

VERIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO DE INMUNOCROMATOGRAFÍA DE FLUJO LATERAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA VIRAL FELINA (FIV) Y LEUCEMIA VIRAL FELINA (FeLV)

T. Rodríguez*

Resumen: Los virus de Inmunodeficiencia Viral Felina (FIV) y Leucemia Viral Felina (FeLV) pertenecientes a la familia *Retroviridae*, afectan principalmente a felinos domésticos en todo el mundo y esporádicamente a felinos salvajes, dada su fácil transmisión, es de suma importancia el diagnóstico oportuno y la prevención del contagio en gatos sanos a través del aislamiento de animales enfermos y la vacunación. El objetivo es realizar la verificación del método analítico de Inmunocromatografía utilizando la Prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE®, frente a las metodologías seleccionadas como referencia, con el fin de garantizar que no se presenten diferencias entre los resultados. Se utilizaron 69 muestras de suero de felinos con las cuales se realizó la Prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE® y la prueba SNAP® Feline Triple Test de IDEXX®, se llevó a cabo la comparación de los resultados obtenidos y la estimación del Porcentaje de concordancia. En los casos en los que se obtuvieron resultados discordantes, se realizó la confirmación del resultado utilizando el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Al realizar el análisis cualitativo de los resultados obtenidos en la comparación de métodos se observa que no existen diferencias significativas y existe un alto grado de concordancia entre las metodologías utilizadas.

Abstract: Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) belonging to the *Retroviridae* family, mainly affect domestic cats worldwide and sporadically wild cats, given their easy transmission, timely diagnosis is very important and prevention of contagion in healthy cats through the isolation of sick animals and vaccination. The objective is to verify the analytical method of Immunochromatography using BIONOTE® Dual FIV Ab / FeLV Ag Test, against the methodologies selected as reference, in order to guarantee there are no differences between the results. 69 feline serum samples were used with BIONOTE® Dual FIV Ab / FeLV Ag Test and IDEXX® SNAP® Feline Triple Test, comparison of results obtained, and estimation of the Concordance percentage were performed. In cases where discordant results were obtained, confirmation of results was performed using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. When carrying out the qualitative analysis of the results obtained in the comparison method, it is observed that there are no significant differences and there is a high degree of agreement between the methodologies used.

**Especialista de Producto Unidad Veterinaria.*

INTRODUCCIÓN

Tanto el virus de Leucemia Viral Felina (FeLV) como el de Inmunodeficiencia Viral Felina (FIV) son retrovirus de distribución mundial, producen una serie de enfermedades muy graves en el gato que se relacionan con problemas del sistema inmunitario.

El virus FeLV, se transmite fundamentalmente por la saliva y puede contagiarse a través de secreciones nasales de gatos infectados, al lavarse o compartir platos de agua o comida. En el caso de FIV el modo de transmisión más eficaz parece ser la mordedura, el contagio será posible siempre que exista un contacto directo y estrecho entre gatos, también puede ocurrir la transmisión de la madre a los cachorros, a través de la placenta o durante la lactancia.

Los signos clínicos son muchos y muy variados, ya que pueden aparecer síntomas causados directamente por el virus o por infecciones oportunistas que se producen debido a la inmunosupresión. Se puede presentar pérdida de apetito, problemas dentales o en las encías, alteraciones respiratorias, oculares, incluso alteraciones de tipo neurológico ocasionadas por la afinidad del virus al sistema nervioso, inmunosupresión, anemia y linfoma.

Estructura Viral

FeLV

El virus FeLV está compuesto por un ARN de doble cadena, posee una envoltura lipoproteica, cuya composición ha permitido clasificar el virus en tres grandes subgrupos: A, B y C, siendo el subgrupo A (FeLV-A) altamente patógeno y capaz de producir

enfermedad clínica; en su material genético el virus contiene los genes *gag*, *pol* y *env*.

La proteína codificada por el gen *gag* se conoce como el antígeno asociado al grupo y es importante para las pruebas de IFI y ELISA. Este gen codifica las proteínas estructurales inteARNs P15c (proteína de matriz), P12 (función desconocida), P27 (proteína de cápside), P10 (proteína de nucleocápside).

El gen *pol* codifica para la polimerasa viral o retrotranscriptasa. Ésta es la proteína responsable de polimerización de nucleótidos de ADN a partir de una copia de ARN viral.

El gen *env*, se encarga de codificar proteínas de la envoltura gp70 y p15e. La glicoproteína gp70 define el subgrupo viral y está fuertemente relacionada con la inducción de inmunidad específica; los anticuerpos anti-gp70 son específicos de subgrupo y dan como resultado la neutralización viral e inmunidad a la reinfección.

