

Evaluación del test de anticuerpos frente al Coronavirus felino ImmunoComb FCoV

Diane D. Addie^{a*}, Shona A. McLachlan^a, Matthew Golder^a, Ian Ramsey^b, Oswald Jarrett^a

^aDepartamento de Patología Veterinaria, Instituto de Medicina Comparada, Diagnóstico en Animales de Compañía. Universidad de Glasgow, Bearsden Road, Glasgow, Scotland G61 1QH, UK

^bDepartamento de Estudios Clínicos Veterinarios. Universidad de Glasgow, Bearsden Road, Glasgow, Scotland G61 1QH, UK

Aceptado a 3 de Diciembre 2003

Resumen La prueba rápida comercial para determinación de anticuerpos frente al coronavirus felino (FCoV) ImmunoComb FCoV de los laboratorios Biogal Galed es evaluada por comparación con test de inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica de referencia.

Se seleccionaron y analizaron ciento tres muestras de suero o plasma: 70 resultaron positivas por ambas pruebas, 24 negativas por ambas pruebas. Con la prueba comercial se produjeron cinco resultados “falso positivo” y cuatro “falso negativo”. La sensibilidad de la prueba comercial fue del 95% y la especificidad del 83%. Al comparar titulaciones se comprobó que los resultados de la prueba comercial tenían una correlación significativa con las titulaciones obtenidas por IFI y las diferencias de correlación no eran suficientemente grandes como para tener relevancia clínica. Los títulos de anticuerpos por IFI en los cuatro “falsos negativos” resultaron ser bajos (inferiores a 1:40), lo que significa que por desgracia un gato con un resultado falso negativo podría estar aún excretando el virus FCoV.

Un resultado negativo con la prueba comercial ImmunoComb es, en la práctica, fiable. El test puede ser útil como ensayo para realizar *screening* de gatos antes de introducir nuevos miembros en una gatera o colonia libre de FCoV. Puede ser utilizado además para investigar en animales sospechosos de Peritonitis Infecciosa Felina (FIP), ya que la mayoría de los gatos con esta condición presentan títulos altos de anticuerpos por IFI. Así, **un resultado positivo alto será útil en el diagnóstico de FIP (junto con otros análisis bioquímicos y citológicos)**, sin embargo resultados positivos tendrían apenas un valor limitado para la monitorización de infección por FCoV en gatos saludables, ya que la titulación de anticuerpos podría no ser fidedigna comparada con los valores obtenidos mediante IFI. Todos los Resultados positivos obtenidos usando el kit ImmunoComb deberían ser confirmados y titulados por IFI. El kit también parece trabajar eficientemente con muestras de líquido ascítico (n = 6) pero fue testado un número insuficiente de muestras para obtener conclusiones.

* Corresponding author. Tel.: +44-(0)141-330-5786; fax:+44-(0)141-330-5748
E-mail address: D.D.Addie@vet.gla.ac.uk (D.D. Addie).

Introducción

La coronavirus felina (FCoV) es una infección ubicua de los gatos que ocasionalmente causa vasculitis letal, peritonitis infecciosa felina (FIP). Medir los anticuerpos anti-FCoV resulta útil en la monitorización de infecciones por el coronavirus y, teniendo en cuenta al mismo tiempo otros parámetros citopatológicos, puede ayudar en el diagnóstico de FIP. Estos parámetros incluyen: concentración de Alpha-1 glicoproteína, ratio albúmina:globulina, hematología o citología

de efusión (Duthie et al., 1997; Paltrinieri et al., 2001; Sparkes et al., 1994).

