

Neue Verfahren zur Diagnostik der feline infektiösen Peritonitis

von Sandra Jasmin Felten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Neue Verfahren zur Diagnostik der felines infektiösen
Peritonitis

von Sandra Jasmin Felten

aus Leonberg

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer
Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Meinen Eltern und Hannes

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	11
II.	LITERATURÜBERSICHT	12
1.	Hypothesen zur Pathogenese der felines infektiösen Peritonitis	12
1.1.	Übertragung von virulenten felines Coronaviren	13
1.2.	<i>In-vivo</i> -Mutationshypothese	14
1.2.1.	Ausscheidung und Übertragung der felines Coronaviren	16
1.2.2.	Mögliche Mutationen	19
1.2.2.1.	Spike-Gen	20
1.2.2.2.	Open reading frame 3abc	23
1.2.2.3.	Open reading frame 7ab	24
1.2.3.	Tropismus und Replikation der felines Coronaviren	25
1.2.4.	Entstehung immun-mediierter Veränderungen	28
1.2.4.1.	Rolle von aktivierten Monozyten/Makrophagen	29
1.2.4.2.	Rolle der humoralen Immunität	31
1.2.4.3.	Rolle der zellulären Immunität	33
2.	Diagnostik der felines infektiösen Peritonitis	35
2.1.	Indirekter Erregernachweis	38
2.1.1.	Nachweis von Antikörpern gegen feline Coronaviren	38
2.1.1.1.	Serum	38
2.1.1.2.	Erguss	41
2.1.1.3.	Liquor	42
2.1.2.	Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen	43
2.2.	Direkter Erregernachweis	44
2.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.2.1.1.	Gewebe	45
2.2.1.2.	Blut	46
2.2.1.3.	Erguss	50
2.2.1.4.	Liquor	52
2.2.1.5.	Anderes Material	53
2.2.2.	Nachweis von feline Coronavirus-Antigen in Makrophagen	53
2.2.2.1.	Gewebe	54
2.2.2.2.	Erguss	55

2.2.2.3.	Liquor	58
III.	PUBLIKATION 1	59
IV.	PUBLIKATION 2	72
V.	PUBLIKATION 3	82
VI.	DISKUSSION	91
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	107
VIII.	SUMMARY.....	109
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	111
X.	DANKSAGUNG	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AGP	saures alpha-1-Glykoprotein
Ak	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
C3	Komplementfaktor C3
CCV	canines Coronavirus
E	envelope (Hülle)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
et al.	et alii (und andere)
fAPN	feline Aminopeptidase N
FCoV	felines Coronavirus
Fc-Rezeptor	fragment-crystalline-Rezeptor
FECV	felines enterales Coronavirus
FeLV	felines Leukämievirus
FIP	feline infektiöse Peritonitis
FIPV	feline-infektiöse-Peritonitis-Virus
FIV	felines Immunschwächevirus
FNA	Feinnadelaspirationsbiopsie
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

ICC	immunocytochemistry (Immunzytochemie)
i. d. R.	in der Regel
IFA	immunofluorescence assay (Immunfluoreszenz-Antikörper-Test)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
k. A.	keine Angabe
LAMP	loop-mediated isothermal amplification (Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation)
M	Membran
MAPK	mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)
M-CSF	macrophage colony stimulating factor (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
MMP-9	Matrix-Metalloprotease 9
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
M1058L	Substitution Leucin statt Methionin an Position 1058 des Spike-Proteins
N	Nukleokapsid
n. d.	nicht differenziert
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
p. i.	post infectionem

RIM	rapid immunochromatographic test (immunchromatografischer Schnelltest)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-LAMP	reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (reverse-Transkriptase-Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation)
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction (reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RT-nPCR	nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nested reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RT-qPCR	real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (quantitative reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
S	Spike
SAA	Serum-Amyloid-A
S1060A	Substitution Alanin statt Serin an Position 1060 des Spike-Proteins
TGEV	Transmissible-Gastroenteritis-Virus
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
v. a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Δ TNC	Δ total nucleated cells (Δ aller kernhaltigen Zellen)

I. EINLEITUNG

Feline Coronaviren (FCoV) existieren als zwei verschiedene Pathotypen. Man unterscheidet das feline enterale Coronavirus (FECV) und das die feline infektiöse Peritonitis (FIP) verursachende Virus (FIPV) (PEDERSEN et al., 1981a; PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984a; PEDERSEN et al., 1984b; PEDERSEN, 1987a; HERREWEGH et al., 1995b). Nach oraler Aufnahme und Vermehrung des FECV im Darmepithel kann es zur Mutation und dadurch zur Entstehung des FIPV kommen (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). Noch ist unklar, welche Gene die zu FIP führende(n) Mutation(en) beherbergen. Vielversprechende Studienergebnisse beschreiben Mutationen im Spike (S)-Gen, die bei > 95 % der untersuchten Viren mit dem FIP-Phänotyp korrelierten (CHANG et al., 2012). FIP ist eine tödlich verlaufende Erkrankung; eine kausal wirksame Therapie ist nicht verfügbar (HARTMANN & RITZ, 2008; FISCHER et al., 2011). Die definitive Diagnosestellung ist daher von entscheidender Bedeutung, um Fehldiagnosen und die Euthanasie von nicht an FIP erkrankten Katzen zu verhindern. Existierende diagnostische Tests können bislang jedoch nicht zwischen FECV und FIPV unterscheiden und erreichen meist unzureichende Sensitivität und Spezifität, insbesondere bei der Untersuchung von Blut. Als Goldstandard gilt der immunhistochemische Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen in FIP-typischen Gewebeläsionen (ADDIE et al., 2004b; PEDERSEN, 2009; GIORI et al., 2011; KIPAR & MELI, 2014). Die Entnahme von Gewebeproben in einer Laparotomie oder Laparoskopie ist jedoch sehr invasiv. Wäre es aber möglich, das mutierte Virus nachzuweisen, könnte dies potenziell eine sichere Diagnose *ante mortem* ermöglichen.