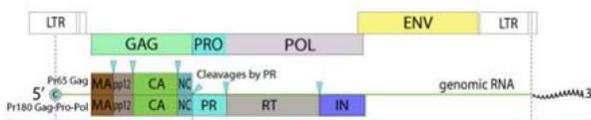


Fig. 1 Representación esquemática del genoma de FeLV.
Tomado de: Calle-Restrepo, *et al.* 2013.

FIV

Al igual que otros retrovirus, el material genético del virus FIV es ARN monocatenario de polaridad negativa, cuenta con una cápside constituida por la proteína p24 la cual es codificada por el gen *gag*; esta cuenta con alta capacidad inmunogénica.

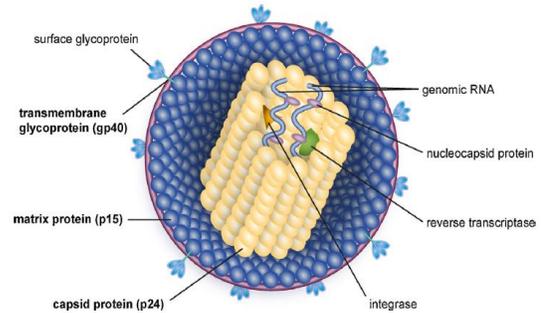


Fig. 2 Representación esquemática de la Estructura viral de FIV.
Tomado de: Westman, *et al.* 2015.

Además de la cápside, el virus está envuelto por una doble membrana lipídica derivada de la membrana celular del hospedero, donde se encuentran las glicoproteínas gp120 y p40, codificadas por el gen *env*, que actúan como proteínas de adherencia y penetración viral; estas dos proteínas cuentan con alto poder inmunogénico y son los blancos de las pruebas diagnósticas como Inmunocromatografía y ELISA.

Epidemiología

Los virus de FeLV y FIV se consideran endémicos a nivel mundial. La presentación de la infección está relacionada con poblaciones susceptibles, por ejemplo, gatos callejeros.

En cuanto a las características demográficas, se ha visto que la seroprevalencia de FIV es de 2 a 3 veces más alta en gatos machos que en hembras, hay una mayor probabilidad de infección en gatos adultos que en adolescentes y cachorros, aumentando la probabilidad de infección con la edad, con un promedio de 5 años al momento del diagnóstico. En FeLV la proporción de machos vs. hembras infectados es de 7:1, los gatos de 1 a 6 años, con edad media de 3 años, presentan una mayor prevalencia de infección.

A pesar de que existen muchos estudios relacionados con la seroprevalencia de estos dos virus a nivel mundial, en Colombia pocos reportes se tienen sobre el impacto epidemiológico de estas dos enfermedades. Estudios epidemiológicos desarrollados en Tunja, Montería, Valle de Aburrá y Bogotá, han permitido estimar las siguientes seroprevalencias:

Ciudad	% FIV	% FeLV
Tunja	9%	9%
Montería	1,6%	23%
Valle de Aburrá	10,7 %	No se analizó
Bogotá	13,1%	11,4%

Diagnóstico

Debido a la dificultad para diferenciar la sintomatología clínica de FeLV y FIV, se han desarrollado múltiples pruebas serológicas para identificar el antígeno viral en el caso del FeLV o los correspondientes anticuerpos en el caso del FIV.

Pruebas como Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos y la prueba de Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) para la detección de segmentos génicos son utilizadas por algunos laboratorios especializados.

Buscando mejorar la oferta en el mercado para el diagnóstico oportuno y confiable de estas dos patologías, casas comerciales como BIONOTE y IDEXX han diseñado pruebas que permiten detectar antígenos virales para el caso de FeLV y anticuerpos dirigidos hacia las proteínas virales p24, gp40 y p15

en el caso de FIV, de esta forma es posible en una sola prueba y de manera simultánea, realizar el diagnóstico de estas dos patologías.

Las Pruebas Rápidas de BIONOTE están basadas en el método de Inmunocromatografía de Flujo Lateral, el cual consiste en el desplazamiento o migración de la muestra a través de una membrana de nitrocelulosa donde se encuentran fijados en la fase sólida, anticuerpos anti-FeLV y antígenos de FIV, los cuales reaccionan con los antígenos o anticuerpos presentes respectivamente en la muestra y estos a su vez con el conjugado constituido por anticuerpos marcados con oro coloidal, este último permite evidenciar la reacción.

