



DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE LEUCEMIA FELINA (FELV) Y VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA (VIF) MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR A PARTIR DE UNA MUESTRA DE GATOS EN BOGOTÁ.

ESTUDIANTES:

LAURA PAOLA CALDERON GUERRERO
EVELYN CATALINA MALDONADO REYES

ASESORES EXTERNOS

FABIO ANCIZAR ARISTIZABAL GUTIERREZ
LUISA FERNANDA CASTILLO LEÓN

ASESORA INTERNA

RUTH MELIDA SANCHEZ MORA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO EXPERIMENTAL
BOGOTÁ D.C, 2025



DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE LEUCEMIA FELINA (FELV) Y VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA (VIF) MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR A PARTIR DE UNA MUESTRA DE GATOS EN BOGOTÁ.

APROBADA: _____

JURADOS: _____

ASESORES:

Fabio Ancizar Aristizabal Gutierrez

Luisa Fernanda Castillo León

Ruth Melida Sanchez Mora

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO EXPERIMENTAL
BOGOTÁ D.C, 2025

DEDICATORIA

A Dios por darnos la salud, la sabiduría y la perseverancia necesaria para culminar esta etapa, y por permitirnos avanzar con esperanza incluso en los momentos de cansancio, duda o dificultad.

A nuestras familias, quienes han sido nuestro mayor respaldo y ejemplo constante de amor, entrega y confianza. Gracias por acompañarnos con paciencia, por creer en nosotras incluso cuando el proceso se tornaba desafiante y por motivarnos a no rendirnos. Este logro también es suyo, porque cada palabra de aliento, cada gesto de apoyo y cada sacrificio compartido hicieron posible que hoy estemos más cerca de convertirnos en las profesionales que soñamos ser.

A nosotras mismas, por la disciplina, el compromiso y la valentía de continuar, por mantener la fé en nuestras capacidades y por no rendirnos cuando el camino se hizo difícil. Este proyecto es también el reflejo de nuestro crecimiento personal y académico, y un recordatorio de que somos capaces de alcanzar lo que soñamos.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, lugar donde se desarrolló la fase práctica de este proyecto y donde recibimos el acompañamiento, los recursos y el espacio necesarios para llevarlo a cabo. A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por brindarnos la formación académica, los valores profesionales y la oportunidad de proyectarnos como futuras bacteriólogas comprometidas con el avance de la ciencia y la salud.

Al profesor Fabio Ancizar Aristizabal Gutierrez, por su paciencia, orientación constante y disposición para guiarnos en cada etapa del trabajo. A la profesora Luisa Fernanda Castillo Leon, por ser el puente que hizo posible el desarrollo de este proyecto y acompañarnos con compromiso y profesionalismo. A la profesora Ruth Melida Sánchez, cuyo apoyo inicial permitió establecer los contactos necesarios para que esta investigación tomará forma; su intervención fue clave para que este proceso se concretara.

A Juan David Saavedra, quien fue más que un apoyo académico, con su experiencia, disposición y acompañamiento constante fueron determinantes durante el desarrollo práctico del proyecto. Además, sus palabras de ánimo y la confianza que nos transmitió nos dieron la fuerza para avanzar.

De manera especial, Evelyn desea agradecer a Jenifer Sanchez por su amor, apoyo, comprensión y paciencia durante todo el desarrollo de este proyecto. Su motivación y confianza mantuvieron el equilibrio necesario para alcanzar este logro.

A nuestras familias, por su amor incondicional, respaldo emocional y fe en nosotras incluso en los momentos de mayor desafío. A Dios y a la vida, por permitirnos llegar hasta este punto con salud, fortaleza y propósito.

Finalmente, nos permitimos agradecer profundamente a mi compañera, cuyo esfuerzo, compromiso y presencia constante fueron pilares esenciales en este camino. Este logro es el reflejo del trabajo compartido, la confianza mutua y el empeño conjunto por alcanzar nuestras metas.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo general.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. ANTECEDENTES.....	11
4. MARCO REFERENCIAL.....	14
4.1 Virus de leucemia felina (FeLV).....	14
4.1.1 Estructura.....	14
4.1.2 Patogenia.....	15
4.1.3 Transmisión.....	17
4.1.4 Manifestaciones Clínicas.....	17
4.1.5 Tratamiento.....	18
4.2 Inmunodeficiencia felina (FIV).....	18
4.2.1 Estructura.....	18
4.2.2 Patogenia.....	19
4.2.3 Transmisión.....	20
4.2.4 Manifestaciones Clínicas.....	21
4.2.5 Tratamiento.....	21
4.3 Técnicas de detección.....	22
4.3.1. Técnicas convencionales.....	22
4.3.2. Técnicas moleculares.....	22
4.3.2.1. Reacción en cadena polimerasa (PCR).....	23
4.3.2.2. PCR en tiempo real.....	26
4.3.2.3 PCR multiplex.....	27
4.4. Ventajas de las técnicas moleculares en detección viral.....	27
4.5 Métodos de extracción.....	28
4.5.1 Métodos manuales.....	28
4.5.1.1. Salting out.....	28
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	28
5.1. Universo, población, muestra.....	29
5.1.1. Universo.....	29
5.1.2. Población.....	29
5.1.3. Muestra.....	29
5.2 Hipótesis, variables, indicadores.....	29
5.2.1. Hipótesis.....	29
5.2.2. Variables e indicadores.....	29

5.3. Técnicas y procedimientos.....	30
5.4. Identificación de cebadores adecuados.....	30
5.5. PCR Uniplex.....	31
5.5.1. Evaluación PCR uniplex.....	31
5.6. Caracterización de rangos dinámicos.....	32
5.6.1. Evaluación qPCR uniplex.....	32
5.6.2. Curvas estándar.....	32
5.7. Toma de muestras hisopados orales.....	33
5.8. Extracción de ARN mediante método de Salting Out.....	33
5.8.1. Muestras de hisopados orales.....	33
5.8.2. Evaluación de la calidad del ARN.....	34
5.9. RT-qPCR Multiplex.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Identificación de cebadores adecuados.....	35
6.2 PCR Uniplex.....	36
6.2.1. Evaluación PCR Uniplex.....	36
6.3. Caracterización de rangos dinámicos qPCR.....	36
6.4 Evaluación de ácidos nucleicos.....	39
6.5 RT-PCR One step Multiplex.....	40
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSIONES.....	44
9. RECOMENDACIONES.....	44
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
11. ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virus de leucemia felina (FeLV)	14
Figura 2. Patogenia de la leucemia felina (FeLV)	15
Figura 3. Estructura del virus de inmunodeficiencia felina (FIV)	17
Figura 4. Patogenia de la inmunodeficiencia felina (VIF)	18
Figura 5. Esquema del proceso de amplificación del ADN mediante PCR	21
Figura 6. Resultados del análisis in silico de los <i>primers</i> mediante BLASTn	30
Figura 7. Productos de amplificación obtenidos mediante PCR Uniplex	31
Figura 8. Caracterización Rangos dinámicos qPCR detección FIV	33
Figura 9. Caracterización Rangos dinámicos qPCR detección FeLV	33
Figura 10. Análisis informático BLAST virus de inmunodeficiencia felina (FIV)	41
Figura 11. Análisis informático BLAST virus de leucemia felina (FeLV)	42
Figura 12. Curvas de amplificación del virus de inmunodeficiencia felina (FIV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 1-9	43
Figura 13. Curvas de amplificación del virus de inmunodeficiencia felina (FIV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 10-18	44
Figura 14. Curvas de amplificación del gen <i>VEGFA</i> en el sistema RT-PCR multiplex muestras 1-9	44
Figura 15. Curvas de amplificación del gen <i>VEGFA</i> en el sistema RT-PCR multiplex muestras 10-18	45
Figura 16. Curvas de amplificación del virus de leucemia felina (FeLV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 1-9	45
Figura 17. Curvas de amplificación del virus de leucemia felina (FeLV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 10-18	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados FIV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico	12
Tabla 2. Resultados FeLV, mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico	12
Tabla 3. Resultados PCR y electroforesis para detección de FIV/ FeLV	13
Tabla 4. Identificación de cebadores adecuados	27
Tabla 5. Caracterización de los rangos dinámicos de los sistemas de detección diseñados ..	32
Tabla 6. Límites de detección (LOD) qPCR para FeLV y FIV	32
Tabla 7. Resultados de cuantificación y pureza del ARN extraído de las 18 muestras	42



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE LEUCEMIA FELINA (FeLV) Y VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA (FIV) MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR A PARTIR DE UNA MUESTRA DE GATOS EN BOGOTÁ.

RESUMEN

El presente trabajo se centró en la detección molecular de los virus de leucemia felina (FeLV) y de inmunodeficiencia felina (FIV) mediante la aplicación de la técnica de PCR a partir de muestras de hisopado oral obtenidas de gatos. Para ello, se llevó a cabo la estandarización de primers específicos y la caracterización de los rangos dinámicos de detección mediante ensayos de PCR uniplex y multiplex en tiempo real, logrando identificar cargas virales bajas con alta sensibilidad y especificidad. Las muestras de hisopados orales fueron sometidas a un proceso manual de extracción de ARN mediante el método *salting out*, el cual permitió obtener material genético de calidad suficiente para la amplificación, aunque se evidenciaron leves impurezas en algunos extractos. La amplificación del gen endógeno *VEGFA*, empleado como control interno, confirmó la integridad del ARN y la ausencia de inhibidores en las reacciones, garantizando la fiabilidad de los resultados. De las muestras analizadas, se detectó un caso positivo para FeLV y ninguno para FIV.

Se observó cierta variabilidad en los resultados atribuible a diferencias en la técnica de muestreo, ya que la toma de muestras fue realizada por distintos voluntarios. Este hallazgo coincide con investigaciones previas que destacan la necesidad de estandarizar los procedimientos de recolección para optimizar la reproducibilidad diagnóstica. En síntesis, el sistema RT-qPCR multiplex desarrollado y validado en este estudio representa una herramienta diagnóstica sensible, específica y confiable para la detección de FeLV y FIV, con potencial de aplicación tanto en el ámbito clínico como en estudios epidemiológicos de poblaciones felinas urbanas.

PALABRAS CLAVE : Felinos, PCR, Detección molecular, Extracción de ARN, FIV, FeLV

1. INTRODUCCIÓN

Los virus de leucemia felina e inmunodeficiencia felina son un problema de salud significativo en la población felina, estas enfermedades de origen viral son dos de las principales causas de morbilidad y mortalidad en gatos domésticos, así mismo de la reducción de su calidad y esperanza de vida. En un estudio realizado en Pereira (2022), se registró que la prevalencia de las infecciones por estos virus era del 21,4% y 24.3% para la inmunodeficiencia y leucemia felina, respectivamente; además se presentó una coinfección del 9,1%. La infección por VIF fue mayor en gatos machos (30,9%) y en adultos (28,9%) (1). Uno de los grandes problemas de estas dos enfermedades es que no existe un tratamiento que elimine la infección viral. En ocasiones se ha intentado realizar terapia con antivirales e inmunomoduladores, pero no es curativo. Los felinos que presentan síntomas deben tratarse con medicamentos específicos según la condición clínica que presente, requieren de revisiones y controles periódicos por veterinarios y de cuidados especiales por parte de los propietarios (2).

En estas enfermedades un diagnóstico rápido y temprano no permite que la infección avance a una etapa más crónica, a pesar de que no hay una cura, existen tratamientos que si se administran en una etapa temprana pueden dar un mejor manejo en estas infecciones y permiten que el felino pueda gozar de un buen estado de salud según la evolución de la enfermedad, existen técnicas convencionales que son utilizadas para el diagnóstico de FeLV y VIF las pruebas serológicas, presentan limitaciones en cuanto especificidad y sensibilidad en particular según la fase o estadio en la que se encuentre la infección, lo que impide una detección temprana y rápida, siendo crucial para el manejo de estas enfermedades. Aunque hay limitados estudios sobre la variabilidad en las tasas de prevalencia y los factores asociados con el diagnóstico y las diferentes pruebas aumentan la complejidad del problema (3) por lo cual se propuso estandarizar y optimizar una técnica de PCR multiplex, usando estrategias de toma de muestra poco invasivas.

Actualmente la PCR (Reacción en cadena polimerasa) es una herramienta muy útil para la detección de estos virus, sin embargo, hay ciertos factores como la calidad de la muestra, la concentración de ADN viral, al igual que el uso de combinaciones de cebadores con cinéticas de amplificación de baja eficiencia, entre otros, que afectan la sensibilidad de la prueba y por tanto limitan la confianza que se puede tener en los resultados al tener limitado poder

diagnóstico. Por lo tanto, se planteó una forma de mejorar la sensibilidad de esta técnica mediante el uso de *primers* específicos, evaluación de condiciones experimentales y caracterización de rangos dinámicos usando controles sintéticos y posteriormente, desafiar el sistema con muestras obtenidas a partir de muestras de hisopado orales de felinos, a las cuales se les extrajo ARN con el método de salting out y para su posterior validación de la técnica mediante electroforesis y PCR en tiempo real.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Implementar un sistema de detección por medio de PCR que permita la detección precisa de los virus de leucemia felina (FeLV) e inmunodeficiencia felina (FIV), para mejorar el diagnóstico rápido y confiable para el manejo clínico en felinos.

2.2 Objetivos específicos

- Estandarizar los *primers* proporcionados para la detección de los virus de leucemia felina (FeLV) e inmunodeficiencia felina (FIV) con herramientas *in silico* y en laboratorio.
- Implementar los métodos de detección mediante PCR y determinar los rangos dinámicos a nivel analítico propios de los sistemas de detección en evaluación para la detección del virus de leucemia felina (FeLV) y virus de inmunodeficiencia felina (FIV).
- Evaluar el desempeño del sistema de detección implementado en muestras de hisopados orales de felinos.

3. ANTECEDENTES

El diagnóstico molecular de enfermedades en felinos producidas por agentes infecciosos, como el virus de la leucemia felina y el virus de la inmunodeficiencia felina, ha sido fundamental para el manejo de estas enfermedades. Diversos estudios han evaluado la eficacia de la PCR para el diagnóstico de FeLV y FIV en felinos. En el estudio de Velilla, Martínez, y Soledad González (2020) se estandarizó una PCR múltiple en tiempo real con sondas taqman para la detección del virus de inmunodeficiencia felina (VIF), virus de leucemia felina (FeLV) o infecciones mixtas, incluyendo la amplificación de un gen constitutivo del genoma del gato doméstico, usado como control interno. Se analizaron 44

muestras positivas y 41 muestras negativas (controles). Según los resultados para FIV 3 muestras fueron positivas y 39 negativas con prueba serológica y mientras que con PCR 5 se presentaron como positivas. Para leucemia 27 muestras fueron positivas y 24 negativas con ambas pruebas y 18 presentaron discrepancia en el resultado. Además, se calculó la sensibilidad (0,53/0,26) y la especificidad (0,46/0,74) para leucemia y sida respectivamente, con la metodología de Broemeling que considera que la prueba de referencia contra la cual se compara no es un referente verdadero o Gold standard (4).