Das erste Ziel dieser Arbeit (Studie 1) war daher die Evaluation einer neuen reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), welche Viren mit zwei Mutationen im S-Gen vom Wildtyp unterscheidet und damit eine Differenzierung zwischen FECV und FIPV ermöglichen soll. Weiteres Ziel der Arbeit (Studie 2) war die Etablierung und Evaluation einer immunzytochemischen Nachweismethode für FCoV in Makrophagen in Erguss. In einer dritten Studie sollte diese neue Methode in Augenkammerwasserproben bewertet werden, einem bislang nicht oder kaum verwendeten Probenmaterial, das auch bei Katzen ohne Körperhöhlenerguss verfügbar ist.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Hypothesen zur Pathogenese der felines infektiösen Peritonitis

FECV und FIPV sind zwei verschiedene Pathotypen des FCoV mit unterschiedlichem biologischen Verhalten (PEDERSEN et al., 1981a; PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984a; PEDERSEN et al., 1984b; PEDERSEN, 1987a; HERREWEGH et al., 1995b). FECV kommt innerhalb der Katzenpopulation, insbesondere in Mehrkatzenhaushalten, sehr häufig vor. Eine Infektion verläuft zumeist asymptomatisch oder verursacht eine in der Regel (i. d. R.) milde und transiente Enteritis, die nur in Ausnahmefällen bei jungen Katzen auch einen schwereren Verlauf nehmen kann (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984a; PEDERSEN et al., 1984b; HOSKINS, 1993; VOGEL et al., 2010). Sehr selten kann es zu Durchfall mit tödlichem Verlauf kommen (KIPAR et al., 1998b). Die Krankheit FIP, die durch FIPV ausgelöst wird, tritt hingegen nur sporadisch auf (PEDERSEN, 1976a; ADDIE et al., 1995).

Folgende Definition soll die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nomenklatur erläutern: es wird immer dann von FECV oder FIPV gesprochen, wenn eindeutig ist, dass es sich um den jeweiligen Pathotyp mit dem entsprechenden, zuvor beschriebenen biologischen Verhalten handelt. Weiterhin wird der Begriff FECV für den FCoV-Genotyp verwendet, wenn das virale Genom die mit FIP in Verbindung gebrachte S-Gen-Mutationen (CHANG et al., 2012) nicht enthält. Der Begriff FIPV hingegen bezeichnet in der vorliegenden Arbeit FCoV, welche die mit FIP assoziierten S-Gen-Mutationen (CHANG et al., 2012) beinhalten. Die Bezeichnung FCoV schließlich wird dann verwendet, wenn unklar ist, welcher Pathotyp oder Genotyp vorliegt oder wenn allgemein gültige Aussagen über feline Coronaviren getroffen werden.

Die Pathogenese der FIP, die Bedeutung der beiden Virusvarianten und ihre Beziehung zueinander werden noch immer sehr kontrovers diskutiert. Im Folgenden werden die zwei häufigsten Hypothesen zur Entstehung der FIP, die Hypothese der Übertragung von virulenten Viren und die *in-vivo*-Mutationshypothese, erläutert.

1.1. Übertragung von virulenten feline Coronaviren

Eine Hypothese legt der Pathogenese der FIP das gleichzeitige Zirkulieren genetisch unterschiedlicher virulenter (FIPV) und avirulenter (FECV) Virusstämme innerhalb der Katzenpopulation zugrunde (DYE & SIDDELL, 2007; BROWN et al., 2009). Nur diejenigen empfänglichen Katzen, die sich mit dem krankheitsverursachenden FIPV infizieren, erkranken, während eine Infektion mit dem avirulenten FECV asymptomatisch verläuft (BROWN et al., 2009). Die Untersuchung eines FIPV/FECV-Paares und der Nachweis von Deletionen im Genom des FECV führten im Rahmen dieser Hypothese zu der Annahme, dass FIPV sich nicht aus FECV entwickelt, sondern dass beide Viren gleichzeitig existieren. Rekombinationen von zwei avirulenten FECV-Varianten führen möglicherweise zur Entstehung des virulenten FIPV (VENNEMA et al., 1992). Gestützt wurde die Hypothese durch die Sequenzierung von FCoV, die von Katzen mit FIP und von FCoV-infizierten, asymptomatischen Katzen isoliert wurden. Mit dem FIP-Phänotyp assoziierte Virusstämme konnten im Hinblick auf Gensequenzen der Membran (M)- und 7b-Gene einem monophyletischen Muster zugeordnet werden, das sich in mehreren Gensegmenten von dem Muster der FECV von asymptomatischen Katzen unterschied (BROWN et al., 2009). Desweiteren findet die Hypothese Zuspruch durch eine Studie, in der die Ribonukleinsäure (RNA) von FCoV aus dem Jejunum und der Leber einer Katze mit histopathologisch bestätigter FIP untersucht wurde. Die analysierten Gensequenzen der FCoV aus Jejunum und Leber erwiesen sich als identisch; die Autoren sahen darin eine Widerlegung der *in-vivo*-Mutationshypothese (DYE & SIDDELL, 2007). Bestätigend für die Hypothese des Vorkommens virulenter und avirulenter Stämme innerhalb der Population ist aus Sicht weiterer Autoren auch der Nachweis eines identischen FCoV sowohl im Kot als auch systemisch innerhalb derselben Katze (HORA et al., 2013). Hämorrhagisches Dengue-Fieber oder die Venezuelanische Pferdeenzephalitis sind weitere Beispiele für Erkrankungen, die nur durch bestimmte virulente Virusstämme hervorgerufen werden, die neben avirulenten in der Population existieren (MONGKOLSAPAYA et al., 2003; ANISHCHENKO et al., 2006).