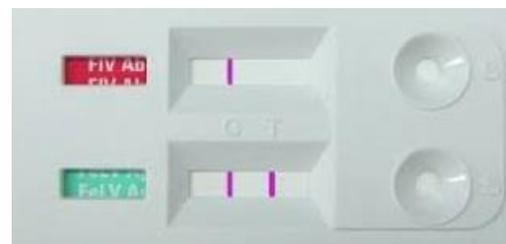
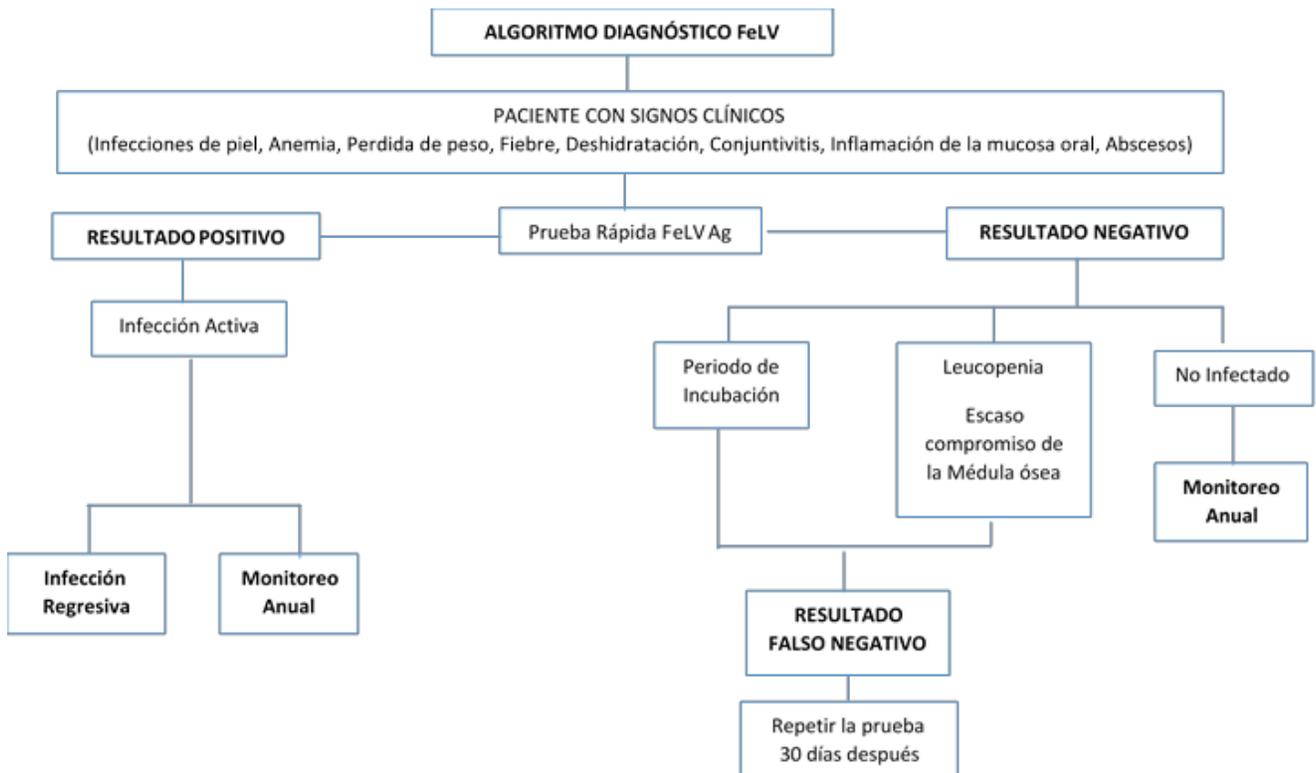
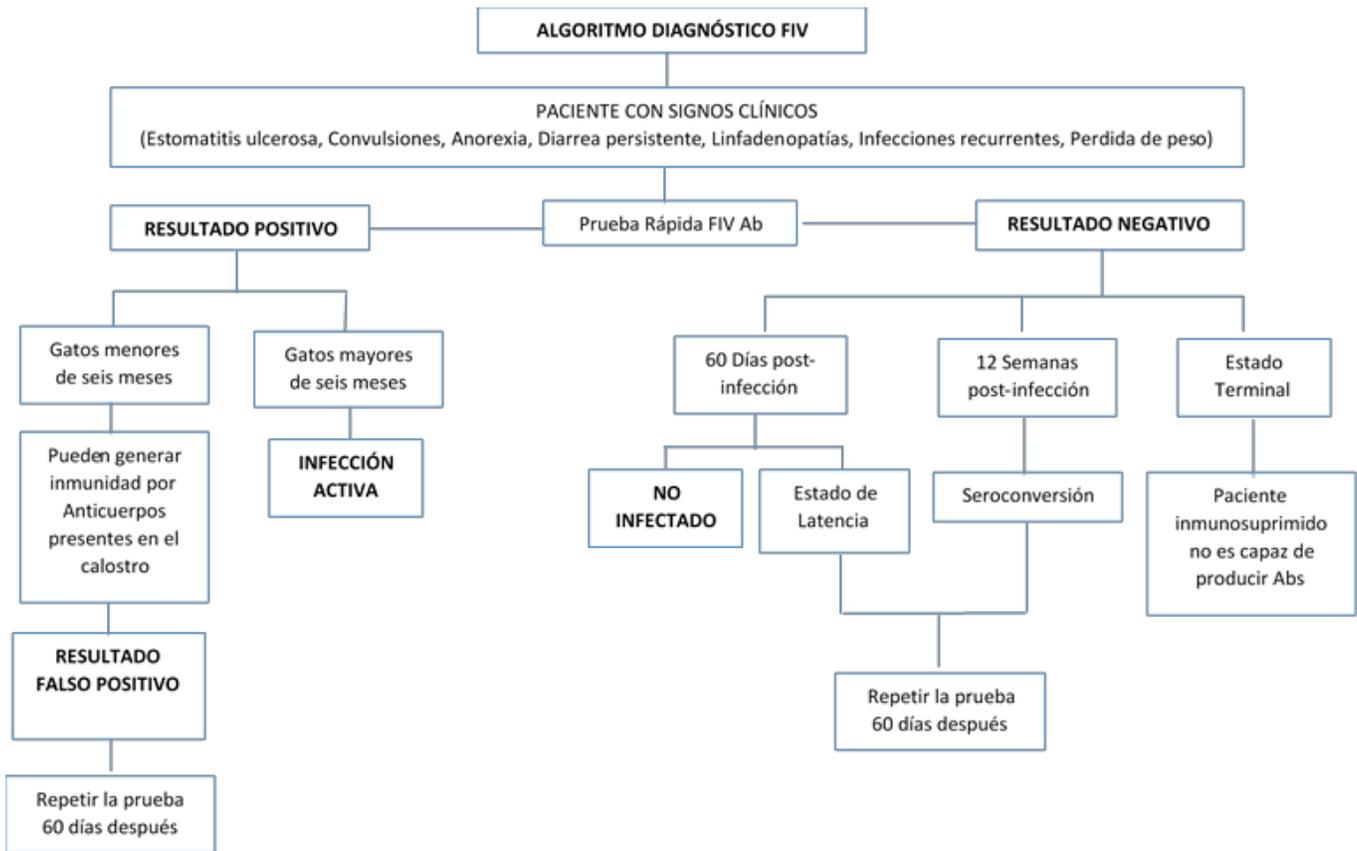