Por su parte, Espinoza (2022), realiza la detección molecular de coinfecciones, como las ocasionadas por *Malassezia* spp. y *Cryptococcus* spp. en felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y Virus de Leucemia Felino, utilizando un enfoque metodológico que combina técnicas serológicas y moleculares. Se emplearon 60 muestras sanguíneas de felinos y, mediante el método tradicional de extracción de ADN con fenol-cloroformo, se amplificaron los productos por PCR. Para los controles positivos, se utilizó ADN extraído de la vacuna Leukocell (cepa Kawakami-Theilen) para FeLV y una muestra de un paciente positivo a FIV.

Tabla resultados FIV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico

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

Tabla 1. Resultados FIV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico (SNAP - test de prueba inmunológica rápida basada en ELISA). Aquellos verdaderamente positivos son 21, de estos 15 resultaron negativos al inmunoensayo cromatográfico y solamente 6 resultaron positivos. Los verdaderos negativos son 12, de los cuales 11 resultaron negativos a ambas pruebas y uno dio falso positivo en el ensayo inmunocromatográfico.

Tomado y modificado de: Espinoza ZGH. *Detección molecular de Malassezia spp. y Cryptococcus spp. en piel de felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y/o Virus de Leucemia Felino* [Internet]. Uanl.mx. diciembre 2022 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <http://eprints.uanl>. (5).

Tabla resultados FeLV mediante PCR e inmunoensayo cromatográfico

	SNAP FIV POSITIVO	SNAP FIV NEGATIVO	TOTAL	PORCENTAJE
PCR FeLV POSITIVO	2	0	2	6.06%
PCR FeLV NEGATIVO	12	19	31	93.94%
TOTAL	12	19	33	100%
PORCENTAJE	42.42%	57.58%	100%	

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

Tomado y modificado de: Espinoza ZGH. *Detección molecular de Malassezia spp. y Cryptococcus spp. en piel de felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y/o Virus de Leucemia Felino [Internet]. Uanl.mx. diciembre 2022 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <http://eprints.uanl.> (5).*

Tabla resultados FIV y FeLV mediante PCR

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

Tabla 3. Resultados PCR y electroforesis para detección de FIV/ FeLV

Tomado y modificado de: Espinoza ZGH. *Detección molecular de Malassezia spp. y Cryptococcus spp. en piel de felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y/o Virus de Leucemia Felino [Internet]. Uanl.mx. diciembre 2022 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <http://eprints.uanl.> (5).*

Estas diferencias entre las técnicas diagnósticas resaltan la importancia de utilizar sistemas de PCR caracterizados para confirmar los resultados serológicos, especialmente en casos de infecciones virales en estadios tempranos o con baja carga viral (5).

Mientras que, en el 2020 Victor y colaboradores realizan detección molecular de FeLV en muestras orales, conjuntivas y rectales, demostrando ser comparativamente efectiva a la detección en muestra de sangre. Se analizó 145 muestras de felinos de sangre completa e hisopos orales, conjuntivales y rectales. Para la detección del ADN proviral de FeLV, se utilizó la amplificación por PCR del gen *gag*, un fragmento de 450 pb común a todos los subtipos de FeLV exógeno. Este enfoque fue complementado con pruebas serológicas, como el SNAP Combo FeLV Ag/FIV, para identificar la presencia del antígeno p27 y anticuerpos anti-FIV. La PCR de PBMC también se empleó como prueba confirmatoria de la infección. Tras la amplificación, los productos obtenidos fueron secuenciados y comparados con cepas de referencia de FeLV en GenBank, mostrando un alto grado de similitud. Se identificó una sensibilidad del 86,11% y una especificidad del 97,26% para la PCR en hisopos orales, lo que indicaría que la detección en mucosas puede ser tan efectiva como en sangre (6). Estos antecedentes destacan la eficacia de combinar pruebas moleculares y serológicas para la detección precisa y la caracterización genética de FeLV en gatos, lo que tiene implicaciones importantes en el diagnóstico y control de esta enfermedad.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 Virus de leucemia felina (FeLV)

4.1.1 Estructura

El virus de la leucemia felina (FeLV) es un virus de ARN con envoltura que pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* y al género *Gammaretrovirus*, se caracteriza por su genoma de ARN monocatenario positivo, el cual se replica mediante un intermediario de ADN bicatenario integrado en el cromosoma del hospedador infectado, lo que permite su persistencia y replicación en las células infectadas. Estos *Gammaretrovirus* están compuestos por dos cadenas de ARN las cuales son idénticas, junto con enzimas esenciales como la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa, las cuales se encuentran empaquetadas en un núcleo formado por la proteína de la cápside p27, rodeado de la matrix

dentro de esta se encuentra la glicoproteína gp 70 y la proteína transmembrana p15E, lo que se puede observar en la figura 1 (8).

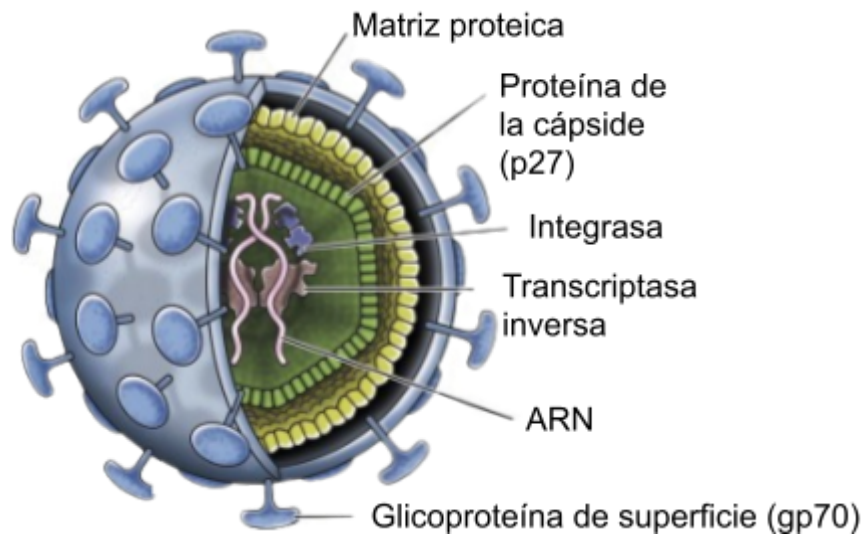


Figura 1. Estructura del virus de leucemia felina (FeLV)

Tomado y modificado de: Sykes JE, Hartmann K. *Feline leukemia virus infection*. En: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier; 2014. [citado el 12 de mayo de 2025] p. 224–38.

Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7152252/#bib25>.(8).

4.1.2 Patogenia

La infección por FeLV suele iniciarse cuando un gato sano entra en contacto con las secreciones de un gato portador del virus. Generalmente, la entrada del virus ocurre a través de la vía oronasal, donde se instala en los tejidos linfoides locales. Una vez allí, el virus utiliza receptores específicos de cada subgrupo para penetrar en las células, principalmente linfocitos y macrófagos. Tras infectarse, comienza a multiplicarse y se disemina mediante la circulación de linfocitos y monocitos(9).

Los portadores del FeLV a menudo presentan una reducción generalizada de la respuesta inmune, lo que los hace más susceptibles a infecciones secundarias por patógenos oportunistas, igualmente, se compromete la respuesta inmunológica felina en estudios *in vitro*. Aún no se comprende completamente el mecanismo mediante el cual el FeLV altera las funciones inmunitarias celulares, existen evidencias de que puede interferir con la secreción de linfocinas generadas normalmente por los linfocitos T activados. También se ha identificado que ciertas proteínas virales tienen efectos inmunosupresores. Por ejemplo, la

proteína p15 del FeLV a diferencia de la p27 inhibe la proliferación de linfocitos felinos estimulada por lectinas (7).

Esta enfermedad tiene varias formas de presentación clínica dependiendo del sistema inmune del hospedador y la cepa viral involucrada (figura 2), la forma "**abortiva**" del FeLV se caracteriza por una respuesta inmune exitosa que elimina el virus, mientras que en la **regresiva**, el virus se replica brevemente antes de ser controlado por el sistema inmune, se caracteriza por la ausencia parcial o total de viremia, aunque el virus permanece integrado en el ADN de la médula ósea u otros tejidos, sin circular en la sangre. Razón, por la que sólo puede detectarse mediante pruebas de PCR tomando muestras apropiadas. En este estado, el animal conserva la posibilidad de reactivar la viremia en cualquier etapa de su vida, durante la división celular, el ADN proviral se replica y pasa a las células hijas, lo que permite que líneas celulares completas contengan material genético del virus. Sin embargo, este ADN no llega a expresarse en forma de proteínas virales ni a generar partículas infecciosas. Por lo tanto, los gatos con infección regresiva no eliminan el virus ni representan un riesgo de contagio para otros, (9). Esta puede persistir de por vida y puede reactivarse con inmunosupresión, como podría ocurrir durante el embarazo o después del tratamiento con fármacos inmunosupresores (8). Por otro lado en la forma "**persistente**" esta fase se inicia cuando el virus invade la médula ósea, donde se encuentran células de rápida replicación. En pocas semanas se establece la viremia y el material genético viral pasa a incorporarse en cada nueva célula producida en la médula, lo que asegura la persistencia de la infección (9). El virus se mantiene en el organismo durante meses o incluso años, conduciendo a una inmunosupresión y aumentando el riesgo a diversas infecciones (8).

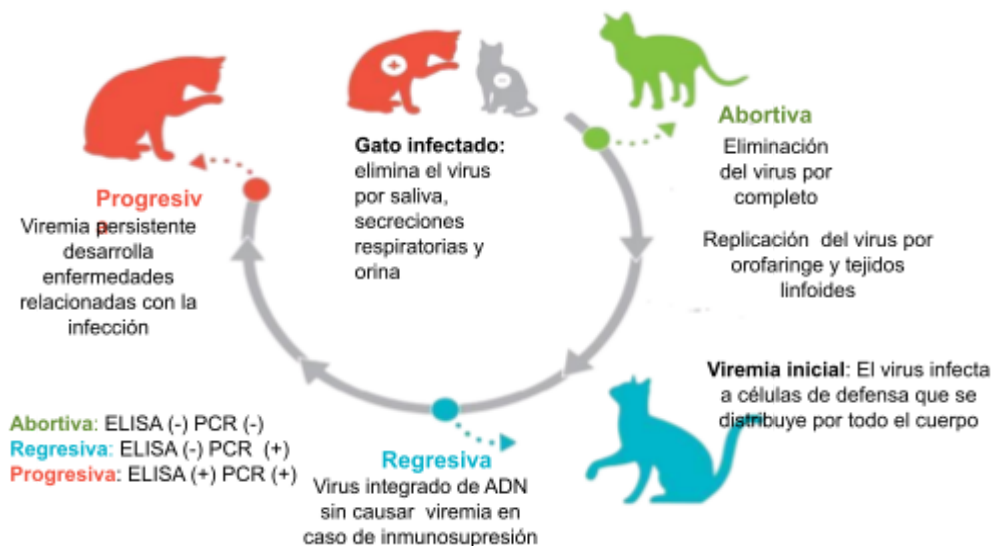


Figura 2. Patogenia de la leucemia felina (FeLV)

Tomado y modificado de: *da Vida ÁDOCC. UNIVERSIDAD DE CAXIAS DEL SUL [Internet].*

Ucs.br.2021 [citado el 18 de octubre de 2025]. Disponible en:

<https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/11048/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20Jessica%20Martins%20Tadeu.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (9).

4.1.3 Transmisión

Su transmisión es esencialmente por el contacto a través de la saliva, como ocurre durante el acicalamiento mutuo, los lamidos o al compartir recipientes de comida y agua. Además, existen otras vías de contagio menos comunes, como las mordeduras, las transfusiones sanguíneas, la leche materna e incluso mediante vectores como las pulgas.(8).

4.1.4 Manifestaciones Clínicas

Con este virus se presentan diferentes manifestaciones clínicas desde neoplasias, linfomas de estos los más presentados son el mediastínico, el multicéntrico, el espinal, el renal o el ocular, estos linfomas presentados con FeLV se originan principalmente en células T a comparación de linfomas presentados por el FIV que son de células B. FeLV puede generar anemia y trastornos en la médula ósea como aplasia pura de glóbulos rojos, lo que se traduce en una anemia no regenerativa severa, caracterizada por la presencia de eritrocitos macrocíticos y la disminución de precursores eritroides en la médula ósea. Los trastornos neurológicos pueden presentarse como resultado de una neoplasia en el sistema nervioso central (SNC), de infecciones oportunistas o directamente a causa de la infección por FeLV. Además, la proteína de la envoltura del FeLV puede ser potencial neurotóxico, entre los seguimientos clínicos puede haber anisocoria, midriasis, síndrome de Horner e incontinencia urinaria en la infección por FeLV se considera una de sus causas más comunes, se ha documentado una mielopatía que se manifiesta con una variedad de síntomas neurológicos, tales como desorientación, letargo, vocalización excesiva, ataxia progresiva, debilidad, parálisis, sensibilidad aumentada, incontinencia urinaria, estreñimiento recurrente y anisocoria acompañada de reflejos disminuidos (8)(9).

Su sintomatología puede variar y está determinada por múltiples factores, entre ellos la cepa específica del virus, la cantidad de virus a la que el animal fue expuesto, la vía de entrada del

patógeno, condiciones que afectan el sistema inmunológico con estas últimas se incluyen la edad del hospedador, su predisposición genética, la presencia de infecciones, el nivel de estrés al que está sometido o el uso de medicamentos que comprometen la respuesta inmunitaria (8).

4.1.5 Tratamiento

El tratamiento depende del estado de la infección, su sintomatología, en los casos de anemias no regenerativas pueden necesitar transfusiones sanguíneas de manera recurrente. Aunque estos animales ya presentan niveles elevados de eritropoyetina en suero, en muchos casos los tratamientos con darbepoetina o eritropoyetina recombinante humana no resultan efectivos, su uso puede considerarse. La efectividad de otros tratamientos, como el filgrastim, no está claramente establecida y su aplicación podría verse limitada por la posible aparición de anticuerpos.

El uso de glucocorticoides y otros fármacos inmunosupresores debe evitarse, excepto cuando exista sospecha de citopenias de origen inmunomediado. En algunos casos de anemia hemolítica inmunomediada (IMHA) asociada a FeLV, los gatos pueden mostrar una buena respuesta a los glucocorticoides, lo que hace que este tratamiento sea, en ciertos casos, necesario (8).

4.2 Inmunodeficiencia felina (FIV)

4.2.1 Estructura

El virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) es un virus de tipo ARN envuelto monocatenario pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae* y, a la subfamilia *Orthoretrovirinae*. Tiene genes característicos como: *gag* (gen en retrovirus que codifica las proteínas estructurales del virus) el cual contiene información para el ensamblaje del virión y, las proteínas estructurales; *pol*, que codifica las enzimas como la transcriptasa inversa, dTUPasa, integrasa proteasa y *env* para las glicoproteínas de la envoltura (10). Lo rodea una nucleocápside (NC), la cápside p24 (CA), la matriz (MA) y la glicoproteína de la envoltura (Env) altamente glicosilada. Las enzimas transcriptasa inversa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR) son responsables de la síntesis de ADN a partir del ARN viral, la integración del ADN

proviral en el ADN de la célula huésped y la escisión de los productos proteicos precursores, respectivamente, lo que se puede observar en la figura 3 (11).