Das sporadische Auftreten der FIP und die Seltenheit von Krankheitsausbrüchen innerhalb von Katzenpopulationen sprechen allerdings aus epidemiologischer Sicht gegen diese Hypothese zur Pathogenese der FIP (POLAND et al., 1996).

Zudem wurde die Richtigkeit von Aussagen der Verfechter der Hypothese der Übertragung virulenter Viren durch Ergebnisse nachfolgend beschriebener Studien erheblich infrage gestellt (CHANG et al., 2010; CHANG et al., 2011). Für die *in-vivo*-Mutationshypothese spricht, dass die von CHANG und Mitarbeitern (2010; 2011) analysierten 3c- und M-Gen-Sequenzen, im Gegensatz zu früheren Berichten (BROWN et al., 2009), ein paraphyletisches Verteilungsmuster aufwiesen, also eine starke genetische Übereinstimmung entsprechend ihrer Herkunft zeigten, unabhängig vom jeweiligen Pathotyp. Eine spätere Studie, die die M-Gen-Region auf Unterschiede zwischen FECV und FIPV hin untersuchte, befand aufgrund ihrer Ergebnisse sowohl die *in-vivo*-Mutationshypothese als auch die Hypothese des Vorkommens virulenter und avirulenter Stämme innerhalb der Population für plausibel. Diese Autoren postulieren also, dass beides möglich ist – die Übertragung eines virulenten FIPV von Katze zu Katze, aber auch die *de-novo*-Entstehung eines virulenten FIPV aus einem avirulenten FECV in einer infizierten Katze (HORA et al., 2013).

1.2. *In-vivo*-Mutationshypothese

Die zweite wichtige Hypothese zur Pathogenese der FIP, die *in-vivo*-Mutationshypothese, vermutet die Entstehung des FIPV durch spontane Mutation(en) aus FECV in einer infizierten Katze (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). Aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft der beiden Virusvarianten ergab sich schon frühzeitig der Verdacht, dass eine der beiden Varianten eine Mutation der anderen darstellt (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984b). Zudem konnte gezeigt werden, dass einige FECV größere genetische Übereinstimmung mit virulenten FIPV aufweisen als mit anderen FECV, wodurch die Theorie gestützt wurde, dass FECV und FIPV nicht verschiedene Spezies, sondern vielmehr Varianten desselben Virus seien (HERREWEGH et al., 1995b). Die beiden FCoV-Varianten unterscheiden sich aber deutlich in ihrer Virulenz: FECV ist oral übertragen hochkontagiös, verursacht jedoch meist keine klinischen Symptome. FIPV hingegen ist auf oralem Wege nicht infektiös, führt aber zur tödlich verlaufenden Erkrankung FIP (PEDERSEN et al., 1981a; PEDERSEN et al., 1981b).

Folgende Studie unterstreicht die *in-vivo*-Mutationshypothese. Zwei Gruppen von Katzen wurden oral mit einem FECV-Isolat infiziert. Die erste Gruppe bestand aus chronisch mit dem feline Immunschwächevirus (FIV) infizierten Katzen, die

zweite Gruppe beinhaltete FIV-negative Wurfgeschwister (POLAND et al., 1996). Katzen beider Gruppen zeigten während der ersten zwei Monate post infectionem (p. i.) keine Symptome. Acht bis zehn Wochen p. i. entwickelten jedoch zwei der FIV-positiven Katzen FIP. Im Folgenden wurden gesunde spezifisch Pathogen-freie Katzen intraperitoneal mit den von den beiden erkrankten Katzen isolierten FCoV inokuliert. Ein Teil der Katzen entwickelte daraufhin FIP. Anhand dieses biologischen Verhaltens der FCoV konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Virus um ein FIP-auslösendes FIPV handelte. Die beiden FIPV-Varianten und das ursprüngliche FECV-Isolat zeigten nur sehr geringe genetische Unterschiede. Der zeitliche Zusammenhang zwischen FECV-Infektion und Auftreten der beiden FIPV-Varianten und die enge genetische Verwandtschaft der drei Viren sind deutliche Hinweise darauf, dass FIPV durch Mutation(en) aus FECV entsteht (POLAND et al., 1996).

Der Vergleich von FECV/FIPV-Paaren, die aus Kot und Gewebe gesunder und an FIP erkrankter Katzen aus derselben Zucht oder demselben Tierheim isoliert wurden, lieferte neue Befunde, die für die Richtigkeit der *in-vivo*-Mutationshypothese sprechen (VENNEMA et al., 1998). Im Genom der FIPV wurden Deletionen oder Nonsens-Mutationen im open reading frame (ORF) 3c und, weniger häufig, Punktmutationen im ORF 7b nachgewiesen, die im jeweiligen FECV-Partner nicht vorhanden waren (VENNEMA et al., 1998). Die große genetische Ähnlichkeit der jeweiligen FIPV/FECV-Paare aus gleichen geografischen Regionen oder Zuchten lieferte Hinweise auf eine gemeinsame Abstammung von einem FCoV und sprach gegen das Vorkommen verschiedener zirkulierender Stämme mit unabhängiger Abstammung (VENNEMA et al., 1995; VENNEMA et al., 1998; CHANG et al., 2010; CHANG et al., 2011; BARKER et al., 2013).

Die *in-vivo*-Mutationshypothese wurde inzwischen durch die Ergebnisse zahlreicher weiterer Studien gestützt. So wurden Mutationen in mehreren Struktur- oder Nichtstrukturproteingenen des FIPV nachgewiesen, und es konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen in jeder Katze einzigartig waren und damit unabhängig durch Mutation aus dem jeweiligen FECV entstanden sind und nicht horizontal übertragen wurden (PEDERSEN et al., 2009). Der Nachweis funktioneller Mutationen im S-Gen eines FIPV, welche ebenfalls für jede Katze einzigartig waren, bestätigte die Hypothese weiterhin (LICITRA et al., 2013).

