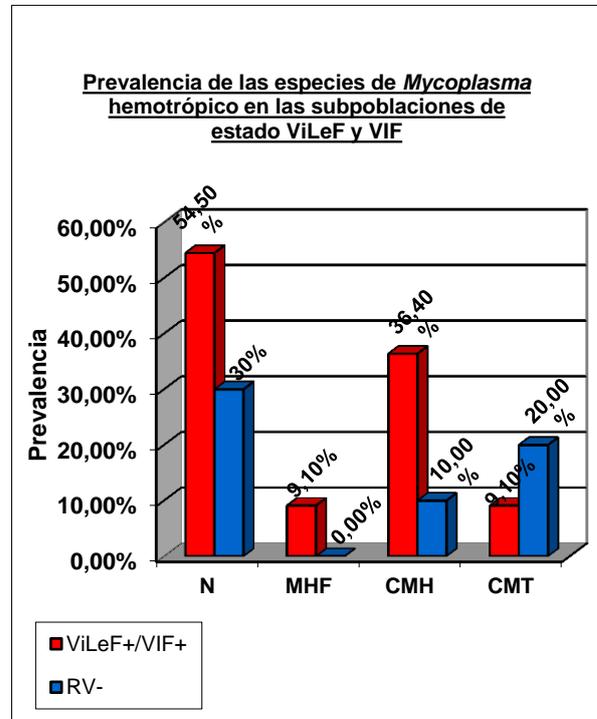


Gráfico N° 13.



7. DISCUSIÓN.

1. La prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico encontrada en la sangre de gatos en Israel fue de un 49%. Esta prevalencia, es marcadamente superior ($P < 0,001$) a las descritas en investigaciones realizadas en otros países, como por ejemplo la encontrada por Jensen *et al.* en EEUU en 2001 de un 19,5%. La alta prevalencia se puede atribuir a un conjunto de factores y condiciones, entre los cuales los siguientes parecen tener una mayor importancia: el clima mediterráneo caluroso que existe en Israel, en el cual la presencia de artrópodos hematófagos, y por lo tanto, la transmisión indirecta (y principal) de los *Mycoplasmas* hemotrópicos se ven favorecidas, como fue demostrado en Suiza, en un ensayo que comparó la prevalencia de gatos portadores de *Mycoplasma* hemotrópico en distintas regiones de ese país, encontrando una mayor prevalencia en los gatos provenientes de las regiones más cálidas (Willi *et al.*, 2006b). Otra causa importante parece ser el gran número de gatos callejeros que fueron incluidos en este estudio (26/55). Anteriormente, se ha demostrado que gatos que tienen acceso a la calle (un hábito de vida "out door"), se encuentran en un riesgo mayor a contraer el agente que uno que no sale a la calle ni interactúa con otros gatos ("in door") (Willi *et al.*, 2006a y 2007). Con mayor razón, un gato callejero que tiene contacto continuo con otros, tiene una intensa exposición al agente ya sea por compartir alimentos, fuentes de agua, intercambiar parásitos y pelear por su territorio. Además, no existió ninguna información sobre el estado sanitario de estos gatos, por lo que se puede asumir que no fueron sometidos a tratamiento preventivo alguno, aumentando la probabilidad de una masiva infestación de parásitos hematófagos. Otro factor que parece tener gran importancia es la alta prevalencia de gatos portadores de agentes retrovirales (VIF y ViLeF) (81,8%) revelada en el ensayo. Se sabe que el VIF suprime el sistema inmune y así, aumenta la probabilidad del animal de ser portador de varios agentes infecciosos, entre ellos *Mycoplasma* hemotrópico y/o presentar enfermedades clínicas en los gatos (Messick, 2004).

Un estudio reciente realizado en Brasil, que al igual que Israel representa una región geográfica calurosa, incorporó gatos portadores de VIF y de ViLeF, revelando una prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico de 50% en gatos portadores de ambos virus y 36% en portadores de VIF, un resultado similar a la prevalencia de 54,5 y 54,8% ($P=1,00$ y $P=0,187$) encontrada en los grupos respectivos en los gatos en Israel (Macieira *et al.*, 2007), siendo esta una prevalencia superior a las previamente mencionadas en Europa o en los Estados Unidos.