Fig. 3 Prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE®

Los porcentajes de sensibilidad y especificidad de la Prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE® son:

Test	Sensibilidad	Especificidad	Versus
FIV Ab	96,8%	99,6%	Western Blot
FeLV Ag	94,7%	99,7%	Aislamiento Viral

Para realizar el diagnóstico de FIV/FeLV se recomienda seguir los siguientes algoritmos:



MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Se utilizaron 69 muestras de suero felino las cuales fueron valoradas en una Clínica Veterinaria ubicada en la ciudad de Medellín.

Las muestras recolectadas fueron de animales que se presentaron a consulta general y de pacientes que se encontraban en proceso de adopción; durante el periodo comprendido entre Mayo de 2018 y Septiembre de 2019.

En la toma de las muestras se utilizó tubo sin anticoagulante para obtener el suero por centrifugación. Las condiciones de almacenamiento y temperatura fueron controladas garantizando la integridad y estabilidad de las muestras.

Características Demográficas de la Población

Sexo	Machos	Hembras
	40	29
Edad	Cachorros	Adultos
	39	30
Raza	Criollo	Otras
	60	9

Método: Las muestras de suero fueron valoradas por la Metodología de Inmunocromatografía de Flujo Lateral con la Prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE® y por la Metodología de Microelisa con la prueba SNAP Feline Triple Test de IDEXX®.

En los casos en los que se obtuvieron resultados discordantes, se realizó la confirmación del resultado utilizando el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Evaluación de la Veracidad: Se llevó a cabo la comparación de métodos con el fin de determinar el porcentaje de concordancia existente entre las dos metodologías.