Auch die Ergebnisse der bereits erwähnten Studie, die beide Hypothesen zur Pathogenese der FIP als plausibel erachtete, sprechen zum Teil für die *in-vivo*-Mutationshypothese (HORA et al., 2013). Mittels phylogenetischer Analyse zeigten die Autoren, dass die Nukleotidsequenzen des M-Gens von FECV und FIPV sich nicht in einer Weise aufspalteten, die für die Existenz verschiedener virulenter Stämme sprach (HORA et al., 2013).

1.2.1. Ausscheidung und Übertragung der feline Coronaviren

FECV kann in verschiedenen Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Rektum) infizierter Katzen nachgewiesen werden (PEDERSEN et al., 1981b; HERREWEGH et al., 1997; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010; VOGEL et al., 2010). Die Übertragung von Katze zu Katze erfolgt hauptsächlich auf fäkal-oralem Weg (PEDERSEN et al., 1981b; FOLEY et al., 1997b; PEDERSEN et al., 2008). FECV ist hochinfektiös (VOGEL et al., 2010); fast 100 % der Katzen mit Kontakt zu FECV infizieren sich (ADDIE & JARRETT, 1995; ADDIE et al., 2000). In Katzengruppen, in denen FECV endemisch ist, werden die Welpen meist ab der vierten bis sechsten Lebenswoche direkt durch ihre Mutter oder andere Katzen im Haushalt, die FECV mit dem Kot ausscheiden, infiziert (PEDERSEN et al., 1981b; ADDIE & JARRETT, 1990, 1992a; PEDERSEN et al., 2008). Sowohl infizierte klinisch gesunde als auch an FIP erkrankte Katzen können FECV ausscheiden und auf andere Katzen übertragen (ADDIE & JARRETT, 1992a; ADDIE et al., 1996; MELI et al., 2004). Vor allem gesunde chronisch infizierte Ausscheider spielen in der Epidemiologie eine zentrale Rolle und halten die Infektion innerhalb einer Katzenpopulation aufrecht (FOLEY et al., 1997a; HERREWEGH et al., 1997; MELI et al., 2004). Die Prävalenz ist besonders dann hoch, wenn viele Katzen auf engem Raum zusammen gehalten werden, zum Beispiel (z. B.) in Mehrkatzenhaushalten, Katzenschulen und Tierheimen (FOLEY et al., 1997b; ADDIE, 2000; CAVE et al., 2004; PEDERSEN et al., 2004).

Die Virusausscheidung mit dem Kot beginnt innerhalb der ersten Woche p. i. (bei experimentell mit FECV infizierten Katzen zum Teil (z. T.) bereits ab dem 1. Tag p. i.) (POLAND et al., 1996; MELI et al., 2004; PEDERSEN et al., 2008; VOGEL et al., 2010; DESMARETS et al., 2016) und erfolgt nach einem von drei unterschiedlichen Mustern: ein Teil der Katzen scheidet FECV dauerhaft und z. T. lebenslang aus; einige Katzen eliminieren die Infektion und scheiden kein FECV

mehr aus (können allerdings neu infiziert werden) und ein Teil der Katzen scheidet FECV intermittierend aus oder wird kontinuierlich reinfiziert (FOLEY et al., 1997a; ADDIE & JARRETT, 2001; ADDIE et al., 2003; PEDERSEN et al., 2008). Bei Welpen, welche sich auf natürlichem Wege durch ihre Mütter mit FECV infizieren, beginnt eine massive Virusausscheidung mit dem Kot ab etwa der 9. Lebenswoche (PEDERSEN et al., 2008). Junge Katzen scheiden generell eine größere Viruskonzentration aus als ältere Katzen (PEDERSEN et al., 2008). Immunsuppression, beispielsweise verursacht durch eine FIV-Infektion oder Infektion mit dem feline Leukämievirus (FeLV), kann zum Einen zur Ausscheidung von signifikant größeren Mengen an FECV (10 – 100-fach höhere Konzentration als bei nicht-immunsupprimierten Katzen) (POLAND et al., 1996; PEDERSEN et al., 2008), zum Anderen zu einer längeren Dauer der Virusausscheidung führen (POLAND et al., 1996). Die Höhe des Antikörper-Titers einer infizierten Katze korreliert i. d. R. mit der Konzentration des ausgeschiedenen FECV (ADDIE & JARRETT, 2001). Katzen, welche FECV mit dem Kot ausscheiden, haben meist signifikant höhere Antikörper-Titer, während Katzen mit niedrigen Antikörper-Titern häufiger kein FECV ausscheiden (PEDERSEN et al., 2008). Allerdings kann bei einigen Antikörper-positiven Katzen keine Virusausscheidung nachgewiesen werden (FOLEY et al., 1997a). Diese Katzen haben vermutlich die Infektion eliminiert, die Antikörper bleiben jedoch noch über längere Zeit bestehen. So scheidet nur etwa jede dritte Antikörper-positive Katze FECV mit dem Kot aus (ADDIE & JARRETT, 1992b). Auf der anderen Seite scheiden Katzen ohne FCoV-Antikörper meist kein FECV aus (ADDIE & JARRETT, 1992a). Dennoch ist Virusausscheidung mit dem Kot auch bei Katzen ohne Antikörper in seltenen Fällen möglich, solange die Virusreplikation auf den Darm der infizierten Katze beschränkt bleibt (HARPOLD et al., 1999; MELI et al., 2004).