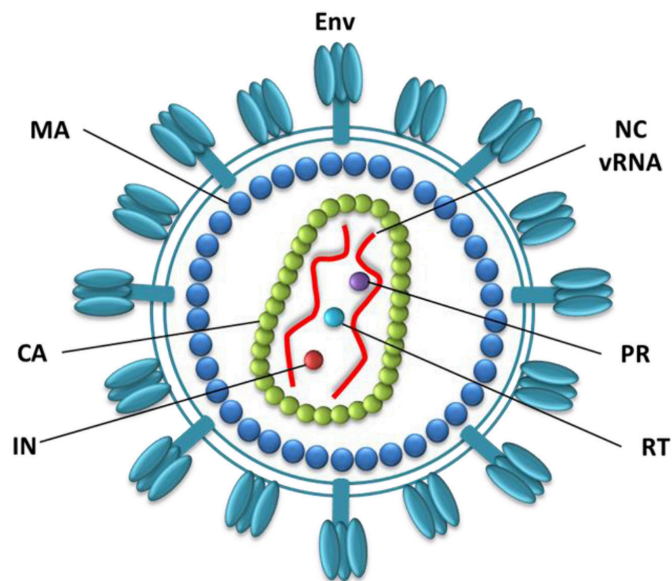


Figura 3: Estructura del virus de inmunodeficiencia felina (FIV)

Tomado de: Bęczkowski PM, Beatty JA. Feline immunodeficiency virus: Current knowledge and future directions. *Adv Small Anim Care [Internet]*. 2022 [citado 12 de mayo de 2025];3:145–59.

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.yasa.2022.05.007> (11).

4.2.2 Patogenia

Su infección inicia con la unión de Env viral al receptor viral en las células susceptibles del animal sometido a la infección, se ha encontrado una preferencia en este virus en dirigirse a las células T CD4+, las células T reguladoras CD4+CD25, los macrófagos, los monocitos, la neuroglia, las células T CD8+ y las células B.

El FIV induce una inmunodeficiencia progresiva caracterizada por una disminución en la proporción de linfocitos CD4+/CD8+, disfunción de células B y T, y alteraciones en la producción de citoquinas. Además, se ha observado una expansión de células T reguladoras (Treg) CD4+CD25^{hi}FoxP3+, que pueden suprimir respuestas inmunitarias específicas y contribuir a la inmunosupresión.

El virus emplea como receptor principal una proteína específica presente en los linfocitos T CD4+ de los gatos, conocida como CD134, y utiliza una segunda proteína, CXCR4, como

correceptor para facilitar su entrada en la célula. Esta afinidad por el CD134 está relacionada con la disminución progresiva de los linfocitos CD4+ a medida que avanza la enfermedad (10). En la figura 4, observamos la forma en la que este virus realiza su patogenia dentro de las células del huésped desde la transmisión hasta su inmunosupresión.

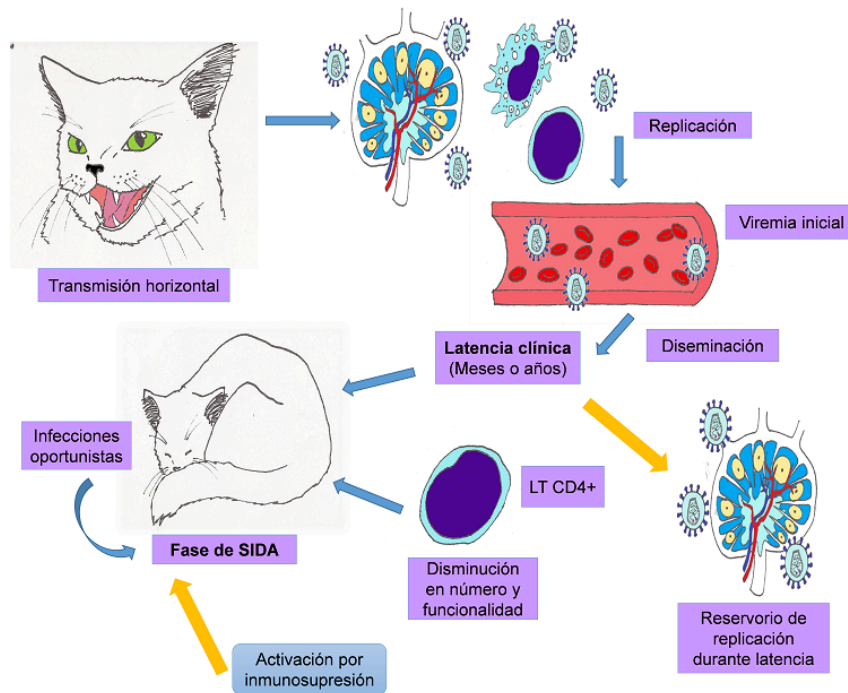


Figura 4. Patogenia de la inmunodeficiencia felina (VIF)

Tomado de: Manuel Emilio Bolio-González, Hugo Ramírez-Álvarez, Carlos Josué Cen-Cen. Aspectos epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico del ViLeF y VIF: una revisión actualizada [Internet].

Redalyc.org. 2019 [citado el 18 de octubre de 2025]. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/journal/5600/560059566005/html/> (12).

4.2.3 Transmisión

Su transmisión es horizontal principalmente por saliva o sangre, puede deberse a diversos factores en los que encontramos a estos hospedadores, también existe una transmisión vertical la cual no es muy común pero esta puede darse o en la gestación así como en la lactancia, esto dependiendo de la fase en la que se encuentre el animal infectado (10).

En muchos casos, los gatos infectados presentan un examen clínico dentro de parámetros normales, lo que dificulta establecer una relación directa entre la infección retroviral y los signos clínicos observados aunque el virus puede considerarse un factor relevante en situaciones donde existen infecciones persistentes que no responden a tratamientos

convencionales prolongados. La progresión de la enfermedad se desarrolla en fases bien definidas (13).

4.2.4 Manifestaciones Clínicas

En la etapa inicial caracterizada por la entrada del virus y su primera diseminación en el organismo, posteriormente comienza a disminuir debido a la activación de la respuesta inmune tanto celular como humoral. El virus se replica en linfocitos T CD4 +, macrófagos y células dendríticas. La carga viral plasmática alcanza su pico máximo entre 8 y 12 semanas después de la infección. El agotamiento rápido de células T CD4 + y la consiguiente producción excesiva de células T CD8 + dan lugar a una inversión de la relación CD4:CD8, que suele durar toda la vida. En esta etapa la respuesta inmune alcanza a detener la replicación viral pero no logra eliminar el virus (14).

La etapa final de la enfermedad se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmunológico, acompañado por la capacidad del virus para evadir la respuesta inmune del organismo. Esto da lugar a la manifestación de signos clínicos indicativos de una inmunodeficiencia severa. Puede afectar el sistema nervioso central, causando cambios de comportamiento, convulsiones y otros signos neurológicos, aunque es menos frecuente que en infecciones por FeLV, el FIV puede predisponer al desarrollo de linfomas, generalmente de células B (14).

4.2.5 Tratamiento

Para el tratamiento lo más recomendable es que los gatos positivos a FIV sean sometidos a un control clínico completo de forma periódica, idealmente cada 6 a 12 meses. Se recomienda la vacunación en los animales sanos más no se recomiendan las vacunas de refuerzo para gatos infectados con FIV que hayan sido vacunados previamente y que vivan en interiores.

Dependiendo de la enfermedad desencadenada después de contraer FIV se debe llevar a cabo el tratamiento con griseofulvina, se ha asociado con mielosupresión y neutropenia grave, los animales diagnosticados con linfoma parecen responder a la quimioterapia multiagente de manera similar a los gatos retrovirus negativos (11).

4.3 Técnicas de detección

4.3.1. Técnicas convencionales

Las técnicas más populares son las serológicas la más comúnmente utilizada es la **ELISA** la cual se utiliza ampliamente en la detección de anticuerpos, en el caso del FIV, y de antígeno en el caso del FeLV, debido a su sentido práctico las pruebas rápidas para detectar anticuerpos contra el virus han sido la base del diagnóstico durante más de dos décadas. Estas pruebas suelen complementarse con técnicas como Western blot, especialmente en contextos de investigación (15).

Existen varios kits de diagnóstico rápidos para FIV/FeLV. El *SNAP FIV/FeLV Combo (Feline Leukemia Virus Antigen/ Feline Immunodeficiency Virus Antibody Test Kit, IDEXX Europe B.V)* es un ELISA de flujo lateral que detecta anticuerpos contra las proteínas p15 y p24. El Witness FeLV/FIV utiliza inmunocromatografía de flujo lateral para detectar anticuerpos contra la glicoproteína gp 40. Por su parte, el *Anigen Rapid FIV/FeLV (Bionote, Inc)* también emplea inmunocromatografía y detecta anticuerpos frente a p24 y gp40 (15).

Se indica como ventajas en esta técnica y se destaca su practicidad y facilidad de uso, lo que la convierte en una herramienta común en la rutina clínica veterinaria. Los kits ELISA son económicos y permiten resultados rápidos, siendo muy útiles para detectar anticuerpos en animales no vacunados. Además, presentan una alta sensibilidad y especificidad cuando se utilizan correctamente, mostrando positivos y negativos superiores al 90% en animales no vacunados. Sin embargo, también existen desventajas: una de las principales es la posibilidad de falsos negativos, especialmente durante la llamada *ventana inmunológica*, que es el periodo entre la infección y la aparición de anticuerpos detectables. También pueden ocurrir falsos positivos en gatitos que han adquirido anticuerpos maternos a través de la leche materna y los resultados pueden ser difíciles de interpretar en animales vacunados, ya que los anticuerpos generados por la vacuna pueden interferir en la prueba. Por estas razones, en algunos casos es necesario complementar el diagnóstico con otras técnicas más específicas y sensibles, como la PCR o el Western blot (15).

4.3.2. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares han transformado de manera significativa el diagnóstico de agentes infecciosos, al permitir la detección directa de ácidos nucleicos con alta sensibilidad y especificidad, incluso en cargas virales bajas o en fases tempranas de la infección. Entre ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes representan herramientas fundamentales para identificar secuencias virales específicas en una amplia variedad de muestras biológicas. Su aplicación ha reemplazado o complementado métodos convencionales menos sensibles optimizando el abordaje clínico. Además, estas técnicas no solo reducen considerablemente el tiempo requerido para la detección, sino que también posibilitan la identificación simultánea de múltiples patógenos en una sola reacción, como ocurre con la PCR en tiempo real y la PCR multiplex, lo que incrementa la eficiencia diagnóstica y el aprovechamiento de las muestras. (16)

4.3.2.1. Reacción en cadena polimerasa (PCR)

La reacción en cadena polimerasa es una reacción enzimática la cual permite multiplicar millones de veces una secuencia específica de ADN a través de múltiples ciclos, en los cuales se copia la región deseada (figura 5). Este proceso se basa en la acción de la enzima ADN polimerasa, la cual, de forma natural, participa en la síntesis de ADN dentro de las células. Cuando se utiliza como base el ADN genómico, hablamos simplemente de PCR(13). En principio, cualquier fragmento de ADN o ARN puede ser amplificado siempre que se conozcan las secuencias que delimitan la zona de interés, ya que sobre estas regiones hibridan los oligonucleótidos diseñados como cebadores, los cuales sirven de punto de inicio para que la polimerasa sintetice nuevas hebras complementarias. De este modo, los elementos esenciales para que la reacción se lleve a cabo son: una molécula molde de ADN que se desea replicar, una ADN polimerasa termoestable, cebadores específicos, los nucleótidos necesarios para la síntesis de las nuevas cadenas y un tampón de reacción que contenga las sales adecuadas para la actividad enzimática, especialmente la presencia de Mg^{2+} , cofactor indispensable para la actividad de la enzima (17).

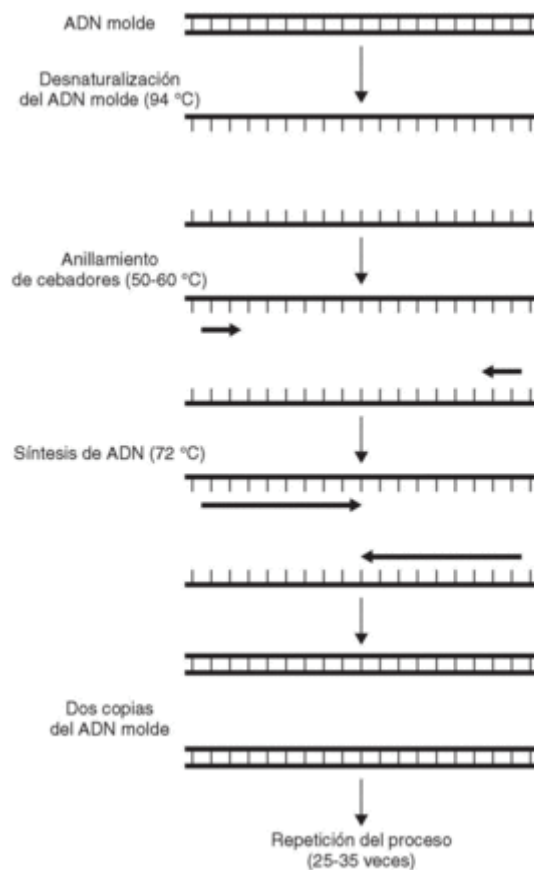


Figura 5. Esquema del proceso de amplificación del ADN mediante PCR. Se observan las tres etapas principales: desnaturalización del ADN molde a 94 °C, anillamiento de los cebadores entre 50 °C y 60 °C, y extensión o síntesis de nuevas hebras a 72 °C. Cada ciclo produce copias adicionales del fragmento de interés, repitiéndose entre 25 y 35 veces para obtener millones de copias del ADN objetivo.

Tomado de: Méndez-Álvarez S, Pérez-Roth E. *La PCR múltiple en microbiología clínica.*

Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica [Internet]. 2004 [citado el 18 de octubre de 2025];22(3):183–92. Disponible en:

<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-pcr-multiple-microbiologia-clinica-13058027> (15).

Sin embargo, si el material de partida es ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de ARN mensajero (ARNm), entonces nos referimos a la técnica como RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa). Esta variante incluye un paso previo en el que el ARNm se convierte en ADNc mediante una reacción de transcripción inversa, catalizada por la enzima transcriptasa reversa. Los componentes necesarios en la reacción PCR incluyen el ADN molde (ya sea genómico o complementario), la enzima ADN

polimerasa una de las más comúnmente utilizada es la Taq ADN polimerasa, que se obtiene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*. Esta bacteria habita en ambientes de alta temperatura, lo que permite que su ADN polimerasa funcione correctamente en condiciones térmicas elevadas. Esta característica la diferencia de otras ADN polimerasas, ya que es capaz de conservar su actividad en temperaturas altas, razón por la cual se le denomina una enzima termoestable. Existen también otras enzimas utilizadas en PCR, como la Vent, que se extrae de la bacteria *Thermococcus litoralis*. En general, las enzimas disponibles comercialmente son muy eficientes, y cuando se presentan fallos en la reacción, suelen deberse a errores en su manejo por parte del usuario (18).

Los *primers* que son pequeñas secuencias de oligonucleótidos que flanquean a ambos lados de la región específica del ácido nucleico que se quiere amplificar y, que son complementarias a dicha secuencia objetivo. Se emplean dos secuencias distintas de *primers*, uno llamado "*forward*" o de sentido, y otro "*reverse*" o antisentido. Ambos deben estar diseñados específicamente para unirse al molde de ADN, permitiendo que la Taq polimerasa extienda a las cadenas en la dirección 5' a 3' (18).