La presencia de anticuerpos frente al FCoV se usa habitualmente como indicador de infección, antes de introducir nuevos gatos en un criadero o una colectividad libre del virus. Su medición también puede ser usada para determinar la eficacia del destete y aislamiento tempranos (Addie and Jarrett, 1990, 1992). En estas situaciones, el análisis de anticuerpos anti-FCoV puede ser más útil que la detección del virus propiamente. Una muestra de suero

singular con titulación inferior a 1:10 indicará que se trata de un gato que improbablemente esté difundiendo el virus (Addie and Jarrett, 2001). En contraste se requieren cinco muestras de heces consecutivas mensuales testadas por reacción de retrotranscriptasa polimerasa en cadena (RT-PCR) para demostrar que un gato no está eliminando FCoV (Addie and Jarrett, 2001). Los gatos con FIP normalmente tienen un alto título de anticuerpos, por eso un resultado negativo excluye el diagnóstico de FIP (Sparkes et al., 1994). De todos modos, algunos gatos con la forma efusiva de FIP presentan títulos bajos de anticuerpos en las pruebas serológicas debido a que sus anticuerpos se agotan uniéndose a enormes cantidades de virus presentes en las efusiones.

Hay una prueba comercial semicuantitativa de anticuerpos anti-FCoV (ImmunoComb FCoV) disponible en el mercado. En el presente estudio dicha prueba fue comparada con el test IFI, que se considera técnica de referencia para medición de anticuerpos anti-FCoV.

Materiales y métodos

Inmunofluorescencia

Los títulos de anticuerpos por inmunofluorescencia fueron determinados como está descrito (Addie and Jarrett, 1992). Las muestras se diluyeron inicialmente a 1:10 en tampón fosfato salino, y estas diluciones se doblaron a 1280. Sólo la mitad de las células en cada pocillo del porta estaban infectadas, otorgando un control negativo interno de uniones no específicas entre los anticuerpos y las células de la lámina. Títulos de 1:10 ó inferiores se contabilizaron como seronegativos; 1:20 ó superiores, como seropositivos. Títulos mucho mayores que 1:1280 fueron considerados como 1280.

Test kits

Se usó como prueba el kit comercial para detección de anticuerpos por inmunoensayo enzimático disponible (*ImmunoComb FCoV (FIP) Antibody Test Kit*, Biogal Galed Laboratories, Israel). Estos kits contienen tarjetas de tests en tiras y **cada tira presenta tres áreas de reacción: un control positivo, un control negativo y el área del test propiamente dicho** (ver Fig. 1). Los kits fueron conservados en refrigeración a 4 °C, como

se indica en las instrucciones del fabricante. Cinco de los kits usados pertenecían a un lote y los otros cinco a un segundo lote. Los kits se usaron de acuerdo con las instrucciones. Se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Las muestras a analizar se descongelaron a temperatura ambiente. Fueron añadidos cinco microlitros de suero a cada pocillo para muestra, y se realizaron todos los pasos de la prueba siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mojó la tarjeta en las series de pocillos del kit durante los tiempos escificados, agitando verticalmente cada 2 minutos. Cuando la reacción se hubo completado, la tarjeta se retiró y se dejó secar antes de leer los resultados por comparación con la escala de color que se suministra junto con cada kit (Fig. 2). Se obtuvieron lecturas del 1 al 6 comparando las tonalidades de gris de los puntos resultantes en la tarjeta test con los de la escala. Puesto que se trata de una valoración subjetiva, se emplearon dos técnicos lectores independientes. El punto control positivo, por intensidad, se colocó en el nivel 3 de la escala, de modo que lecturas iguales o mayores que 3 fueron consideradas positivas, lecturas de 2.5 o más bajas fueron consideradas resultados negativos. La clasificación del fabricante como “bajo positivo” para valores superiores a 0 y por debajo de 2.5 no se tuvo en cuenta puesto que experiencias recientes con el kit habían determinado que estos resultados son generalmente negativos por IFI. Puntos más oscuros que el nivel 6 se consideraron como 6.