Interpretación del Porcentaje de Concordancia: La concordancia tiene como objetivo estimar hasta qué punto dos métodos analíticos coinciden en su medición, no evalúa la validez o la certeza sobre uno u otro método, sino cuan acordes están entre sí.

RESULTADOS

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos en la comparación de métodos se encontró:

Resultados FeLV

Prueba	Prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE®		
	Resultado	POSITIVO	NEGATIVO
SNAP Feline Triple Test de IDEXX®.	POSITIVO	5	5
	NEGATIVO	1	58

De las 69 muestras procesadas con la prueba de detección de Antígeno del virus FeLV, 63 muestras fueron concordantes (58 con resultado Negativo por las dos metodologías y 5 con resultado Positivo por las dos metodologías); 6 muestras fueron No concordantes (5 con resultado Negativo en la Prueba FeLV Ag de BIONOTE® y Positivo en el SNAP Feline Triple Test de IDEXX®. / 1 con resultado Positivo en la Prueba FeLV Ag de BIONOTE® y Negativo en el SNAP Feline Triple Test de IDEXX®).

Al calcular el Porcentaje de concordancia se obtuvo un 91% de concordancia entre las Metodologías Comparadas.

Número de Muestras Analizadas	69
Número de Muestras Concordantes	63
Número de Muestras No concordantes	6
Porcentaje de Concordancia (%)	91
Criterio de Aceptabilidad	80% - 100%
Criterio de Cumplimiento	CUMPLE

De las 6 muestras No concordantes, solo fue posible comparar 2 con el Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuyo resultado fue Negativo, el cual coincidió en el de la Prueba FeLV Ag de BIONOTE®.

Prueba	BIONOTE	IDEXX	PCR
Resultado	Negativo	Positivo	Negativo

Las cuatro muestras restantes no pudieron ser evaluadas por PRC, ya que el volumen de muestra era insuficiente para tal fin.

Resultados FIV

Prueba	Prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE®		
	Resultado	POSITIVO	NEGATIVO
SNAP Feline Triple Test IDEXX®.	POSITIVO	2	0
	NEGATIVO	0	67

De las 69 muestras procesadas con la prueba de detección de anticuerpos para el virus FIV, las 69 muestras fueron concordantes (67 con resultado

Negativo por las dos metodologías y 2 con resultado Positivo por las dos metodologías).

Al calcular el Porcentaje de concordancia se obtuvo un 100% de concordancia entre las Metodologías Comparadas.

Número de Muestras Analizadas	69
Número de Muestras Concordantes	69
Número de Muestras No concordantes	0
Porcentaje de Concordancia (%)	100
Criterio de Aceptabilidad	80% - 100%
Criterio de Cumplimiento	CUMPLE

CONCLUSIONES

No se encontró ninguna asociación entre las características demográficas y la presencia de los virus de FeLV/FIV en la población estudiada.

Los valores de Porcentaje de Concordancia obtenidos al realizar el análisis cualitativo de los resultados en la comparación de métodos en el diagnóstico de los virus FeLV/FIV, indican que existe un alto grado de concordancia entre las metodologías utilizadas, sin que se afecte el estado clínico de los pacientes evaluados en el estudio.

Al realizar el análisis molecular utilizando la Metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa de los resultados No Concordantes en la Prueba de FeLV, se observó que los resultados fueron concordantes con los obtenidos en la prueba Dual FIV Ab/ FeLV Ag de BIONOTE®.

BIBLIOGRAFÍA

Incidencia de los virus de inmunodeficiencia y leucemia en *Felis catus* en la Clínica Veterinaria Gattos Tunja-Boyacá. Massey DY, *et al.* 2019.

Coinfección y Hallazgos Epidemiológicos de los Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV) y Leucemia Felina (VILeF) en Gatos Clínicamente Enfermos. Collazos Paz. 2016.

Frecuencia del Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV) en el Sur del Valle de Aburrá, Colombia (2013-2015). Molina V., *et al.* 2016.

Seroprevalencia del virus de leucemia e inmunodeficiencia felina en gatos de Montería, Córdoba. Tique V, *et al.* 2009.

The protective rate of the feline immunodeficiency virus vaccine: An Australian field study. M.E. Westman, *et al.* 2016.

Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. M.E. Westman, *et al.* 2015.

Primary immune-mediated thrombocytopenia and immune-mediated neutropenia suspected in a 21-week-old Maine Coon cat. MP Best, *et al.* 2014.

Virus de la leucemia felina: un patógeno actual que requiere atención en Colombia. Calle- Restrepo J., *et al.* 2013.