Por otra parte, los dNTPs actúan como los bloques básicos o unidades (bases nitrogenadas) que la Taq polimerasa utiliza para sintetizar nuevas cadenas de ADN. Su concentración es crucial para la especificidad y eficacia de la reacción, ya que un nivel inadecuado puede interferir con la actividad de la taq. Así mismo los iones de magnesio Mg^{2+} actúa como un cofactor esencial para la enzima, ya que influye directamente en la especificidad de la reacción. Por ello, es fundamental ajustar su concentración correctamente, ya que un exceso o deficiencia puede comprometer el funcionamiento de la Taq polimerasa. Por último, la solución amortiguadora o buffer suele estar compuesta por Tris-HCl. Este medio ayuda a mantener condiciones estables durante la PCR y agua (18).

Todos estos elementos interactúan en tres fases clave de la PCR con la **desnaturalización** en esta fase el ADN se calienta a 95 °C durante unos segundos para separar sus cadenas. El tiempo necesario depende del contenido de G-C de la secuencia, ya que estas bases tienen uniones más fuertes. Al final de esta etapa, las hebras quedan separadas y listas para ser utilizadas como molde en la siguiente etapa: **alineamiento** o también conocida como la etapa de **hibridación** en donde los primers se unen al extremo 3' de las cadenas molde, reconociendo su secuencia complementaria. Para que esta unión sea estable y específica, la

reacción se debe llevar a la temperatura de hibridación (T_m), que suele estar entre 50 y 60 °C, debe ser la adecuada. Un buen diseño de los primers y una T_m correcta aseguran una hibridación eficiente. Y por último, en la **extensión**, la Taq polimerasa inicia la síntesis del ADN uniendo dNTPs al molde en dirección 5' a 3'. La reacción ocurre a 72 °C, temperatura óptima para la actividad de la enzima. Al finalizar, se generan los amplicones de tamaño en pares de bases (pb) que deben ser conocidos (18).

Toda esta reacción se lleva a cabo en equipos llamados termocicladores, diseñados para mantener de forma precisa y constante las condiciones de temperatura y tiempo requeridas en cada ciclo. Al finalizar el proceso, para verificar si se logró amplificar la secuencia deseada, los productos generados conocidos como amplicones, se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa. Este paso permite confirmar el éxito de la amplificación (18).

4.3.2.2. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real, a diferencia de la PCR punto final, permite detectar y cuantificar el ADN amplificado durante cada ciclo de la reacción, sin necesidad de usar geles de agarosa. Esto permite hacer procesos de cuantificación en línea (tiempo real) de donde se deriva la denominación qPCR ("quantitative PCR"), lo que genera resultados en menos pasos y resulta más práctico. Si se parte de ARN y se convierte primero en ADNc, se denomina RT-qPCR.

Existen dos enfoques principales de detección: los métodos no específicos, entre los cuales se destaca el uso de SYBR Green, un tinte que se une al surco menor del ADN de doble cadena e incrementa su fluorescencia hasta mil veces, y los métodos específicos, que incluyen el uso de las denominadas sondas TaqMan o los Molecular Beacons, que funcionan bajo el principio de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), garantizando una mayor especificidad al hibridar únicamente con la secuencia blanco. La elección del sistema de detección depende del objetivo experimental, ya que mientras SYBR Green es más económico y fácil de implementar, las sondas específicas ofrecen resultados más confiables al minimizar la generación de productos inespecíficos o dímeros de *primers*. Esta técnica es actualmente la más sensible para detectar y cuantificar ácidos nucleicos, incluso en muestras con muy baja concentración. Una de sus aplicaciones más comunes es medir pequeños cambios en la expresión génica al analizar niveles de ARNm en células o tejidos (18).

4.3.2.3 PCR multiplex

Es una versión avanzada de la PCR tradicional que permite amplificar varias secuencias específicas de ADN al mismo tiempo, todo en una sola reacción. Esto es muy útil porque permite analizar varios genes o fragmentos de ADN simultáneamente, ahorrando tiempo y recursos. Para lograrlo, se utilizan varios pares de cebadores, cada uno diseñado específicamente para una región genética diferente, pero todos se mezclan en el mismo tubo. Esto requiere una optimización cuidadosa, pues los cebadores deben tener temperaturas de hibridación similares, no deben interactuar entre sí, ni formar estructuras secundarias y deben amplificar fragmentos de diferentes tamaños para poder distinguirlos con claridad más adelante. Además, es importante ajustar bien la cantidad de magnesio, nucleótidos, enzimas y otros reactivos para que cada amplificación funcione bien. Aunque la PCR múltiple es más compleja que la PCR tradicional, su capacidad para detectar varios objetivos a la vez la hace muy valiosa (17).

4.4. Ventajas de las técnicas moleculares en detección viral

La **PCR** se utiliza para la detección de virus mediante la amplificación específica de fragmentos del material genético viral. Primero se extrae el material genético del patógeno presente en muestras clínicas, posteriormente con el uso de cebadores específicos y ciclos de temperatura definidos, se amplifica exponencialmente la secuencia objetivo, permitiendo su detección incluso en concentraciones muy bajas.

La sensibilidad y especificidad son ventajas importantes para la PCR. La sensibilidad, por un lado, facilita la detección de la presencia de un virus incluso cuando la carga viral es muy baja, lo cual resulta especialmente útil en fases tempranas de la infección. Por otro lado, la especificidad garantiza la correcta diferenciación entre diferentes tipos o cepas virales mediante el diseño específico de los cebadores, resultando de gran utilidad para el diagnóstico preciso. Otras ventajas importantes son su rapidez en la obtención de resultados. Además, se puede automatizar, lo que facilita su uso en laboratorios con un gran volumen de muestras. Sin embargo, en sus desventajas se requiere equipamiento especializado y personal capacitado, lo que puede limitar su disponibilidad en laboratorios con eso también tenemos que es una técnica susceptible a la contaminación, lo cual puede generar falsos positivos si no se siguen rigurosamente las buenas prácticas de laboratorio y por último, aunque detecta la

presencia del material genético del virus, no distingue entre virus viables e inactivos, lo que puede dificultar la interpretación clínica de los resultados en diferentes contextos (15).

4.5 Métodos de extracción

Para el diagnóstico molecular la extracción ARN es un paso fundamental para la detección confiable del material genético del virus mediante técnicas como la RT-qPCR. Existen diversos métodos para llevar a cabo esta extracción, en estos los métodos manuales y los automatizados o comerciales. Los métodos manuales, ampliamente utilizados, requieren una intervención directa del personal durante todas las etapas del proceso, utilizando elementos que demandan una manipulación cuidadosa y precisa. En contraste, los métodos comerciales automatizados han sido desarrollados para optimizar el tiempo, reducir la intervención humana y aumentar la estandarización de los resultados, siendo ideales para entornos con alta demanda de pruebas. La elección entre uno u otro depende de múltiples factores, como la disponibilidad de equipos, el costo, el personal capacitado y la necesidad en la entrega de resultados (19).

4.5.1 Métodos manuales

4.5.1.1. Salting out

El método manual empleado es *salting out* una técnica basada en la precipitación diferencial de biomoléculas, utilizando una combinación de sales inorgánicas y disolventes orgánicos. Se utilizan soluciones con detergentes (como SDS) y agentes caotrópicos (como guanidina isotiocianato) que desnaturalizan proteínas y desestabilizan membranas. Este sistema forma dos fases que son una rica en sal y otra en solvente orgánico, permitiendo la separación física de los componentes celulares. Tiene facilidad de operación y bajo costo lo que la convierte en una alternativa atractiva para la biotecnología industrial, especialmente en contextos de producción a gran escala y bajo presupuesto (19).

Se señala que esta técnica es económica y permite la recuperación de grandes fragmentos de DNA; esta característica es muy importante cuando se requiere amplificar fragmentos de alto peso molecular o generar bibliotecas de DNA genómico (20).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Universo, población, muestra

5.1.1. Universo

El universo de interés incluye la totalidad de felinos ubicados en la ciudad de Bogotá, los cuales representaron el conjunto de individuos de interés para el estudio, al ser susceptibles a la infección por el virus de leucemia felina (FeLV) y el virus de inmunodeficiencia felina (FIV).

5.1.2. Población

Estuvo conformada por los felinos que se encontraban disponibles para la toma de la muestra durante el periodo de muestreo establecido.

5.1.3. Muestra

Las muestras consistieron en hisopados orales recolectados con la colaboración de voluntarios, que se depositaron en tubos tipo eppendorf utilizando protocolos establecidos para garantizar la conservación adecuada de las muestras durante su transporte hasta su posterior procesamiento en el laboratorio.

5.2 Hipótesis, variables, indicadores

5.2.1. Hipótesis

Se planteó que la implementación de un sistema de detección molecular basado en RT-qPCR permitirá la detección molecular de los Virus de Leucemia Felina (FeLV) y Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV), superando posibles limitaciones de sensibilidad y especificidad observadas en las pruebas serológicas convencionales.

5.2.2. Variables e indicadores

Las variables analizadas corresponden a parámetros de desempeño del sistema de detección molecular, incluyendo especificidad, sensibilidad, eficiencia y control interno. La

especificidad se evaluó mediante el alineamiento *in silico* de los *primers* frente a las secuencias de referencia de FeLV y FIV, considerando adecuados aquellos con más del 95% de identidad y cobertura. La sensibilidad y eficiencia se determinaron a partir de las curvas estándar, considerando aceptables aquellas con pendientes que reflejaran una eficiencia de amplificación ajustada a comportamiento ideal. Finalmente, la validez del control interno, el gen VEGFA, se estableció mediante su amplificación en todas las muestras, lo que confirmó que las muestras fueron bien tomadas y manejadas tanto en el transporte como en las etapas previas al análisis en el laboratorio. Igualmente, demuestra la ausencia de inhibidores y el correcto funcionamiento de los reactivos en la reacción de RT-qPCR multiplex.

5.3. Técnicas y procedimientos.

Se emplearon técnicas moleculares para la detección individual o simultánea del virus de leucemia felina (FeLV) y del virus de inmunodeficiencia felina (FIV). Los hisopados orales obtenidos mediante hisopados orales fueron procesados para la extracción de ARN utilizando el método de salting out, evaluándose la pureza del ARN por espectrofotometría.

Posteriormente, se realizó una reacción de RT-qPCR One-Step multiplex en tiempo real, empleando primers y sondas validados *in silico* para garantizar la especificidad. Los resultados se interpretaron según los valores de C_q y la presencia de curvas de amplificación características de cada virus.

5.4. Identificación de cebadores adecuados

A través de revisión bibliográfica, se identificaron los cebadores y las sondas a utilizar. Se seleccionaron los diseñados por Velilla y colaboradores (2020) y publicados en “Estandarización de PCR múltiple en tiempo real para el diagnóstico de sida y leucemia en *Felis silvestris catu*” (4). Una vez seleccionados, se procedió a realizar un análisis utilizando la herramienta BLAST del NCBI (Centro Nacional de Biotecnología de la Información) para evaluar el porcentaje de especificidad de los alineamientos entre los *primers* y las secuencias de cada virus, así como del control interno. A partir de esta información, se generaron los controles positivos sintéticos.

Tabla 4. Identificación de cebadores adecuados

Target	Primer	Secuencia 5' - 3'	Gen diana	Tamaño producto	Referencia
FeLV	FeLV-F	TATTGGGCCTGTAACACTG	env	117 pb	Velilla et al. (2020)
	FeLV-R	GACTTACCATCAACCCGAA			
	FeLV-probe	TTTCCATGGCGGTGCTCAATTGGA			
FIV	FIV-F	CGGTGACTTTGTACCTGAT	genoma completo	111 pb	
	FIV-R	GTAGTCCCAGTAGAAGAATCAG			
	FIV-probe	TTCACAGACAACCAACGCTCAGGT			
<i>Felis silvestris catus</i>	VEGFA-F	GCAGAGAGAAGAAAGAGGTAGC	VEGFA	125 pb	
	VEGFA-R	AGCAGGTCACCTCACTTTG			
	VEGFA-probe	AGCTCCAGAGAGAAGTCGAGGAAGA			

5.5. PCR Uniplex

5.5.1. Evaluación PCR uniplex

Se realizó la evaluación individual para los virus FeLV y FIV, con el propósito de estandarizar las condiciones óptimas para cada sistema y también evaluar la especificidad de los controles positivos sintéticos en comparación con los *primers* empleados.

Cada reacción se estandarizó con un volumen final de 20 μ L, que incluye 2 μ L de Buffer 10X Gentaq, 1.2 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0.4 μ L de dNTPs 20 mM, 0.268 μ L de *primers Forward* y *Reverse* 20 mM, 0.4 μ L de Taq Thermo, 4 μ L de DNA y agua estéril hasta completar dicho volumen. Se utilizó el equipo T100 Thermal Cycler de Bio-Rad, las condiciones de termociclaje consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 segundos, anillamiento a 59°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos, terminando con una extensión final a 72°C

durante 10 minutos. Posteriormente, cada producto de amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, ideal para separar fragmentos pequeños.

5.6. Caracterización de rangos dinámicos

5.6.1. Evaluación qPCR uniplex

Se inició con una PCR en tiempo real (qPCR) individual para los genes de FeLV y VIF, empleando una concentración estándar de *primers* de 0.15 mM, se incluyeron controles negativos sin molde. Cada reacción se estandarizó en un volumen final de 10 μ L, compuesto por 1 μ L de Buffer 10X Gentaq, 0.6 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0.2 μ L de dNTPs 20 mM, 0.75 μ L de *primers Forward* y *Reverse* 20 mM, 0.2 μ L de Taq Thermo, 0.75 μ L de SYBR Green 0.75X, 2 μ L de DNA y agua estéril hasta completar el volumen total. Se utilizó el termociclador de tiempo real CFX96 Touch Real Time System Bio-Rad, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C durante 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 segundos, anillamiento a 59°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos, durante la cual se realizó la lectura de fluorescencia.

5.6.2. Curvas estándar

Para cada sistema de detección por qPCR, se elaboraron curvas estándar empleando los controles positivos. Se realizaron diluciones seriadas en base 10, con concentraciones entre 1×10^2 copias/ μ L hasta 1×10^6 copias/ μ L. Cada dilución se evaluó en reacciones independientes de qPCR, analizadas por duplicado, con el fin de establecer la relación lineal entre la concentración del molde y los valores de ciclo umbral (Cq) obtenidos. El número de copias de los controles positivos se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Número copias}/\mu\text{L} = \frac{\text{Concentración de ADN (ng}/\mu\text{L)} \times \text{constante avogadro (6.022} \times 10^{23})}{\text{longitud de ADN (pb)} \times \text{factor de conversión a ng (1} \times 10^9) \times \text{masa promedio de 1pb dsDNA (660)}}$$

De acuerdo con el Cq (ciclo umbral), que corresponde a el número de ciclos de amplificación necesarios para que la cantidad de ADN o ARN genere una señal fluorescente para superar un umbral preestablecido durante una qPCR, los valores obtenidos para cada dilución se

graficaron frente al logaritmo base 10 del número de copias. A partir de esta gráfica se calculó la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta estándar de cada sistema.