FCoV bleiben in eingetrockneter Form in der Außenwelt bis zu sieben Wochen infektiös (SCOTT, 1988) und können auch indirekt, z. B. von Pflegepersonen und durch kontaminierte Katzenstreu, verbreitet werden und weitere Katzen infizieren (PEDERSEN et al., 1981b; HOSKINS, 1993). Auch die Ausscheidung von FCoV in Urin (HARDY & HURVITZ, 1971; PEDERSEN, 1987b; HORA et al., 2013) oder Speichel (STODDART et al., 1988a; STODDART et al., 1988b; ADDIE & JARRETT, 2001; DESMARETS et al., 2016) ist beschrieben. Die Ausscheidung

und mögliche Übertragung mit dem Speichel erfolgt vermutlich ausschließlich in der Frühphase der FECV-Infektion und spielt eine untergeordnete Rolle (ADDIE & JARRETT, 2001). Transplazentare Virusübertragung wurde in einem Fallbericht beschrieben (PASTORET & HENROTEAUX, 1978), ist aber selten (ADDIE & JARRETT, 1990; HOSKINS, 1993).

In der Regel scheiden FCoV-infizierte Katzen ab dem Zeitpunkt der Mutation und der Entwicklung klinischer Symptome einer FIP kein FECV mehr mit dem Kot aus (CHANG et al., 2010). Nach experimenteller oraler oder parenteraler Inokulation mit bereits mutiertem FIPV wurde Virus (nicht bekannt ob FECV oder FIPV) ab dem zweiten Tag p. i. in oropharyngealen Sekreten und im Kot nachgewiesen, vom 11. – 15. Tag p. i. an erfolgte jedoch keine oropharyngeale oder fäkale Ausscheidung mehr (STODDART et al., 1988a; STODDART et al., 1988b). Obwohl Katzen nach Mutation des FECV zum FIPV zunächst kein Virus mit dem Kot ausscheiden, kann aufgrund der bei FIP bestehenden Dysfunktion des Immunsystems eine Reinfektion der Katzen mit in der Umgebung vorhandenem FECV stattfinden (CHANG et al., 2010), sodass verschiedene FCoV, ob mit oder ohne Mutationen, innerhalb einer Katze nebeneinander vorkommen können (ADDIE et al., 2003; CHANG et al., 2010; LICITRA et al., 2013; PORTER et al., 2014) und FCoV mit und ohne verschiedene Mutationen auch im Kot an FIP erkrankter Katzen nachgewiesen wurden (ADDIE et al., 1996; HSIEH et al., 2013; PORTER et al., 2014; HORA et al., 2016). Eine Ausscheidung der mutierten FIPV mit dem Kot oder Urin ist allerdings extrem unwahrscheinlich, auch wenn vermutet wurde, dass dies potenziell bei Vorhandensein von Läsionen im Darm oder der Niere möglich ist (ADDIE et al., 2004b). FCoV mit mutiertem Nichtstrukturproteingen 3c, dessen Beteiligung an der Entstehung der FIP diskutiert wird, wurden im Kot oder Darm von an FIP erkrankten Katzen nachgewiesen. Sollte es sich bei FCoV mit Mutationen im 3c-Gen tatsächlich um FIPV handeln, so kann eine Ausscheidung von FIPV damit nicht ausgeschlossen werden (BANK-WOLF et al., 2014; HORA et al., 2016). Allerdings wird angenommen, dass ein intaktes 3c-Gen für die intestinale Replikation notwendig ist, und Virus-Stämme mit mutiertem 3c-Gen daher nicht infektiös für andere Katzen sind (CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012), wengleich kürzlich ein sich replizierendes FCoV mit trunkiertem 3c-Gen im Dickdarm einer Katze mit FIP nachgewiesen wurde (HORA et al., 2016). Weder

mit dem Kot ausgeschiedene FCoV mit intaktem noch FCoV mit mutiertem 3c-Gen führten aber nach oraler oder intraperitonealer Inokulation zur Entstehung einer FIP (PEDERSEN et al., 2012). Auch FIPV mit Mutationen im S-Gen, die im Zusammenhang mit einer systemischen Verbreitung der FCoV und der Entstehung von FIP diskutiert werden (CHANG et al., 2012; PORTER et al., 2014), wurden im Kot an FIP erkrankter Katzen nachgewiesen, was erneut die Frage nach einer horizontalen Übertragung von FIPV aufwarf (PORTER et al., 2014). Gleichwohl gibt es bislang keinen Nachweis, dass fäkal ausgeschiedene mutierte FCoV auch tatsächlich FIP bei anderen Katzen auslösen können (PEDERSEN et al., 2012).

1.2.2. Mögliche Mutationen

FCoV sind RNA-Viren mit insgesamt elf ORF (Abbildung 1). Am 5'-Ende des Genoms befinden sich ORF 1a und 1b, welche für zwei Polypeptide codieren, die in die virale RNA-Synthese involviert sind (virale Replikase). Vier ORF codieren für die Strukturproteine des FCoV: Spike (S), Nukleokapsid (N), Membran (M) und Hülle (envelope, E). ORF 3abc und ORF 7ab codieren für die akzessorischen Proteine 3a, 3b, 3c, 7a und 7b (DYE & SIDDELL, 2007; KIPAR & MELI, 2014). FCoV existieren als zwei verschiedene Serotypen, die sich anhand ihrer S-Proteine unterscheiden (PEDERSEN et al., 1984a; MOTOKAWA et al., 1996; SHIBA et al., 2007). FCoV vom Serotyp II sind aus einer Rekombination zwischen FCoV vom Serotyp I und caninem Coronavirus (CCV) entstanden (PEDERSEN et al., 1984a; HERREWEGH et al., 1998; SHIBA et al., 2007). FCoV vom Serotyp I, egal ob FECV oder FIPV, dominieren mit bis zu 98 % weltweit im Feld (PEDERSEN et al., 1984a; HOHDATSU et al., 1992; ADDIE et al., 2003; BENETKA et al., 2004; KUMMROW et al., 2005; SHIBA et al., 2007; LIN et al., 2009b). Sowohl Serotyp-I-FCoV als auch Serotyp-II-FCoV können mutieren und FIP auslösen (HOHDATSU et al., 1992; BENETKA et al., 2004; KUMMROW et al., 2005; SHIBA et al., 2007; LIN et al., 2009b). In einer Studie waren Serotyp-I-FCoV jedoch häufiger mit FIP assoziiert als Serotyp-II-FCoV (KUMMROW et al., 2005).