Las muestras

Fueron seleccionadas ciento tres muestras de plasma o suero y seis de líquido ascítico de entre varias muestras sometidas a diagnóstico laboratorial, análisis de anticuerpos, por técnicos veterinarios. Las muestras habían demostrado tener un título de anticuerpos por IFI en el rango de 10 a >1280. Doce muestras fueron parejas de sangre y ascitis tomadas de seis gatos. Todas ellas se conservaron a -20°C desde el análisis por IFI y hasta que se usaron para el estudio.

Datos del análisis

Sensibilidad y especificidad fueron determinadas por los cálculos estándar y se expresan por aproximación al número entero más cercano (Addie and Ramsey, 2001). El valor predictivo positivo y valor predictivo negativo no se calcularon puesto

que se trataba de muestras seleccionadas y, por tanto, no eran representativas de la población. El coeficiente de correlación de Pearson entre las dos personas encargadas de la lectura de resultados se calculó usando un paquete software convencional (Minitab v13 de Windows, Minitab Inc.). El promedio entre los dos lectores fue empleado para los subsecuentes análisis. El coeficiente de correlación entre el promedio de los lectores y el valor logarítmico de los títulos por IFI fue entonces calculado.



Figure 1 Dos tiras de la tarjeta Immunocomb en las que vemos los tres puntos de reacción: control positivo y negativo y muestra. La nº 8 es positiva, la nº 9 es negativa.

Resultados

La correlación entre los dos analistas lectores fue 0.95 ($P < 0.001$) y la media se usó para los restantes cálculos. Únicamente tres muestras fueron dadas como positivas por uno y como negativas por el otro (sin patrón referencia consistente). La media de lecturas indicó que esas tres muestras se deberían considerar como positivas. Setenta muestras fueron positivas tanto por ImmunoComb como por IFI, veinticuatro fueron negativas por ambas técnicas de análisis (ver Fig. 3). Cinco muestras con título de 10 o menos por IFI (negativo) dieron positivo al test ImmunoComb. Cuatro muestras ImmunoComb negativo tenían titulación IFI positiva. De esas cuatro, tres con título de 20 y una con título de 40. No hubo ninguna muestra con título ≥ 80 que se perdiese como positiva por ImmunoComb. La sensibilidad para la prueba ImmunoComb es de 95% y la especificidad de 83%. Dos de las tres muestras en las que los lectores discordaban se vio que eran falsos positivos cuando se testaron por IFI. La comparación entre los títulos IFI y los resultados ImmunoComb se muestra en la Fig. 4. El coeficiente Pearson de correlación entre la media de resultados ImmunoComb de ambos lectores y el logaritmo de los análisis IFI que se obtuvo fue 0.89 ($P < 0.001$). Ningún análisis

estadístico formal sería realizado con las seis muestras de líquido ascítico porque era un número demasiado escaso de muestras, aunque los resultados parecían ser muy similares a los obtenidos con sangre (ver Fig. 5).

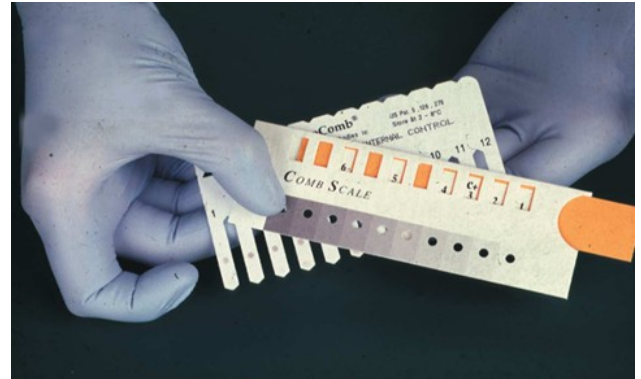


Figure 2 Los resultados se leen enmarcando y fijando primero el punto control negativo en el control de la escala (C3+), después se ve qué tono es el que corresponde al punto test en la escala. Para esta muestra (flecha blanca), el resultado es 4.5.