5.7. Toma de muestras hisopados orales

Se recolectaron un total de 18 muestras biológicas (hisopados orales) provenientes de felinos domésticos ubicados en la ciudad de Bogotá. Las tomas se realizaron con la colaboración de voluntarios, bajo consentimiento informado de sus propietarios y siguiendo los lineamientos éticos establecidos por el Comité de Ética de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

A cada participante se le entregó un kit individual de recolección, empacado en una bolsa ziploc, que contenía un tubo Eppendorf de 1.5 mL y un hisopo estéril de nylon. Para estandarizar el procedimiento, se proporcionó un video instructivo en el que se explicaba cómo realizar la toma, indicando enrollar el hisopo entre la mejilla y las encías del felino durante aproximadamente 15 segundos, aplicando presión suave desde la parte externa de la boca. Una vez tomada la muestra, el hisopo se introdujo en el tubo Eppendorf sin adición de medio conservante. Posteriormente, todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

5.8. Extracción de ARN mediante método de Salting Out

Para la extracción y recuperación del material genético de interés ARN, se manipularon las muestras en condiciones estériles y con precaución, para evitar su degradación. Se empleó un protocolo basado en el método de *salting out*, adaptados al tipo de muestra (hisopado oral), con el fin de optimizar la pureza y conservación del material genético.

5.8.1. Muestras de hisopados orales

Las muestras de hisopados orales en seco fueron recuperadas en 1000 µL de PBS 1X y sometidas a agitación en vortex durante 1 minuto para desprender las células. Posteriormente se realizó una centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos, tras la cual se retiraron 800 µL del sobrenadante. Después de esto, se llevaron a cabo tres ciclos de choque térmico, alternando incubaciones a 90°C y -20 °C por 1 minuto y 30 segundos cada uno, con el

objetivo de favorecer la ruptura celular. Para la lisis celular, se añadieron 400 μL de solución lisis (Tris HCl 10 mM pH = 8.0, SDS 0,5%, EDTA 26 mM) y 10 μL de proteinasa K, incubando a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 60 μL de NaCl 5M y 600 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), seguido de una centrifugación a 12000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante resultante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, al que se añadieron 264 μL de isopropanol y 40 μL de acetato de sodio, se incubaron a -20°C durante 30 minutos para facilitar la precipitación del ARN. Luego, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante, el pellet obtenido fue lavado con 400 μL de etanol al 70%, seguido de una centrifugación final a 12000 rpm por 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, se realizó una breve incubación a -20°C por 3 minutos, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió el ARN obtenido en 25 μL de agua estéril libre de RNAsas.

5.8.2. Evaluación de la calidad del ARN

La medición de la concentración y pureza del ARN se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV-VIS utilizando el equipo NanoDrop One de Thermo Scientific. Las relaciones 260/280 y 260/230 permitieron identificar la posible presencia de proteínas, carbohidratos y residuos de reactivos empleados durante el proceso de extracción.

5.9. RT-qPCR Multiplex

Para la detección simultánea de FIV y FeLV, se realizó una RT-qPCR multiplex de un solo paso (One-Step) utilizando el reactivo qScript XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix QuantaBio. Cada reacción se estandarizó en un volumen total de 10 μL , compuesto por 5 μL del ToughMix, 0.134 μL de cada primer Forward y Reverse 20mM para FIV y VEGFA, 0.1 μL de cada primer Forward y Reverse 20mM para FeLV, 0.2 μL de sondas específicas para cada gen, 2 μL de ARN y un volumen de agua estéril para completar la reacción. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de tiempo real CFX96 Touch Real Time System Bio-Rad, bajo las siguientes condiciones: retrotranscripción a 50°C por 10 minutos, desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto, seguido de 50 ciclos a 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto, momento en el cual se efectuó la captura de fluorescencia. Se incluyeron controles negativos con agua estéril libre de RNAsas, controles positivos sintéticos y el control interno correspondiente al gen VEGFA.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de cebadores adecuados

El análisis de especificidad *in silico* realizado mediante la herramienta de BLASTn evidenció un alineamiento altamente significativo frente a secuencias de referencia del virus de leucemia felina (FeLV) y virus de inmunodeficiencia felina (FIV). En el caso de FeLV, los oligonucleótidos mostraron alineamiento del 100% de identidad y cobertura con la cepa Gardner-Arstein (MZ964580.1), con un valor E de $3e-52$, el cual representa la probabilidad de que la coincidencia observada ocurra por azar, por lo que valores cercanos a cero indican un alineamiento altamente específico. De manera similar, para FIV se obtuvo una alta coincidencia con el genoma completo de referencia (NC_001482.1), con un 100% de identidad, 100% de cobertura y un valor E de $6e-49$ (Figura 6). Además, se observaron coincidencias adicionales con otros aislamientos y variantes virales, todas con identidades superiores al 95%, respaldando la capacidad de los *primers* para amplificar regiones conservadas de estos virus.

(A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Feline immunodeficiency virus complete genome	Feline immunod...	206	206	100%	6e-49	100.00%	9474	NC_001482.1
<input checked="" type="checkbox"/> Feline immunodeficiency virus genomic RNA for GAG protein, POL protein, ENV protein and 3 ORFs	Feline immunod...	178	178	100%	1e-40	95.50%	9485	X57002.1
<input checked="" type="checkbox"/> Feline immunodeficiency virus strain V1CSF envelope protein (env) gene complete cds	Feline immunod...	178	178	100%	1e-40	95.50%	2571	GQ428651.1

(B)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Gardner-Arstein Feline Leukemia oncovirus B envelope gene adjacent 3' long terminal repeat	Gardner-Arstein felin...	217	217	100%	3e-52	100.00%	2581	V01172.1
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus strain Gardner-Arstein complete genome	Feline leukemia virus	217	217	100%	3e-52	100.00%	8515	MZ964580.1
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus FeLV-B (GA-FeLV-B) env gene 3' flank & LTR	Feline leukemia virus	217	217	100%	3e-52	100.00%	2148	K01209.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gardner-Arstein FeLV subtype B (GA-FeLV-B) envelope gene	Gardner-Arstein felin...	217	217	100%	3e-52	100.00%	2611	X00188.1
<input checked="" type="checkbox"/> Feline sarcoma virus (GA-FeSV) deletion mutant env gene	Feline sarcoma virus	217	217	100%	3e-52	100.00%	2923	M23026.1
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus isolate BDX 301_1_A envelope protein (Env) gene partial cds	Feline leukemia virus	211	211	100%	2e-50	99.15%	1416	MT302153.1
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus isolate FeLV_US_s2512_Fca2015 complete genome	Feline leukemia virus	211	211	100%	2e-50	99.15%	8393	MF681678.1

Figura 6. Resultados del análisis *in silico* de los *primers* mediante BLASTn. **(A)** Resultado del Blastn para la secuencia de inmunodeficiencia felina (FIV). **(B)** Resultado del Blastn para la secuencia de leucemia felina (FeLV). En rojo se observa las secuencias seleccionadas.

6.2 PCR Uniplex

6.2.1. Evaluación PCR Uniplex

Se realizó la amplificación individual para FeLV y FIV bajo las condiciones mencionadas, obteniéndose productos específicos para cada virus. En ambos casos se observó una banda definida en el gel de agarosa al 3%, correspondiente al tamaño esperado del amplicón: 111pb para FeLV y 117 pb para FIV, sin evidenciar productos secundarios, lo que confirma que las condiciones de reacción fueron adecuadas para la detección individual de ambos virus. Asimismo, los controles negativos no presentaron bandas, descartando contaminación en las reacciones.

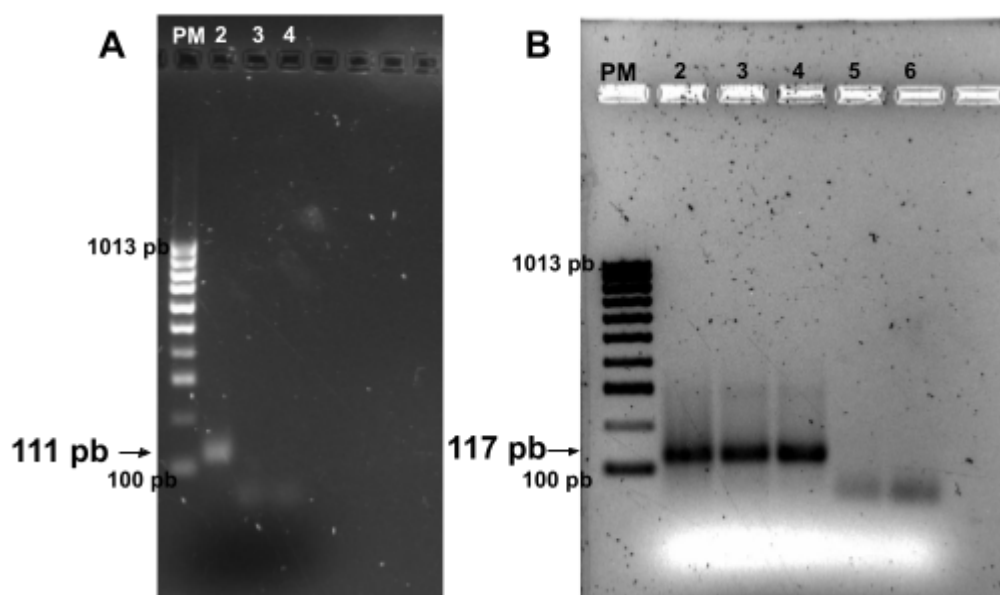


Figura 7. Productos de amplificación obtenidos mediante PCR Uniplex para FeLV y FIV. (A) Amplificación del virus de leucemia felina. Pozo 1, marcador de peso molecular HyperLadder 100pb (Bioline); pozo 2, control positivo sintético FeLV; pozo 3 y 4, controles negativos. (B) Amplificación del virus de inmunodeficiencia felina. Pozo 1, marcador de peso molecular HyperLadder 100pb (Bioline); pozo 2,3 y 4 control positivo sintético FIV; pozo 5 y 6, controles negativos.

6.3. Caracterización de rangos dinámicos qPCR

Se construyeron curvas estándar independientes para los sistemas de detección de FeLV y FIV empleando diluciones seriadas del control positivo sintético, comprendidas entre 100 copias/ μ L y 1.0×10^6 copias/ μ L, se trabajó cada dilución por duplicado. La concentración inicial del producto de amplificación se determinó por colorimetría utilizando el equipo Qubit, obteniéndose para FeLV un valor de 6.99 ng/ μ L (equivalente a $5,83 \times 10^{10}$ copias/ μ L) y

para FIV un valor de 15.4 ng/ μ L ($1,22 \times 10^{10}$ copias/ μ L). Con base en estas concentraciones iniciales se prepararon las diluciones de trabajo, las cuales permitieron evaluar la linealidad del sistema y determinar los límites de detección (LOD) y cuantificación para cada virus.

La elaboración de las curvas estándar permite caracterizar el desempeño de ambos sistemas. En la Tabla 5. se resume la información obtenida.

Tabla 5. Caracterización de los rangos dinámicos de los sistemas de detección diseñados

Virus	Rango Valor Cq	Promedio Valor Cq	Rango estimado de copias
FeLV	33.56 - 38.26	36.42	1×10^2 copias/ μ L - 1×10^6 copias/ μ L
FIV	23.5 - 31.32	28.24	1×10^2 copias/ μ L - 1×10^6 copias/ μ L

En ambos casos, se observó una disminución progresiva de los valores de Cq conforme aumentó la concentración del molde, lo que evidencia una relación inversamente proporcional entre la cantidad de copias del molde y el ciclo de detección, característica de un comportamiento cinético adecuado.

La caracterización de los sistemas de detección evidenció que tanto el ensayo para FIV como el de FeLV fueron capaces de detectar hasta 1×10^2 copias/ μ L, lo que establece un límite de detección (LOD) equivalente para ambos virus. No obstante, se observaron diferencias en la cinética de amplificación, ya que el sistema de FIV presentó valores de Cq cercanos a 31 ciclos en dicha concentración, mientras que FeLV mostró amplificaciones más tardías (Cq 38 ciclos). Esto sugiere que, aunque comparten el mismo límite de detección, el sistema para FIV cuenta con mayor sensibilidad frente a cargas bajas, mientras que FeLV requiere un mayor número de ciclos para generar señal. Aun así, ambos sistemas resultan adecuados para la detección en etapas tempranas de la infección.

Tabla 6. Límites de detección (LOD) qPCR para FeLV y FIV

Virus	Límite de Detección (LOD)
FeLV	1x10 ² copias/μL
FIV	1x10 ² copias/μL

Las figuras 8 y 9 muestran la caracterización de los rangos dinámicos para FeLV y FIV. En ellas se observa la curva de calibración que se realizó a partir de puntos de dilución específicos, así como la consistencia de la temperatura melting y los valores de Cq de los duplicados de cada dilución, lo cual respalda la reproducibilidad del sistema. Las réplicas presentaron una variabilidad mínima entre sí en todo el rango de las diluciones evaluadas, lo que confirma la estabilidad del ensayo en el rango evaluado.