Die Replikation aller Coronaviren ist, wie die aller RNA-Viren, sehr fehleranfällig (DENISON et al., 2011). Während jedes Replikationszyklus von FCoV entstehen zahlreiche individuelle Mutationen (KISS et al., 2000; PEDERSEN, 2009; DESMARETS et al., 2016; HORA et al., 2016). Spezifische Mutationen des

FECV-Genoms in einer infizierten Katze führen zur Entwicklung des virulenten FIPV-Pathotyps (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998) und zur Veränderung des viralen Zelltropismus (ROTTIER et al., 2005).

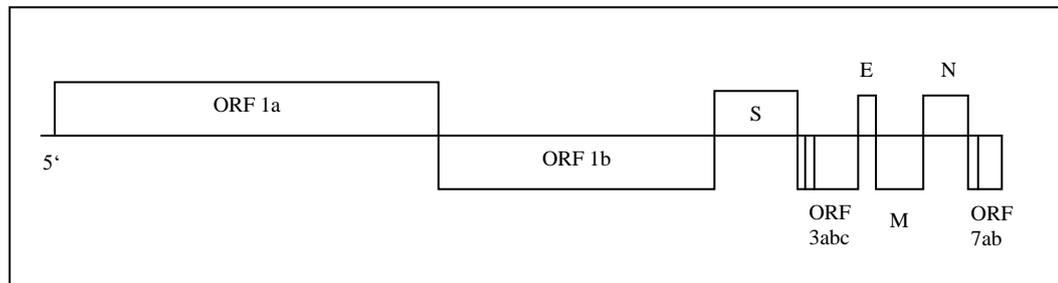


Abbildung 1: Genomische Organisation der feline Coronaviren (ORF: open reading frame (offener Leserahmen), S: Spike, E: envelope (Hülle), M: Membran, N: Nukleokapsid)

Das Auftreten von Mutationen wird umso wahrscheinlicher, je höher die Virusreplikationsrate ist (POLAND et al., 1996). Ist das Immunsystem bei jungen Katzen noch nicht voll entwickelt oder durch verschiedene Faktoren, wie Infektionen mit FIV oder FeLV, supprimiert (PEDERSEN, 1987a; POLAND et al., 1996), so kommt es zur Steigerung der FECV-Vermehrung im Darmepithel, und die Wahrscheinlichkeit einer Mutation wird größer (POLAND et al., 1996).

Die Suche nach der oder den zu FIP führenden Mutation(en) ist daher eine Herausforderung und Gegenstand zahlreicher aktueller Studien. Erste Vergleiche zwischen FECV und FIPV entdeckten Deletionen in den Nichtstrukturproteingenen 3c und 7a und im S-Gen der FIPV im Vergleich zu FECV (VENNEMA et al., 1998; KENNEDY et al., 2001). Auf der anderen Seite wurde jedoch gezeigt, dass Deletionen in den ORF 3abc und/oder ORF 7ab mit einem Verlust der Virulenz einhergehen (HERREWEGH et al., 1995b; HAIJEMA et al., 2004).

1.2.2.1. Spike-Gen

Das S-Protein der FCoV ist verantwortlich für die Aufnahme des Virus in die Wirtszellen. So beinhaltet es zum Einen eine Region zur Bindung an den Rezeptor (S1-Region), zum Anderen eine Untereinheit zur Vermittlung der Membranfusion (S2-Region) (BOSCH et al., 2003; HEALD-SARGENT & GALLAGHER, 2012). Aufgrund dieser Eigenschaften könnten Mutationen im S-Gen die Änderung des

Zell-Tropismus der FCoV erklären (ROTTIER et al., 2005; CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013). ROTTIER und Mitarbeiter (2005) gelangten zu der Annahme, dass ausschließlich die S2-Region für den Tropismus der FIPV für Monozyten/Makrophagen verantwortlich ist. Wurden bei rekombinanten FIPV entweder ORF 1ab, die ORF 3a bis N oder ORF 7b durch das jeweilige Gegenstück eines FECV ersetzt, so infizierten diese Makrophagen so effizient wie das Ursprungs-FIPV. Nur ein Austausch der S2-Region des FIPV durch die S2-Region eines FECV führte zu erheblicher Reduktion der Replikation in Makrophagen. Die Nichtstrukturproteine und die S1-Region spielen daher keine Rolle bei der Replikation in Monozyten/Makrophagen (ROTTIER et al., 2005).