	Inmunocomb Positive	Inmunocomb negative
IFA positive	70	4
IFA negative	5	24

Figure 3 Tabla comparativa de resultados positivos y negativos obtenidos en 103 muestras de sangre testadas por IFI e ImmunoComb. Test de anticuerpos frente al coronavirus felino.

Discusión

A partir de nuestros datos la comparación del FCoV ImmunoComb con el test IFI ha resultado claramente favorable y se ve que puede ser útil en algunas situaciones de la práctica veterinaria. De cualquier modo, como el Valor Predictivo Positivo (VPP) y el Valor Predictivo Negativo (VPN) no pudieron ser calculados, el verdadero valor práctico del kit requiere más análisis. El valor variará en la práctica de acuerdo con la prevalencia del virus (FCoV) y del uso que se le de al kit. Su utilidad más práctica es el *screening* de gatos antes de ser introducidos en colonias libres del coronavirus felino. Siendo que los gatos falsos negativos tuvieron título bajo de anticuerpos por IFI, y ello se asocia a prevalencia y eliminación muy baja del virus, los falsos negativos no suponen un problema.

No recomendamos en ningún caso meter un gato ImmunoComb FCoV positivo en una población libre de FCoV, pues tal acción conlleva un riesgo

aproximado del 33% de que el gato o la gata excrete virus (Addie and Jarrett, 2001). El Immunocomb solamente erró en 4 de 81 muestras seropositivas. Se deduce que Immunocomb es un test adecuado para el chequeo previo de gatos que van a ser introducidos en una población libre de la infección.

Immunocomb también puede tener algún valor en el diagnóstico de Peritonitis Infecciosa Felina (FIP). Si bien que la serología como único indicador nunca debe ser usada para descartar o confirmar un diagnóstico de FIP, títulos negativos sugieren un replanteamiento del caso y títulos altos pueden ayudar a diagnosticar. En vista del incidente de algunos pocos resultados falsos positivos con Immunocomb, todos los gatos enfermos que den positivo requieren un contraanálisis usando un test IFI. Por el contrario, un resultado Immunocomb negativo asevera más que el gato no sufre FIP que un bajo nivel de anticuerpos determinado por IFI.

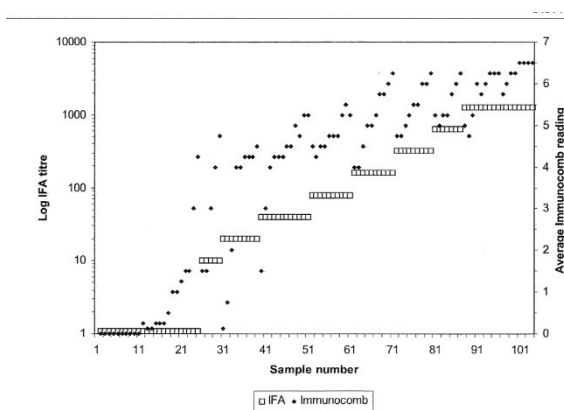


Figura 4 Este gráfico muestra la media de resultados Immunocomb de los dos lectores y el logaritmo de los títulos obtenidos usando la técnica de análisis de anticuerpos por inmunofluorescencia (IFI) para cada una de las 103 muestras de sangre.