Figura 8. Caracterización Rangos dinámicos qPCR detección FIV

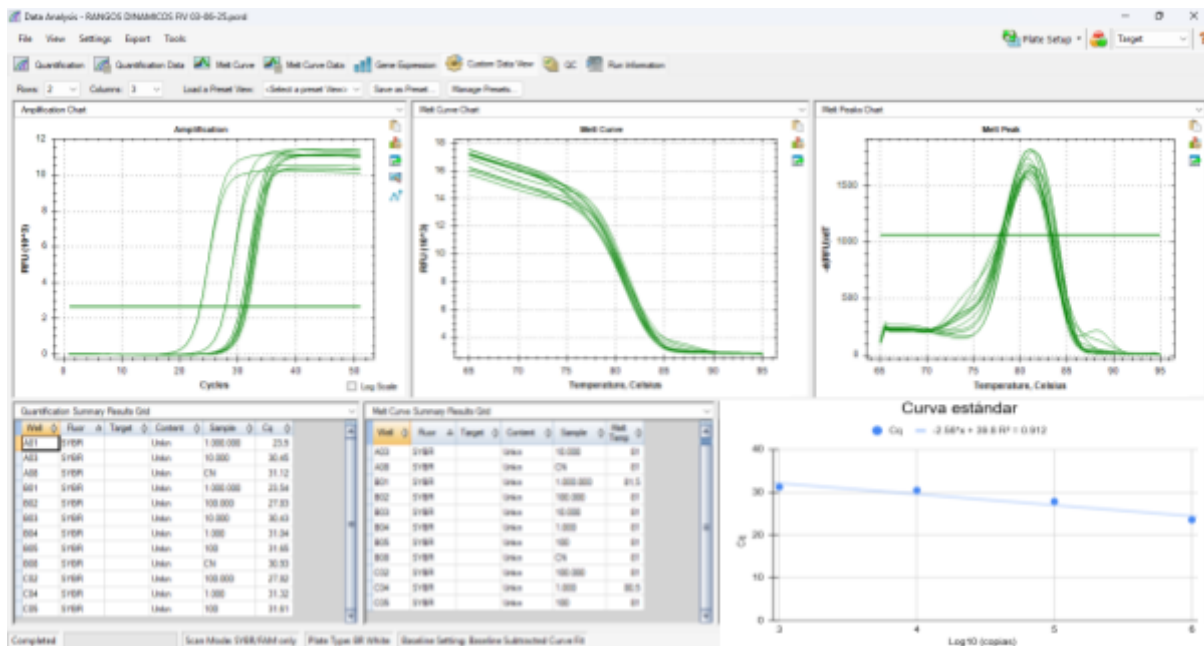
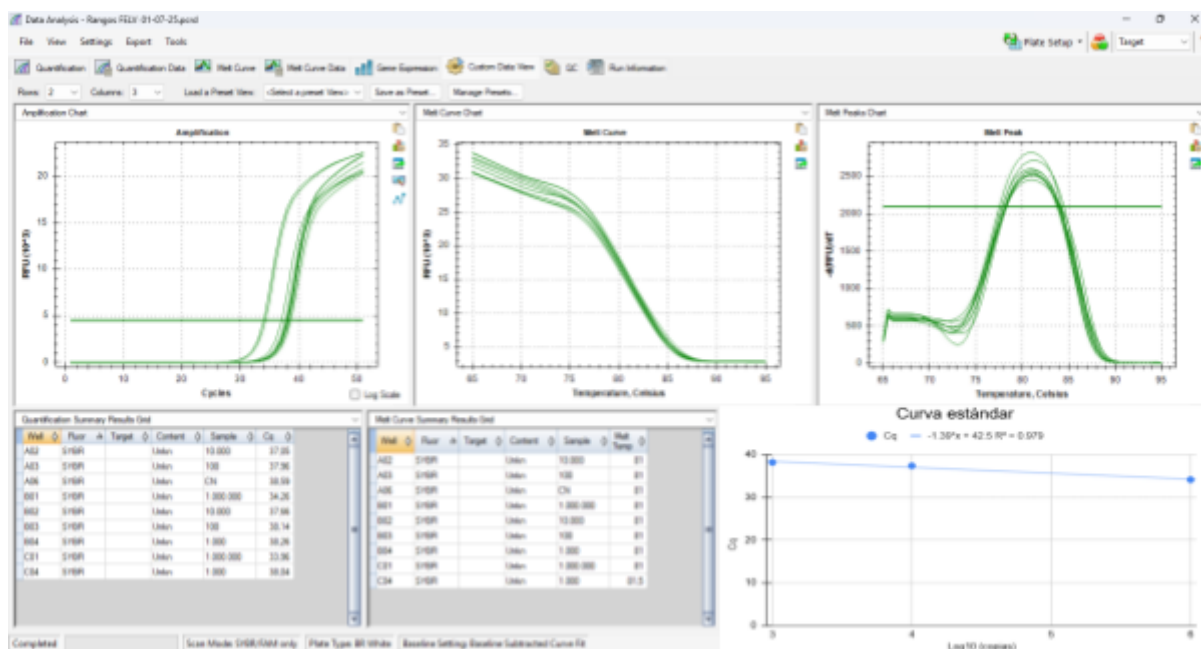


Figura 9. Caracterización Rangos dinámicos qPCR detección FeLV



Las curvas estándar mostraron una buena linealidad, con valores de R^2 de 0,974 para FeLV y 0,912 para FIV. Esto indica que ambos sistemas responden proporcionalmente al número de copias en el rango evaluado. Es importante resaltar que la construcción de la curva estándar se realizó con cuatro puntos de dilución para FIV y tres para FeLV, correspondientes a los valores más cercanos al umbral de cuantificación. Al superar esas concentraciones se observó una mayor dispersión en los C_q , lo que limitó la inclusión de más puntos en la curva. Sin embargo, la pendiente más pronunciada observada en FIV evidencia una mayor variación del C_q ante los cambios en la concentración, lo que puede interpretarse como mayor sensibilidad, mientras que FeLV muestra un comportamiento más estable entre réplicas, reflejando mayor reproducibilidad.

6.4 Evaluación de ácidos nucleicos

La aplicación del protocolo de extracción basado en *salting out* permitió la recuperación de material genético total de las 18 muestras en estudio, se extrajo ADN y ARN al mismo tiempo, las muestras no se trataron con DNAsas. Las concentraciones determinadas como ARN presentaron un rango entre 2.47 ng/ μ L y 49.17 ng/ μ L, evidenciando la variabilidad inherente a este tipo de muestra biológica utilizada. En cuanto a la pureza, en promedio se obtuvo una relación 260/280 de 1.57 con una desviación estándar de 0.24, mientras que la relación 260/230 obtuvo un promedio de 0.52 y una desviación estándar de 0.23, lo cual

sugiere la presencia de contaminantes como sales o remanentes de reactivos propios del método de precipitación empleado. La concentración y calidad de las muestras se pueden observar en el Anexo 2. A pesar de ello, las concentraciones obtenidas fueron suficientes para la síntesis de ADNc y la posterior amplificación mediante RT-qPCR, lo que confirma la utilidad del protocolo aplicado para fines de detección molecular.

6.5 RT-PCR One step Multiplex

La amplificación del gen endógeno *VEGFA*, empleado como control interno, se observó en la totalidad de las muestras procesadas, con valores de Cq que oscilaron entre 27.92 y 35.62, lo que confirmó la presencia de ARN íntegro y la ausencia de inhibidores en las reacciones.

De las 18 muestras analizadas, se detectó una muestra positiva para FeLV, con un valor de Cq de 31.84. No se registró amplificación específica para FIV en ninguna de las muestras, por lo que las 17 muestras restantes fueron negativas para ambos virus. Los controles positivos amplificaron adecuadamente, validando el correcto desempeño del sistema. Por su parte, los controles negativos registraron señales tardías con Cq elevados, compatibles con amplificaciones inespecíficas atribuibles a la formación de dímeros de *primers*, sin evidenciarse presencia de material genético viral.

Las diferencias en los valores de Cq entre los sistemas de detección de FeLV y FIV se relacionan con la variación natural en la cantidad de ARN viral presente en las muestras. Los resultados confirmaron la correcta estandarización del ensayo multiplex, permitiendo la detección simultánea de los virus en solo un sistema de reacción. En el Anexo 3 se presentan las gráficas de amplificación correspondientes al ensayo multiplex, donde se evidencian los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

7. DISCUSIÓN

Este estudio se enfocó en la implementación y optimización de un sistema de detección molecular basado en PCR para identificar los virus de la leucemia felina (FeLV) y de la inmunodeficiencia felina (FIV), utilizando muestras de hisopados orales de gatos. La importancia de este enfoque radica en las limitaciones que presentan las pruebas serológicas tradicionales, especialmente en la detección temprana de estas infecciones, cuando la carga

viral aún es baja y la respuesta inmune no es lo suficientemente evidente para ser reconocida por métodos convencionales. En este contexto, la PCR, y de manera particular la RT-qPCR multiplex, se posiciona como una herramienta de gran valor al proporcionar una detección más sensible y específica del material genético viral, lo que permite superar parte de las barreras diagnósticas actuales.

La comparación con estudios previos resalta la relevancia del presente trabajo. Investigaciones anteriores han evidenciado discrepancias entre resultados serológicos y moleculares, lo que se asocia con la fase de la infección y la baja carga viral en estadios tempranos. En este sentido, los hallazgos de este proyecto confirman que la RT-qPCR multiplex ofrece ventajas claras facilitando la detección temprana y múltiple en una sola muestra en las que la serología puede resultar negativa. Por ejemplo, Balboni y colaboradores. (2024) reportan una alta sensibilidad del PCR para FIV, capaz de detectar ADN proviral en el 92% de gatos infectados, superando pruebas serológicas en etapas tempranas o infecciones latentes (21).

En primer lugar el análisis in silico mediante BLASTn se confirma que los cebadores seleccionados presentan una alta especificidad, la coincidencia del 100% de identidad respalda que los primers empleados son adecuados para amplificar específicamente las regiones objetivo de estos virus, minimizando los riesgos de que se presenten amplificaciones inespecífica y la posibilidad de falsos positivos, apoyando la precisión diagnóstica reportada en investigaciones similares (4).

Los ensayos de PCR uniplex evidenciaron una amplificación específica y adecuada para ambos virus, lo cual se confirmó con la visualización de productos del tamaño esperado en geles de agarosa al 3%. La ausencia de señal en los controles negativos respaldan la calidad de las condiciones experimentales y la precisión de los cebadores utilizados para cada agente viral.

El análisis de los rangos dinámicos en la qPCR mostró que a medida que disminuye la concentración del molde, los valores de C_q aumentan, con lo que podemos entender que la cinética de amplificación fue la adecuada en ambos virus. Se puede observar como en el caso del FIV, el sistema evidenció una eficiencia ligeramente mayor, reflejada en valores de C_q más bajos en las concentraciones bajas si se compara con FeLV. Esto podría asociarse a

diferencias en las cinéticas de amplificación que implica dinámica de amplificación más favorable para este virus. Aun así, ambos sistemas alcanzaron límites de detección similares ($1,0 \times 10^2$ copias/ μL), lo que resulta apropiado para una detección sensible, esto es comparable con otros estudios que ubican el LOD en valores similares, garantizando la detección de infecciones con baja carga viral, crucial para la identificación precoz que permite el manejo clínico oportuno (22).

La metodología empleada para la extracción de ARN, basada en *salting out*, permitió recuperar ARN suficiente para el análisis, aunque se observaron valores de pureza subóptimos (relaciones 260/230 bajas), indicando la posible presencia de contaminantes. Aun así, la integridad del ARN fue adecuada para la síntesis de ADNc y la amplificación, lo cual demuestra la viabilidad del protocolo. Se ha validado en estudios previos como una técnica eficaz y no tóxica para obtener ADN de buena calidad, siendo una alternativa viable frente a métodos fenol-cloroformo más complejos y costosos (23).

El hecho de que las muestras hayan sido recolectadas por diferentes voluntarios introduce una variabilidad en la técnica de toma lo que puede haber contribuido a la dispersión observada en los resultados de cuantificación del ARN. Esta observación coincide con lo informado por Westman junto con sus colaboradores (2019), quienes al utilizar hisopados orales en gatos para la detección de *FeLV* mediante PCR, identifican diferencias significativas en la sensibilidad del ensayo entre operadores. Los autores atribuyeron esta variabilidad a la heterogeneidad en la presión ejercida con el hisopo, la profundidad de muestreo y la duración del procedimiento, factores que determinan la cantidad de material biológico recolectado y, por ende, la cantidad de ARN viral disponible para la amplificación (24).

La posibilidad de realizar la detección de FeLV y FIV en muestras no sanguíneas como hisopados orales nos da una mejora significativa en el bienestar animal, ya que ofrece alternativas menos invasivas, en algunos estudios han validado que los hisopados orales contiene suficiente carga viral para efectos diagnósticos, facilitando el muestreo (25).

Los resultados obtenidos en la fase de RT-PCR One Step Multiplex confirman la adecuada estandarización del sistema molecular diseñado para la detección simultánea de FeLV y FIV. La amplificación del gen *VEGFA* en la totalidad de las muestras analizadas valida la integridad del ARN y la ausencia de inhibidores, demostrando la confiabilidad del proceso de

extracción. Este gen constitutivo es ampliamente utilizado en PCR diagnóstico veterinarios, debido a que permite verificar la calidad del material genético y evitar falsos negativos por fallos experimentales, tal como lo describen Velilla et al. (2020) en estudios similares de validación multiplex (4).

La detección específica de FeLV en una única muestra y la ausencia de amplificación positiva para FIV evidencian la sensibilidad del ensayo, estos resultados deben interpretarse en el contexto de la biología de los retrovirus felinos: mientras el FeLV puede encontrarse en diversas formas de infección (abortiva, regresiva o progresiva), el FIV presenta replicación persistente pero con cargas virales que varían según la etapa clínica, lo cual puede explicar los Cq más tardíos y las negativas observadas (26). La implementación de técnicas moleculares en clínicas veterinarias presenta limitaciones relevantes, principalmente por el alto costo de los equipos de PCR en tiempo real y la infraestructura requerida. En este contexto, el sistema RT-qPCR multiplex planteado en este estudio ofrece una alternativa más accesible, al permitir la detección simultánea de FeLV y FIV en una única reacción, disminuyendo el consumo de reactivos, acorta los tiempos de procesamiento y evita la necesidad de realizar múltiples ensayos por muestra, representando un ahorro significativo para laboratorios y veterinarias que cuentan con acceso al equipamiento básico de PCR. Por tanto, este enfoque puede favorecer una implementación progresiva y costo-efectiva de las técnicas moleculares en el contexto nacional.

Las señales tardías y Cq elevados en los controles negativos indican amplificaciones inespecíficas compatibles con la formación de dímeros de primers, fenómeno común en PCR de alta sensibilidad y que no compromete la validez de los resultados mientras se mantiene la ausencia de fluorescencia significativa en las fases iniciales de la reacción. Estos hallazgos pueden optimizarse ajustando concentraciones de magnesio o temperaturas de hibridación en etapas posteriores de refinamiento del método.

A pesar de los resultados obtenidos, el estudio presenta limitaciones a considerar. En primer lugar, el tamaño de la muestra fue reducido limitando la capacidad para estimar la prevalencia de FeLV y FIV en la población evaluada. De igual manera, la variabilidad en la toma de muestras, realizadas sin supervisión directa y por diferentes propietarios, género diferencias en la cantidad de material biológico recolectado, lo que probablemente contribuyó a la dispersión observada en las concentraciones de ARN. Adicionalmente, la extracción se llevó

a cabo mediante un método de *salting out* modificado, sin comparación con kits comerciales para ARN, lo cual pudo afectar la pureza del material genético obtenido.

8. CONCLUSIONES

Los cebadores y sondas seleccionados mostraron alta especificidad *in silico*, con alineamientos del 100% frente a las secuencias de referencia de FeLV y FIV, siendo adecuados para la detección específica de ambos virus y minimizó la posibilidad de amplificaciones inespecíficas o falsos positivos.

La implementación de un sistema molecular basado en RT-qPCR multiplex acopladas para la detección de FeLV y FIV a partir de muestras de hisopados orales permitió obtener una sensibilidad apropiada para el diagnóstico precoz de estas infecciones en gatos. Los límites de detección alcanzados fueron comparables con los descritos en investigaciones recientes, lo que respalda la confiabilidad del sistema propuesto.

La caracterización de los rangos dinámicos y los valores de Cq obtenidos confirmó la eficacia y reproducibilidad del sistema multiplex, permitiendo la detección de cargas virales bajas tanto para FeLV como para FIV, aspecto fundamental en etapas subclínicas o regresivas donde los métodos serológicos presentan limitaciones.

El método de extracción basado en *salting out* demuestra ser una alternativa económica y eficiente frente a métodos comerciales, posibilitando la obtención de ácidos nucleicos en cantidades y calidad suficientes para las etapas posteriores de RT-qPCR. Aunque la integridad se presentó subóptima, permitió una amplificación adecuada del ARN. Se evidenció variabilidad atribuida a la toma de muestras realizadas por diferentes voluntarios, fenómeno reportado en investigaciones anteriores, que resalta la necesidad de estandarizar técnicas de muestreo para minimizar fuentes no biológicas de variabilidad.

9. RECOMENDACIONES

Aunque la toma de muestras por parte de los propietarios resultó funcional, en futuras aplicaciones sería recomendable que el procedimiento sea supervisado o ejecutado por personal capacitado. Una estandarización más rigurosa del hisopado podría favorecer la

recuperación de mayores cantidades de ARN y reducir la variabilidad entre muestras. Asimismo, sería pertinente comparar el desempeño diagnóstico de hisopados orales con otros tipos de muestra, como sangre total, suero u otros fluidos biológicos, para identificar posibles diferencias en la carga viral y aumentar la sensibilidad del sistema.