In einer Sequenzanalyse von elf FECV und elf FIPV wurden zwar Mutationen verteilt über das gesamte Genom festgestellt, eine besondere Häufung an Mutationen wurde jedoch im S-Gen beobachtet (CHANG et al., 2012). In einer folgenden genaueren Analyse der S-Gen-Region von 183 FECV und 118 FIPV wurden Punktmutationen an zwei eng benachbarten Nukleotidpositionen (23531 und 23537) bei FIPV nachgewiesen, die bei keinem der sequenzierten FECV zu finden waren. Der Nachweis einer Mutation an einer der beiden Nukleotidpositionen erlaubte die Unterscheidung von FIPV und FECV in > 95 % der untersuchten Viren. Bei ausnahmslos allen sequenzierten FECV befand sich an Position 23531 Adenin, bei 92 % der FIPV wurde Thymin oder Cytosin nachgewiesen. Beide Mutationen führten zu einer Aminosäure-Substitution an der Position 1058 des S-Proteins (Leucin statt Methionin; M1058L). An Position 23537 befand sich bei allen FECV Thymin, 4 % der FIPV wiesen Guanin auf. Diese Punktmutation führte zu einer Sequenz-Änderung an Position 1060 des S-Proteins (Alanin statt Serin; S1060A) (CHANG et al., 2012). Während in dieser Studie Mutationen tatsächlich nur bei Katzen mit FIP nachgewiesen wurden (CHANG et al., 2012), konnte die Substitution M1058L in einer anderen Studie allerdings auch im Gewebe von Katzen mit anderen Erkrankungen als FIP nachgewiesen werden. Die Mutation war nach den Ergebnissen dieser Studie also nicht spezifisch für den FIP-Phänotyp (PORTER et al., 2014). Sowohl die Mehrzahl der Gewebeproben von Katzen mit FIP (39/43; 91 %) als auch die Mehrzahl der Gewebeproben der Kontroll-Katzen (8/9; 89 %) enthielt Leucin an Position 1058, die Mehrzahl der Kotproben von Katzen mit (10/13; 77 %) und ohne FIP (6/6; 100 %) enthielt jedoch keine Mutationen. Zudem konnte auch bei

einem Anteil der Gewebeproben von Katzen mit FIP (4/43; 9 %) Methionin an Position 1058 gefunden werden. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass die Substitution M1058L nicht ein Marker für FIP, sondern eher für die systemische Verbreitung der FCoV sei (PORTER et al., 2014). Bei einer von fünf Gewebeproben von Katzen mit FIP, die die Substitution M1058L nicht enthielten, kam stattdessen die zweite von CHANG und Mitarbeitern (2012) beschriebene Substitution S1060A vor (PORTER et al., 2014). BANK-WOLF und Mitarbeiter (2014) untersuchten ebenfalls die S2-Region der Genome von FECV und FIPV und entdeckten die Substitution M1058L in fünf von sechs FIPV aus dem Aszites von an FIP erkrankten Katzen. Neun von zehn FECV aus dem Kot gesunder Katzen und drei von sieben FECV aus dem Kot von an FIP erkrankten Katzen enthielten ein Methionin (also eine nicht mutierte Sequenz) an dieser Position. Die Autoren fanden einen zweiten Hotspot an der Aminosäureposition 1108. Ein Aspartat-Rest, der bei allen sequenzierten FECV gefunden wurde, war bei fünf FIPV durch Tyrosin ersetzt (BANK-WOLF et al., 2014).

Funktionelle Mutationen wurden auch in einer Region zwischen S1 und S2 in einem Furin-Spaltmotiv bei FIPV von Katzen mit FIP nachgewiesen (LICITRA et al., 2013). Furin, eine ubiquitär vorkommende Proprotein-Konvertase, ist für die posttranslationelle Spaltung und damit Aktivierung inaktiver Proproteine zuständig (THOMAS, 2002). Nachdem zunächst vermutet wurde, dass die S-Proteine der FCoV, anders als die der Coronaviren anderer Spezies, keiner Spaltung bedürfen, konnte schließlich doch ein funktionelles Spaltmotiv im Grenzgebiet zwischen S1 und S2 gefunden werden (DE HAAN et al., 2008). Mutationen in diesem Bereich verändern daher möglicherweise die proteolytische Spaltbarkeit des S-Proteins und erlauben damit die Spaltung durch Makrophagen-spezifische Proteasen (z. B. Matrix-Metalloproteasen, Cathepsin B) und dadurch wiederum eine Steigerung der Virusaufnahme in Makrophagen (LICITRA et al., 2013). Ausnahmslos alle untersuchten FECV bei nicht an FIP erkrankten Katzen wiesen die Konsensus-Sequenz des Furin-Spaltmotivs auf, die daher vermutlich für die Replikation in Enterozyten unerlässlich ist (LICITRA et al., 2013). Die S1/S2-Spaltregion bei FIPV von Katzen mit FIP zeigte hingegen eine deutlich größere Variabilität. Mutationen in dieser Region korrelierten stark mit dem FIP-Phänotyp. So waren 10/12 Katzen, deren FCoV-Spaltregion mindestens eine Mutation enthielt, an FIP erkrankt, während nur 2/12 dieser Katzen

asymptomatisch infiziert waren. Zwei Katzen aus einem gemeinsamen Haushalt wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Bei der ersten Probenentnahme waren beide Katzen asymptomatisch und schieden FCoV mit dem Kot aus, deren S1/S2-Region die Konsensus-Sequenz beinhaltete. Zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme wurde bei einer der Katzen FIP diagnostiziert. Von dieser Katze isoliertes FCoV hatte eine Mutation in der S1/S2-Region, während die zweite Katze, die noch immer asymptomatisch war, weiterhin FCoV mit intaktem Spaltnmotiv mit dem Kot ausschied. Mutationen des S1/S2-Furin-Spaltnmotivs standen also in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung von FIP (LICITRA et al., 2013). Eine aktuelle Studie schließlich, die eine komplette Genomanalyse verschiedener FCoV durchführte, bestätigte zum Einen die bereits von CHANG und Mitarbeitern (2012) gefundene diskriminierende Substitution M1058L; zum Anderen beschrieben die Autoren eine Substitution von Threonin statt Isoleucin in der S2-Region des S-Proteins, die ebenfalls eine Unterscheidung zwischen FCoV aus dem Gewebe von an FIP erkrankten Katzen und FCoV aus dem Kot gesunder Katzen ermöglichte (LEWIS et al., 2015).