Una razón técnica que podría explicar la alta prevalencia, es el uso de partidores universales para *Mycoplasma* que por su naturaleza detectan cualquier variedad de *Mycoplasma* que se encuentre en la muestra. Sin embargo, en el estudio desde el cual se obtuvieron las secuencias de los partidores universales de *Mycoplasma* (Jensen *et al.*, 2001), se encontró una prevalencia de 19,5% solamente. La diferencia entre las prevalencias en los dos estudios, se podría explicar por el gran aumento de variedades de las especies conocidas y la agregación de *CM turicensis* a la base de datos del banco genético, en que se realizó el análisis de las secuencias obtenidas, desde el año 2001 y hasta el actual. En el caso de *CM turicensis*, al comparar la prevalencia encontrada en el ensayo con las reveladas por Willi *et al.*, en 2006, en diferentes países, se encontró que la de Israel (18,2%) es muy superior ($P<0,001$) a las encontradas en Suiza (1,0%) y en el Reino Unido (2,3%) pero es estadísticamente similar a las encontradas en Australia (10%) ($P=0,150$) y en Sudáfrica (26%) ($P=0,388$).

2. A pesar de que la prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico encontrada en la población general de los gatos fue alta, el análisis de la prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico, demostró que *M haemofelis* es la especie de menor prevalencia, en comparación a *CM haemominutum* ($P=0,001$) y *CM turicensis* ($P=0,039$), un hecho que podría tener una importancia en el área de la clínica, ya que se conoce que *M haemofelis* es la especie relacionada con la infección aguda en los felinos (Harrus *et al.*, 2002).

Al analizar la prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico en las subpoblaciones de origen y de estado retroviral, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, al analizar la prevalencia de las distintas especies de *Mycoplasma* hemotrópico en las subpoblaciones, se encontró una diferencia significativa entre las

subpoblaciones 1 y 2, y una diferencia muy cercana al límite aceptable entre los gatos de estado VIF positivo y negativo. Para la subpoblación 1 y los gatos VIF positivo, *CM haemominutum* presentó mayores prevalencias que las encontradas en las subpoblaciones 2 (P=0,007) y FIV negativo (P=0,074), mientras que *CM turicensis* fue la especie más prevalente en la subpoblación 2 (P=0,003) y en los gatos VIF negativo (P=0,063). Se sabe que tanto *CM haemominutum* como *CM turicensis*, son especies que poseen efectos patógenos, principalmente en el caso de coinfección con *M haemofelis* o con otra enfermedad debilitante (Messick 2004; Willi *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que el 86% de los gatos positivos a *CM turicensis* (6/7) fueron gatos callejeros y tuvieron un origen físico común (gatería de Tel Aviv). Se puede asumir que el contacto físico generado por el hacinamiento, durante el alojamiento en la gatería aumenta la tasa de transmisión del agente entre los gatos, aunque se cree que sería la conducta agresiva, más que el uso común de utensilios como comederos y bebederos, la que tendría mayor importancia en la transmisión del agente (Willi *et al.*, 2006 a, b).

3. Al igual que en las subpoblaciones, se analizó la prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico encontrada en los distintos subgrupos. En ambas categorías de edad, se encontraron prevalencias altas, pero no se encontró una diferencia significativa (P=0,455), hecho que se podría deber a las características especiales de cada una: la gran mayoría (88%) de los gatos de un año de vida o más (los más factibles de ser portadores de *Mycoplasma* hemotrópico por mayor exposición) (Tasker *et al.*, 2003), fueron gatos portadores de VIF (16/18) y algunos de ellos con una enfermedad clínica, hecho que aumenta la probabilidad a encontrar gatos positivos a *Mycoplasma* hemotrópico. A la vez, los gatos jóvenes incluidos en este ensayo (considerados como más predispuestos a contagiarse con el agente al no tener el sistema inmune completamente desarrollado), fueron gatos callejeros que probablemente estuvieron expuestos al agente continuamente durante su vida. Además, al ser callejeros, su interacción con otros gatos es más frecuente que en el caso del gato de casa, facilitando el intercambio de parásitos hematófagos y los encuentros agresivos que resultan en lesiones.