También se sugiere ampliar la validación del sistema PCR multiplex en una mayor cantidad y diversidad de muestras felinas, con el propósito de fortalecer su aplicabilidad en contextos clínicos. De igual forma, la optimización de las condiciones de amplificación incluyendo ajustes en temperaturas, concentración de reactivos y parámetros del termociclador, permitirá minimizar amplificaciones inespecíficas y mejorar el desempeño del sistema. Adicionalmente, se recomienda evaluar en futuras investigaciones la eficacia de la extracción de ARN mediante kits comerciales, lo que permitiría comparar la eficiencia del método empleado con alternativas estandarizadas de uso común en laboratorios.

Finalmente, se destaca la pertinencia del uso de muestras no invasivas como hisopados orales, que facilitan la toma y disminuyen el estrés del animal. Se recomienda promover la transferencia de esta herramienta molecular hacia laboratorios y clínicas veterinarias, favoreciendo su incorporación en el diagnóstico rutinario y contribuyendo al fortalecimiento de la medicina veterinaria.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Collazos Paz MA. *Coinfección y hallazgos epidemiológicos de los virus de inmunodeficiencia felina (vif) y leucemia felina (vilef) en gatos clínicamente enfermos [Internet]. Bibliotecas Pontificia Universidad Javeriana. Editorial Pontificia Universidad Javeriana; 2022 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/20624>*
2. Juan Felipe Calle-Restrepo, Laura Fernández González, Laura Marcela Morales-Zapata, Julián Ruiz-Sáenz. *Virus de la leucemia felina: un patógeno actual que requiere atención en Colombia [Internet]. Edu.co. 2013 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v7n2a09.pdf>*
3. Laura Alexandra Mejía Guzmán Lizeth Daniela Núñez Bocanegra. *PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA (VIF) [Internet]. Edu.co. [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en:*

<https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/6e43f05c-cc64-433d-9364-993cd64ea16f/content>

4. Velilla C, Martínez J, Soledad González M. Estandarización de PCR múltiple en tiempo real para el diagnóstico de sida y leucemia en *Felis silvestris catus*. *CES Med Vet Zootec* [Internet]. 2020;15(1):31–43 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.15.1.3>
5. Espinoza ZGH. Detección molecular de *Malassezia spp.* y *Cryptococcus spp.* en piel de felinos con Virus de inmunodeficiencia Felino y/o Virus de Leucemia Felino [Internet]. *Uanl.mx*. diciembre 2022 [citado el 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/25578/1/1080328900.pdf>
6. Victor RM, Bicalho JM, Andrade MB, Bueno BL, de Abreu LRA, Bicalho AP da CV, et al. La detección molecular del vcmia felina en las mucosas oral, conjuntival y rectal proporciona reirus de la leusultados comparables a la detección en sangre. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020;58(2).[citado el 4 de noviembre de 2024] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01233-19>
7. Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma [Internet]. *Can J Vet Res*. 1993 [citado 12 de mayo de 2025];57(4):269–276. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1263639/pdf/>
8. da Vida ÁDOCC. UNIVERSIDAD DE CAXIAS DEL SUL [Internet]. *Ucs.br*. 2021 [citado el 18 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/11048/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20Jessica%20Martins%20Tadeu.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
9. Little S, Levy J, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Hosie M, Olah G, et al. Guías de la AAFP para las pruebas y el manejo de retrovirus felinos de 2020. *J Feline Med Surg* [Internet]. 2020;22(1):5–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X19895940>
10. Sykes JE, Hartmann K. Feline Leukemia Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases* [Internet]. [citado 12 de mayo de 2025] 2014;224–38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7152252/>
11. Manuel Emilio Bolio-González, Hugo Ramírez-Álvarez, Carlos Josué Cen-Cen. Aspectos epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico del ViLeF y VIF: una revisión actualizada [Internet]. *Redalyc.org*. 2019 [citado el 18 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/5600/560059566005/html/>
12. Bęczkowski PM, Beatty JA. Feline immunodeficiency virus: Current knowledge and future directions. *Adv Small Anim Care* [Internet]. 2022 [citado 12 de mayo de 2025];3:145–59. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.yasa.2022.05.007>

13. Hosie MJ, Addie DD, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, et al. Feline immunodeficiency: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* [Internet]. 2009 [citado 15 de mayo de 2025];11(7):575–84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19481037/>
14. Wang X, Li Y, Wang Z, Zhang J, Li J. RNA interference inhibits hepatitis B virus replication in mice. *J Virol* [Internet]. [citado 15 de mayo de 2025] 2007 Nov;81(21):11354-60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18040840/>
15. Méndez-Álvarez S, Pérez-Roth E. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* [Internet]. 2004 [citado el 18 de octubre de 2025];22(3):183–92. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-pcr-multiple-microbiologia-clinica-13058027>
16. Dwivedi S, Purohit P, Misra R, Pareek P, Goel A, Khattri S, et al. Diseases and molecular diagnostics: A step closer to precision medicine. *Indian J Clin Biochem* [Internet]. 2017;32(4):374–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12291-017-0688-8>
17. Santos CdC, Valente KF. Detecção do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos (*Felis catus*) pela técnica de reação em cadeia mediada pela polimerase [Internet]. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia; 2019 [citado el 15 de mayo de 2025]. 27 p. Disponible en: http://veterinaria.ufra.edu.br/images/tcc-defendidos/TCC_Camila_de_Cssia_dos_Santos.pdf?utm_source
18. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real [Internet]. *Investigación en Discapacidad*. 2013 [citado el 15 de mayo de 2025];2(2):70–8. Disponible en: <https://inmunojmvucv.wordpress.com/wp-content/uploads/2018/01/pcr-fundamentos-invest-dis-cap-2013.pdf>
19. Ríos Sánchez E, Calleros E, González Zamora A, Rubio J, Martínez OC, Martínez A, et al. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de ADN y su eficiencia de genotipado en población mexicana. *Acta Univ* [Internet]. 2016;26(4):56–65. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/au/v26n4/2007-9621-au-26-04-00056.pdf>
20. Chen D, Dong YS, Bao YM, Xiu ZL. Salting-out extraction of recombinant κ -carrageenase and phage T7 released from *Escherichia coli* cells. *Engineering in Life Sciences* [Internet]. [citado 16 de mayo de 2025] 2023;23(5):504-518. Disponible en: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/elsc.202200125>
21. Andrea Balboni, Verónica Fácil, Laura Gallina, María Chiara Sabetti, Francesco Dondi y Mara Battilani. Detección molecular y caracterización genética del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) en gatos seropositivos del norte de Italia [Internet].

- Mdpi.com. 2024 [citado el 18 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/13/6/463>
22. Westman ME, Malik R, Hall E, Sheehy PA, Norris JM. Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2015;42:43–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.07.004>
 23. Alireza Javadi, Masoud Shamaei Leila Mohammadi Ziazi, Mihan Pourabdollah, Atosa Dorudinia, Seyed Mohammad Seyedmehdi, Shirin Karimi. Estudio de calificación de dos métodos de extracción de ADN genómico en diferentes muestras clínicas [Internet]. Publicado. 2014 [citado el 18 de octubre de 2025]. Disponible en: https://pmc-ncbi-nlm-nih-gov.translate.goog/articles/PMC4386014/?x_tr_sl=en&x_tr_tl=es&x_tr hl=es&x_tr_pto=tc
 24. Westman ME, Malik R, Hall E, Sheehy PA, Norris JM. Comparación de tres kits de prueba de antígenos en el punto de atención del virus de la leucemia felina (FeLV) con sangre y saliva. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017;50:88–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.014>
 25. Westman ME, Malik R, Hall E, Norris JM. Diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) en gatos vacunados y no vacunados mediante saliva. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;46:66–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.03.006>
 26. Guillen-Gonzalez F, Castillo-Hidalgo E. PREVALENCIA DE LEUCEMIA VIRAL FELINA EN GATOS DOMÉSTICOS LOCALIZADOS EN SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS, ECUADOR. *Revista ESPAMCIENCIA* [Internet]. 2023 [citado el 18 de octubre de 2025];14(1):8–14. Disponible en: <https://portal.amelica.org/amei/journal/527/5274499002/html/>

11. ANEXOS

Anexo 1. Análisis BLAST selección de primers adecuados respecto de secuencias diana

FIV: Primers y control positivo

PRIMER FORWARD **CGGTGACTTTGTACCTGAT**

PRIMER REVERSE **GTAGTCCCAGTAGAAGAATCAG**

Reverso complementario **CTGATTCTTCTACTGGGACTAC**

Feline immunodeficiency virus complete genome

GenBank: NC_001482.1

AGGACTAGAAGAAGCTGAAGAGTTATTAGATTTTGATATAGCAACACAAATGAGTGAAGAAGGACCACTA
AATCCAGGAGTAAACCCATTTAGGGTACCTGGAATAACAGAAAAAGAAAAGCAAACTACTGTAACATAT
TACAACCTAAGTTACAAGATCTAAGGAACGAAATTCAGAGGTAAAAGTGAAGAAGGAAATGCAGGTAA
GTTTAGAAGAGCAAGATTTTTAAGGTATTCTGATGAAAGTGATTGTCCCTGGTTCATGCGTTCATAGGA
TATTGTATATATTTAGGTAATCGAAATAAGTTAGGATCTTTAAGACATGACATTGATATAGAAGCACCCC
AAGAAGAGTGTTATAATAATAGAGAGAAGGGTACAACGACAATATAAAATATGGTAGACGATGTTGCCT
AGGAA**CGGTGACTTTGTACCTGAT**TTTATTTATAGGAATAATAATATATTCACAGACAACCAACGCTCAG
GTAGTATGGAGACTTCCACCATTAGTAGTCCCAGTAGAAGAATCAGAAATAATTTTTGGGATTGTTGGG
CACCAGAAGAACCCGCCTGTCAGGACTTCTTGGGGCAATGATACATCTAAAAGCTAAGACAAATATAAG
TATACGAGAGGGACCTACCTTGGGGAAATGGGCTAGAGAAATATGGGCAACATTATTCAAAAAGGCTACT
AGACAATGTAGAAGAGGCAGAATATGGAAAAGATGGAATGAGACTATAACAGGACCATCAGGATGTGCTA
ATAACACATGTTATAATGTTTCAGTAATAGTACCTGATTATCAGTGTTATTTAGATAGAGTAGATACTTG
GTTACAAGGGAAAATAAATATATCATTATGTCTAACAGGAGGAAAAATGTTGTACAATAAAGTTACAAAA
CAATTAAGCTATTGTACAGACCCATTACAAATCCCCTGATCAATTATACATTTGGACCTAATCAACAT

CONTROL POSITIVO FIV

Tamaño del fragmento: 111 pb

CGGTGACTTTGTACCTGATTTTATTTATAGGAATAATAATATATTCACAGACAACCAACGCTCAG
GTAGTATGGAGACTTCCACCATTAGTAGTCCCAGTAGAAGAATCAG

Figura 10. Análisis informático BLAST virus de inmunodeficiencia felina (FIV)

FeLV: Primers y control positivo

PRIMER FORWARD **TATTGGGCCTGTAACACTG**

PRIMER REVERSE **GACTTACCATCAACCCGAA**

Reverso complementario **TTCGGGTTGATGGTAAGTC**

Cepa del virus de la leucemia felina Gardner-Arstein, genoma completo

GenBank : MZ964580 . 1

TTGCCCTCTAAGTACCCCTGTCAACCCCGCAAGTCCCAAACGGATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAA
TTTAGTACAAGGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAGAATAAAGACTGTTGGCTCTGC
CTGGTTTCTCGACCACCCCTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACACTACAGCAACCAAAACAAACCC
CCCCATCCTGCCTATCTATTCCGCAACACAACTAACCATATCTGAAGTATCAGGGCAAGGACTGTGCAT
AGGGACTGTTCCCTAAGACCCACAGGCTTTGTGCAATGAGACACAACAGGGACATACAGGGGCGCACTAT
CTAGCCGCCCCCAATGGCACC**TATTGGGCCTGTAACACTG**GACTCACCCCATGTATTTCCATGGCGGTGC
TCAATTGGACCTCTGATTTTTGTGTCTTAATCGAATTATGGCCAGAGT**GACTTACCATCAACCCGAA**TA
TGTGTACACACATTTGCCAAAGCTGCCAGGTTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACTGTTGCCCTCATG
TTGGGAGGACTCACTGTAGGGGGCATAGCCGCGGGGGTCCGAACAGGGACTAAAGCCTCATTGAAACAG
CCCAGTTCAGACAACACTACAAATGGCCATGCACACAGACATCCAGGCCCTAGAAGAGTCAATTAGTGCCTT
AGAAAAGTCCCTGACCTCCCTTTCTGAAGTAGTCTTACAAAACAGACGGGGCCTGGATATTCTATTCTTA
CAAGAGGGGAGGGCTCTGTGCCGCATTAAAAGAAGAATGTTGCTTCTATGCGGATCACACCGGACTTGTC
GAGACAATATGGCTAAATTAAGAGAAAAGACTAAAACAGCGGCAACAACACTGTTTGACTCCCAACAGGGATG

CONTROL POSITIVO FeLV

Tamaño del fragmento: 117 pb

TATTGGGCCTGTAACACTGGACTCACCCCATGTATTTCCATGGCGGTGCTCAATTGGACCTCTGATTTTTGTGTCTTA
ATCGAATTATGGCCAGAGT**GACTTACCATCAACCCGAA**

Figura 11. Análisis informático BLAST virus de leucemia felina (FeLV)

Anexo 2. Cuantificación y evaluación del ARN de las 18 muestras de hisopados orales felina

Tabla 7. Resultados de cuantificación y pureza del ARN extraído de las 18 muestras

Nº Muestra	ng/μL	A260/280	A260/230
1	7.27	1.77	0.40
2	9.7	1.61	0.53
3	14.97	1.84	0.59
4	3.83	1.80	0.25
5	26.5	1.74	0.71

6	16.43	1.49	0.34
7	3.37	1.46	0.24
8	49.17	1.66	0.60
9	16.3	1.89	0.65
10	13.73	1.63	1.05
11	18.10	1.64	0.65
12	3.37	1.19	0.35
13	8.6	1.64	0.64
14	5.7	1.41	0.53
15	7.03	1.43	0.26
16	33.23	1.68	0.90
17	2.47	0.94	0.18
18	34.23	1.48	0.50