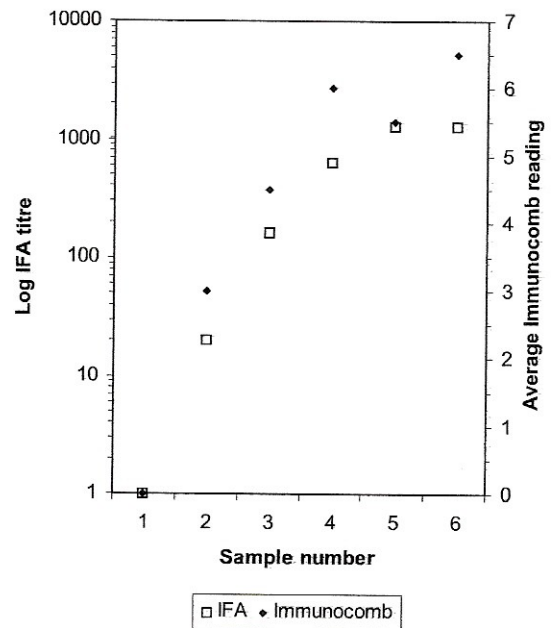


Figura 5 Este gráfico muestra la media de resultados Immunocomb de los dos lectores y el logaritmo de los títulos obtenidos usando la técnica de análisis de anticuerpos por inmunofluorescencia (IFI) para cada una de las seis muestras de líquido ascítico.

Los resultados por Immunocomb no resultarán útiles en la monitorización del descenso o pérdida de anticuerpos en gatos al eliminar la infección. Esto se debe a que hay poca correlación y a su incapacidad para distinguir claramente entre títulos altos o moderados. Por ejemplo, el hallazgo de un descenso de titulación por IFI de 1280 a 320 y después a 40 en un período de tiempo indica que el gato pasó por un proceso de eliminación de FCoV, y debería ser alejado de fuentes de reinfección. Un Immunocomb no podría detectar este cambio. El IFI se recomienda para estos estudios.

El proceso falló en la simulación de una situación veterinaria real en dos hechos. En primer lugar, en la práctica veterinaria es más probable que sólo un gato sea evaluado cada vez (una tira de la tarjeta), mientras que en este ensayo los 12 tests de cada kit fueron usados de una vez. No se determinó si el kit permanece igual de fiable con las sucesivas refrigeraciones y al atemperar varias veces. En segundo lugar, el uso de sangre completa como muestra no fue valorado (a pesar de que el fabricante indica que también es posible).

En conclusión, el Immunocomb FCoV tuvo una comparación favorable con el

análisis por IFI y debería ser útil en la investigación de casos sospechosos de FIP, así como en el screening de gatos que se quieran introducir en colonias libres de FCoV. Es en cualquier caso precavido ver la correlación existente entre el título de anticuerpos que se obtenga con IFI.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Joyce Simpson y Michael McDonald por la ayuda técnica help, Maria Williams y Janet McGrane por el trabajo de secretariado and Drew McConnell, Graeme McCombe y Andrew Gordon por el soporte informático. Damos las gracias a los laboratorios *Biogal Galed* y *Companion Animal Diagnostics* por fundar este proyecto.

Referencias

- Addie, D.D., Jarrett, O., 1990. Control of feline coronavirus infection in kittens. *Veterinary Record* 126, 164.
- Addie, D.D., Jarrett, O., 1992. A study of naturally occurring feline coronavirus infection in kittens. *Veterinary Record* 130, 133–137.
- Addie, D.D., Jarrett, O., 2001. The use of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Veterinary Record* 148, 649–653.
- Addie, D.D., Ramsey, I.K., 2001. The laboratory diagnosis of infectious diseases, in: Ramsey, I.K., Tennant, B. (Eds.), *Manual of Canine and Feline Infectious Diseases*. Gloucester. British Small Animal Veterinary Association, pp. 1–17.
- Duthie, S., Eckersall, P.D., Addie, D.D., Lawrence, C.E., Jarrett, O., 1997. Value of α_1 -acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Veterinary Record* 141, 299–303.
- Paltrinieri, S., Grieco, V., Comazzi, S., Cammarata Parodi, M., 2001. Laboratory profiles in cats with different pathological and immunohistochemical findings due to feline infectious peritonitis (FIP). *Journal of Feline Medicine and Surgery* 3(3), 149–159.
- Sparkes, A.H., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., 1994. An appraisal of the value of laboratory tests in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 30, 345–350.

Available online at www.sciencedirect.com