En el caso de los subgrupos divididos según los distintos géneros, la diferencia de prevalencia de *Mycoplasma* hemotrópico tampoco fue significativa (P=0,376).

Algunas investigaciones, describen que no existe diferencia entre géneros (Bobade *et al.*, 1986), pero otros describen mayor prevalencia en los machos, apuntando principalmente a su conducta agresiva y el hábito “*out door*” más frecuente por la conducta sexual (Willi *et al.*, 2006a y 2007).

En este ensayo la proporción entre machos (n=29) y hembras (n=19) no fue balanceada y existieron 7 gatos de género desconocido, hecho que tal vez modificó los resultados. Además, tiene importancia el hecho que la mayoría de las hembras (89,5%) que participaron en este ensayo (17/19) fueron gatas callejeras (“*out door*”) y por lo tanto con una exposición alta y continua al agente. En el análisis de la prevalencia de las especies de *Mycoplasma* hemotrópico en los subgrupos, se encontró una relación entre el género masculino y la presencia de *CM haemominutum*, determinando una diferencia significativa (P=0,021) entre la prevalencia de esta especie del agente en los machos (41,4%) con respecto a las hembras (10,5%).

Esto se explica, en base de la relación anteriormente demostrada entre el género masculino y la alta prevalencia de VIF en comparación con las hembras (P=0,001; RR=2,222; CI95% 1,29-3,84) y de la alta prevalencia de *CM haemominutum* en la subpoblación VIF positivo en comparación a la subpoblación VIF negativo (RR=2,323), sugiriendo que la alta prevalencia de *CM haemominutum* en los machos se debe a la alta prevalencia de VIF y su efecto supresor sobre el sistema inmune.

4. Los casos mencionados con coinfección fueron solamente dos, encontrando un mayor número de casos de aparición de bandas múltiples en los ensayos de electroforesis. Los partidores universales para *Mycoplasma* generaron productos de tamaño muy similar (170 y 190 bp), lo cual produce una dificultad técnica en la separación de las bandas. En la gran mayoría de los casos, al menos uno de los productos no generó resultado específico al secuenciarlo, por contener una cantidad o calidad insuficiente. Por este motivo, se sospecha que la importancia porcentual de las coinfecciones resultó subestimada al usar esta técnica. Para mejorar la exactitud de este parámetro, se debería utilizar un PCR específico para cada especie conocida de *Mycoplasma* hemotrópico, en cada muestra. Por defecto, especie o variedades desconocidas no se encontrarían.

5. En el ensayo de PCR para la detección de VIF en la subpoblación 1 que fue seleccionada por el estatus positivo a VIF de los gatos, determinado mediante una prueba serológica, se encontró una prevalencia de 96,5% (28/29). Esta similitud indica que las dos técnicas entregan resultados similares en la detección de VIF, lo que nos permite comparar los resultados de este estudio con estudios anteriores en que solamente detectaron VIF mediante una prueba serológica.

En la subpoblación 2, los gatos fueron seleccionados al azar con respecto al estatus de VIF o su estado de salud y por lo tanto, esto nos permite inferir el resultado a la población de gatos callejeros en general. En este caso se encontró una prevalencia de 11,5%. Esta prevalencia es similar ($P=1,00$) a la encontrada en Israel del 12% mediante una prueba serológica (Baneth *et al.*, 1999).

Sorprendentemente, la prevalencia de ViLeF encontrada en Israel (2008) mediante un ensayo serológico (46,3%), fue significativamente superior ($P<0,001$) a la reportada por Baneth *et al.* (1999) del 3,8%, detectada mediante la misma técnica. La diferencia se podría atribuir a la composición ya mencionada de la población de gatos estudiada.