Anexo 3. Resultados de amplificación de RT-PCR Multiplex

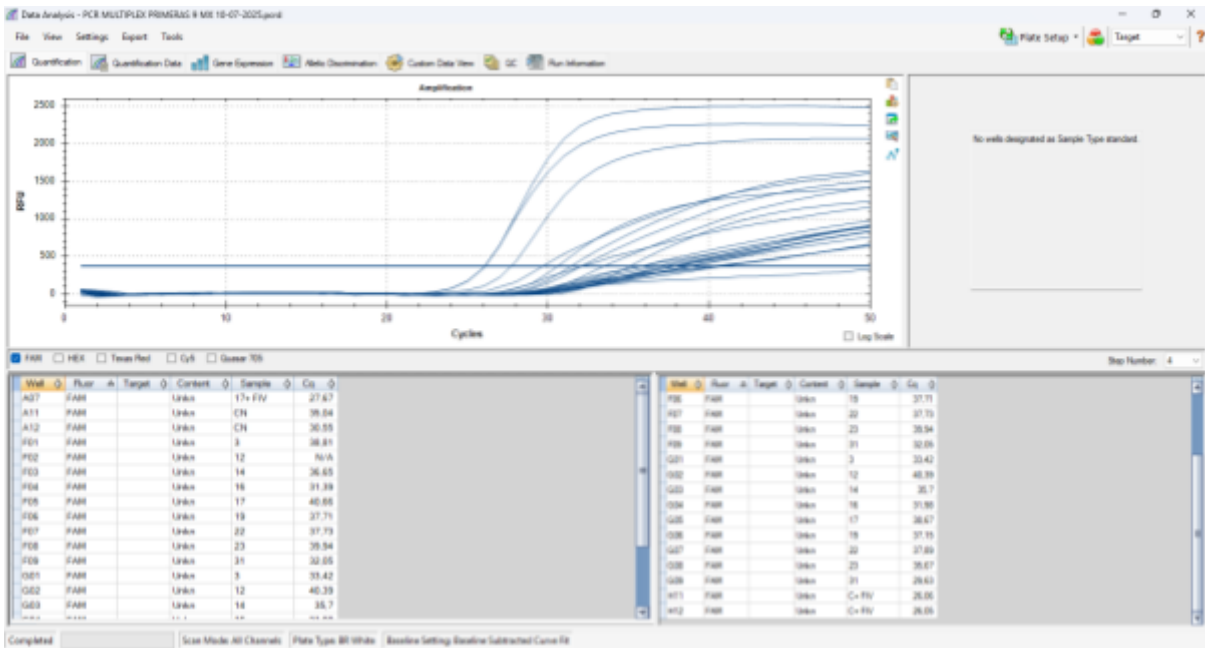


Figura 12. Curvas de amplificación del virus de inmunodeficiencia felina (FIV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 1-9

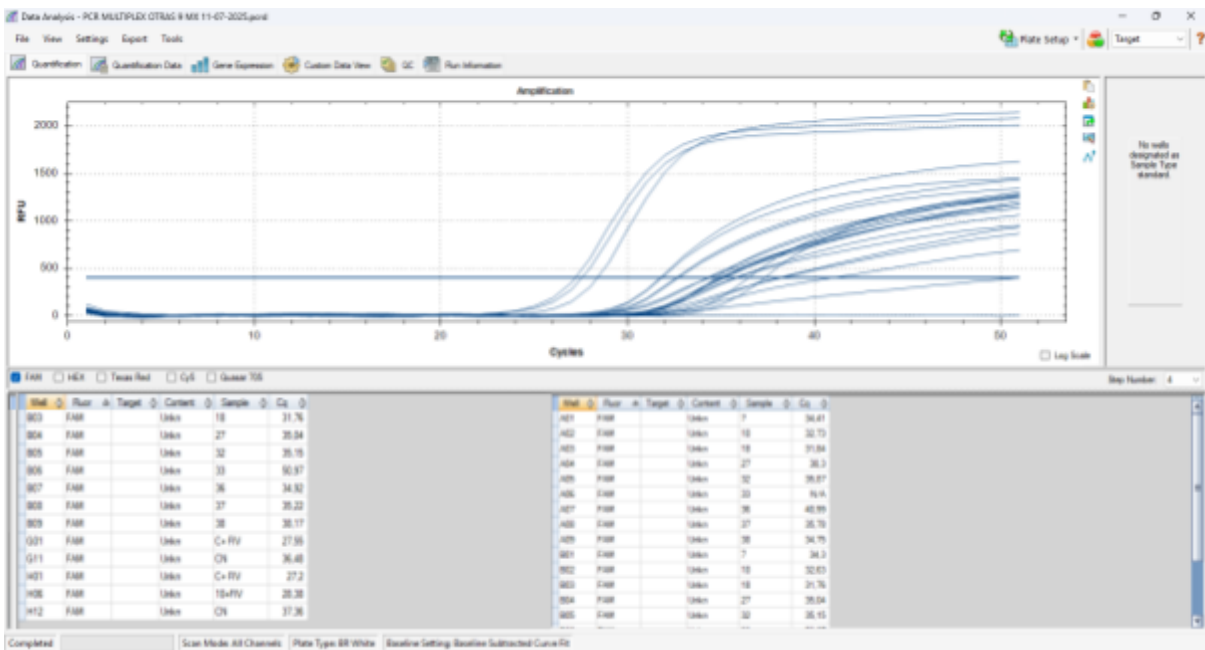


Figura 13. Curvas de amplificación del virus de inmunodeficiencia felina (FIV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 10-18

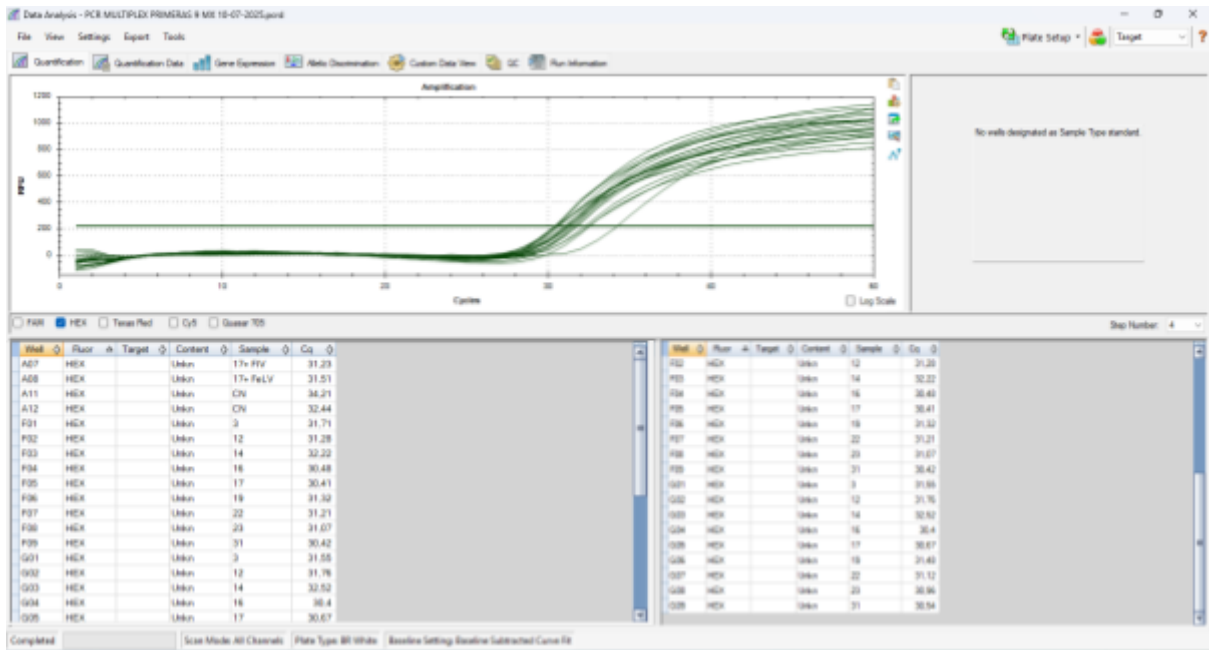


Figura 14. Curvas de amplificación del gen *VEGFA* en el sistema RT-PCR multiplex muestras 1-9

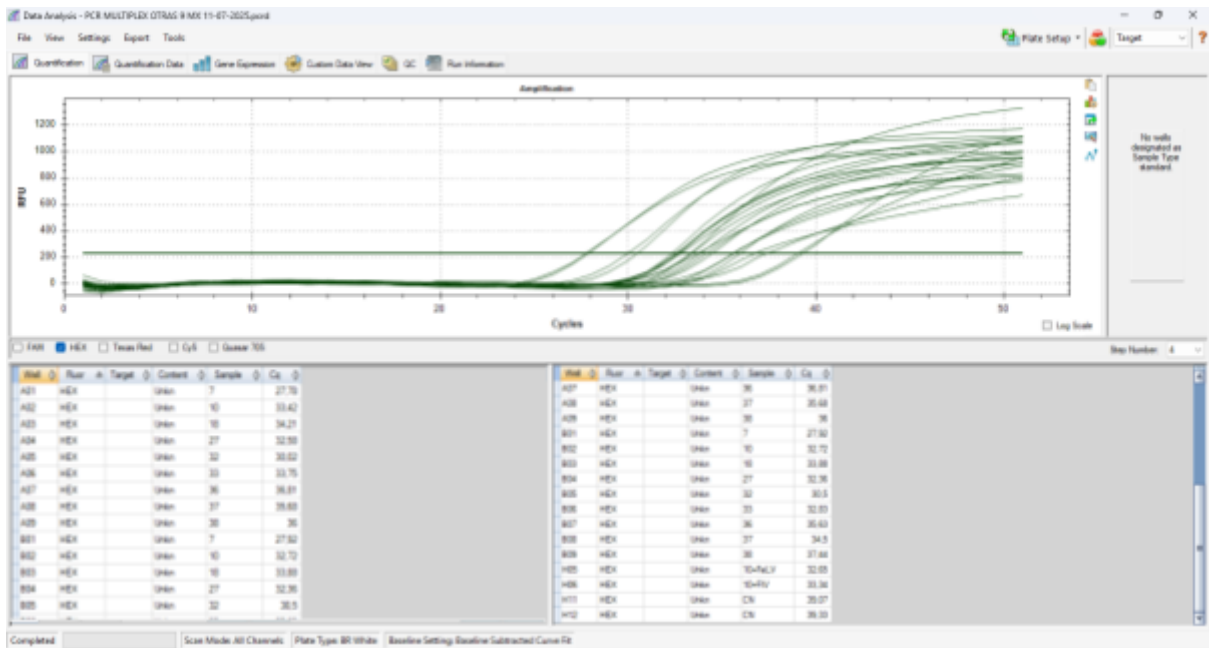


Figura 15. Curvas de amplificación del gen *VEGFA* en el sistema RT-PCR multiplex muestras 10-18

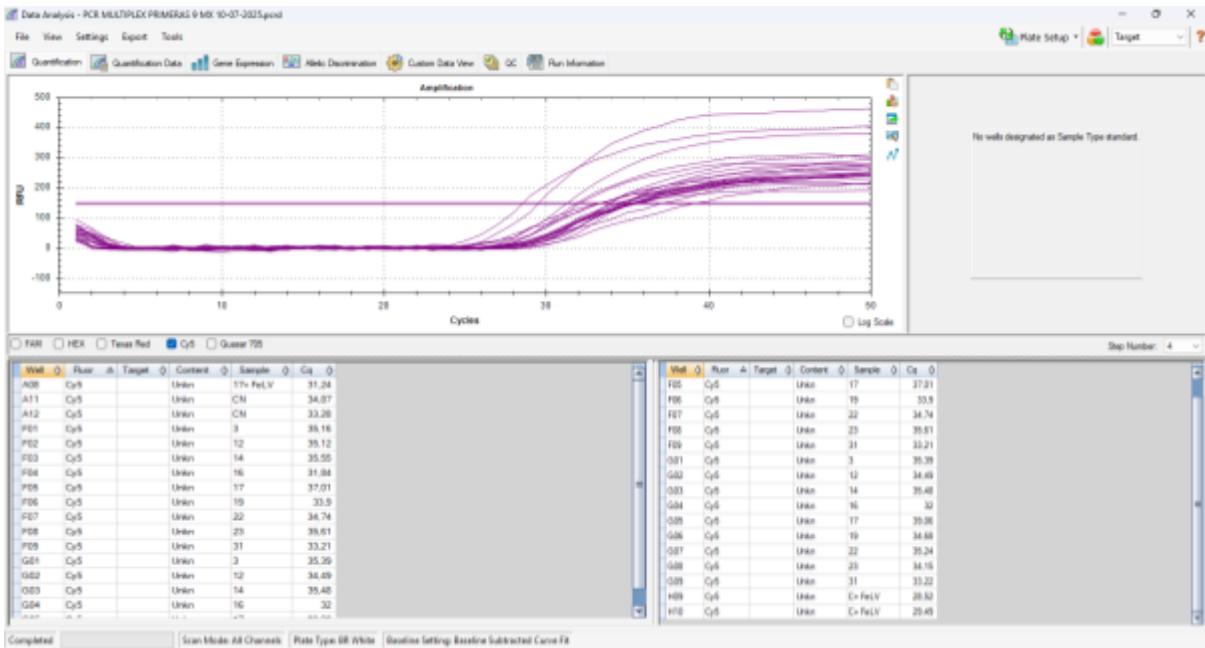


Figura 16. Curvas de amplificación del virus de leucemia felina (FeLV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 1-9

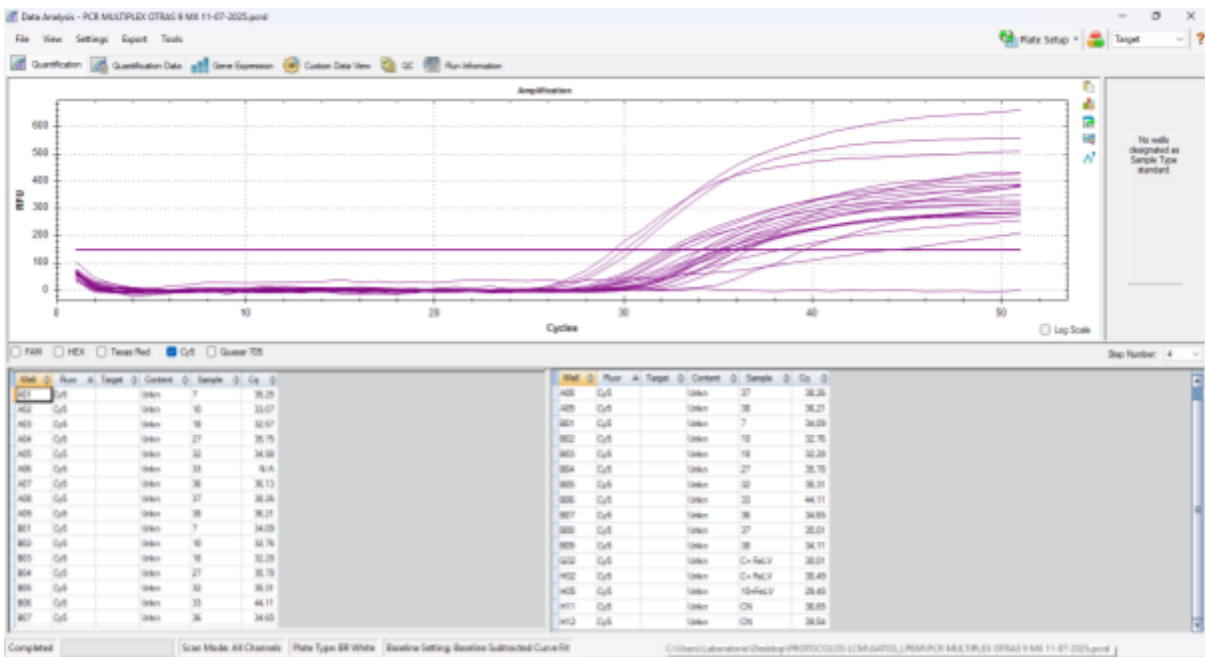


Figura 17. Curvas de amplificación del virus de leucemia felina (FeLV) en el sistema RT-PCR multiplex muestras 10-18