8. CONCLUSIONES.

- Las tres especies de *Mycoplasma* hemotrópico internacionalmente conocidas; *M haemofelis*, *CM haemominutum* y *CM turicensis*, fueron encontradas en sangre de gatos de Israel y pueden ser detectadas con certeza mediante un ensayo específico de PCR.
- La prevalencia de hemoplasma en gatos de Israel parece ser más alta que la estimada en otros países debido a distintas razones.
- Aparentemente la prevalencia de las distintas especies de hemoplasma, varía en poblaciones de gatos de diferentes características. Así, se requiere el análisis de una muestra de tamaño mayor para demostrar una relación más ajustada.
- Se requieren estudios posteriores de este agente en técnicas complementarias como es el PCR de tiempo real específico para cada especie de hemoplasma, lo que permitiría estudiar las características adicionales del agente, su efecto clínico y epidemiología. Un tema importante para estudios posteriores es la interacción de las especies de hemoplasma en casos de coinfección de dos o más especies, las condiciones epidemiológicas que la permiten, su efecto clínico y sus consecuencias.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- **BANETH, G.; KASS, P.; STEINFELD, D.; BESSER, M.** 1999. A seroepidemiological of feline coronavirus, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among cats in Israel. *Israel j vet med.* 54 (2): 39-43.

- **CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C.** 2003. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Vet. Microbiol.* 93: 307-317.

- **GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G.** 2007. Detection of Ehrlichia canis by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary J.* doi:10.1016/j.tvjl.2007.01.013

- **HARRUS, S.; KLEMENT, E.; AROCH, I.; STEIN, T.; BARK, H.; LAVY, E.; MAZAKI-TOVI, M.; BANETH, G.** 2002. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *Vet. Rec.* 151: 82-85.

- **JENSEN, W.; LAPPIN, M.; KAMKAR, S.; REAGAN, W.** 2001. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *AJVR*, 62(4):604-608.

- **MACIEIRA, D.; DE MENDEZ, R.; DAMICO, C.; ALMOSNY, N.; MCLANE, H.; DAGGY, J.; MESSICK, J.** 2007. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro e Brazil. *J. Feline Med. Surg.* 10(2):120-129.

- **MESSICK, J.B.; BERENT, L.M.; COOPER, S.K.** 1998. Development and evolution of a PCR-based assay for detection of *Hemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length analysis. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):462-466.

- **MESSICK, J. B.** 2004. Hemotrophic *Mycoplasmas* (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.* 33(1):2-13.

- **NASH, A.; BOBADE, P.** 1986. Haemobartonellafelis infection in cats from the Glasgow area. *Vet. Rec.* 119: 373-375.

- **RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M.** 1997. Western Immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. J. Clin. Microbiol. 35(4): 823-829.

- **TASKER, S.; HELPS, C.R.; DAY, M.J.; HARBOUR, D.A.; SHAW, S.E.; HARRUS, S.; BANETH, G.; LOBETTI, R.G.; MALIK, R.; BEAUFILS, J.P.; BELFORD, C.R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.** 2003a. Phylogenetic analysis of Hemoplasma species: an international study. J. Clin. Microbiol. 41(8): 3877-3880.

- **TASKER, S.; BINNS, S.H.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A.; HELPS, C.R.; JENSEN, W.A.; OLVER, C.S.; LAPPIN, M.R.** 2003b. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. Vet. Rec. 152: 193-198.

- **WILLI, B.; BORETTI, F. S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M.L.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R.** 2005. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 43(6): 2581-2585.

- **WILLI, B.; BORETTI, F. S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R.** 2006a. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 44(3): 961-969.

- **WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F.S.; DOHERR, M.G.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; LOBETTI, R.G.; MALIK, R.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R.** 2006b. Phylogenetic analysis of "Candidatus *Mycoplasma turicensis*" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. J. Clin. Microbiol. 44(12): 4430-4435.

- **WILLI, B.; BORETTI, F.; TASKER, S.; MELI, M.; WENGI, N.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R.** 2007. From Haemobartonella to hemoplasma: molecular methods provide new insights. Vet. Microbiol. Dec. 15;125(3-4):197-209.