1.2.2.2. Open reading frame 3abc

Eine Beteiligung von Mutationen im ORF 3abc an der Pathogenese der FIP wird seit einigen Jahren diskutiert. ORF 3abc besteht aus den drei Genen 3a, 3b und 3c, die für die entsprechenden Nichtstrukturproteine codieren (DYE & SIDDELL, 2007; KIPAR & MELI, 2014).

Bei Vergleichen zwischen FECV und FIPV wurden Mutationen im akzessorischen Protein 3c gefunden: FCoV aus Gewebe oder Erguss von Katzen mit FIP enthielten Mutationen im 3c-Gen, die zur Trunkierung des 3c-Proteins führten (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; HSIEH et al., 2013; BANK-WOLF et al., 2014; BORSCHENSKY & REINACHER, 2014; HORA et al., 2016), während FCoV aus dem Kot von Katzen mit FIP oder gesunden FCoV-infizierten Katzen meist ein intaktes 3c-Gen aufwiesen (PEDERSEN et al., 2009; HSIEH et al., 2013; BANK-WOLF et al., 2014; HORA et al., 2016). Es wurde zudem gezeigt, dass FCoV mit trunkiertem 3c-Gen nach experimenteller Infektion FIP verursachen können (PEDERSEN et al., 2009). Zwei Studien konnten sogar bei allen sequenzierten fäkalen FCoV ein intaktes 3c-Gen nachweisen und kamen zu dem Schluss, dass ein intaktes 3c-Gen

für die Replikation im Darmepithel entscheidend sei (CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012). Allerdings wurde auch replizierendes FCoV mit trunkiertem 3c-Gen im Dickdarm einer Katze mit FIP gefunden (HORA et al., 2016). Da jedoch auch FIP-auslösende FCoV mit intakten 3c-Genen gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass 3c-Gen-Mutationen zwar an der Pathogenese der FIP mitbeteiligt, aber nicht allein ausschlaggebend für die Entstehung der Krankheit sind (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; BANK-WOLF et al., 2014; BORSCHENSKY & REINACHER, 2014). Ein Zusammenspiel mit Mutationen im S-Gen (BANK-WOLF et al., 2014) oder auch mit einer vorliegenden Immunsuppression wird diskutiert (BORSCHENSKY & REINACHER, 2014). Die Untersuchung eines FCoV mit trunkiertem ORF 3abc, das, im Gegensatz zu einem rekombinanten FCoV-Gegenstück mit intaktem ORF 3abc, effizient in isolierten felines Monozyten replizieren konnte und bei experimentell infizierten Katzen FIP verursachte, legte nahe, dass auch Mutationen im ORF 3abc eine Rolle in der Entstehung eines FIP-verursachenden FCoV und im viralen Zelltropismus spielen (BALINT et al., 2012; BALINT et al., 2014). Dies wurde in einer weiteren Studie bestätigt und auf das 3c-Protein eingegrenzt, indem zunächst Zellkulturen mit Vektoren transfiziert wurden, die intaktes FCoV-3c-Protein enthielten. Nach Infektion dieser Zellkulturen mit einem FCoV mit trunkiertem 3c-Protein kam es letztlich in den transfizierten Zellkulturen zu geringerer viraler Replikation als in den nicht transfizierten. Daraus wurde geschlossen, dass ein intaktes 3c-Protein die virale Replikation hemmt und dadurch die Virulenz der FCoV abschwächt (HSIEH et al., 2013). Mindestens eines der akzessorischen Proteine 3a und/oder 3b müssen jedoch intakt sein, um eine optimale Replikation in Monozyten zu gewährleisten (DEDEURWAERDER et al., 2013).

1.2.2.3. Open reading frame 7ab

Auch ORF 7ab war Gegenstand mehrerer Studien zur Pathogenese der FIP. Zwar wurde einerseits gezeigt, dass Deletionen im 7b-Gen zu Schwächung der Virulenz führten (mit Deletions-Mutanten infizierte Katzen entwickelten im Vergleich zu mit dem ursprünglichen Virus infizierten Katzen keine klinischen Symptome einer FIP) (HERREWEGH et al., 1995b; HAIJEMA et al., 2004; TAKANO et al., 2011b). Andererseits waren im 7b-Gen mutierte FCoV aber dennoch in der Lage, Makrophagen effektiv zu infizieren (ROTTIER et al., 2005; TAKANO et al.,

2011b). Im Gegensatz dazu zeigten in einer anderen Studie genetisch modifizierte FCoV, denen der komplette ORF 7ab fehlte, nur kurzfristig die Fähigkeit zur Replikation (DEDEURWAERDER et al., 2013). Vermutlich spielt das Protein 7a hier die entscheidende Rolle: es agiert mit der Interferon (IFN)-vermittelten antiviralen Immunantwort infizierter Wirtszellen, führt dadurch zu einer Hemmung dieser zellulären Abwehrmechanismen und ermöglicht eine bessere virale Replikation. Die Vermehrung der FCoV ohne intaktes Protein 7a hingegen wird nach kurzer Zeit durch die zelluläre Abwehr gehemmt. Die IFN-antagonistische Wirkung von Protein 7a war nur in Anwesenheit der ORF 3abc-codierten Proteine vorhanden (DEDEURWAERDER et al., 2013; DEDEURWAERDER et al., 2014). Durch Sequenzierung verschiedener FCoV-Genome von Katzen mit und ohne FIP wurden aber nur geringe Unterschiede im ORF 7ab gefunden. So wiesen mit Ausnahme eines FCoV alle untersuchten Viren von Katzen mit FIP intakte 7a- und 7b-Gene auf (BANK-WOLF et al., 2014). Auch KENNEDY und Mitarbeiter (2001) und HERREWEGH und Mitarbeiter (1995b) fanden bei allen untersuchten Feldstämmen bei gesunden Katzen und Katzen mit FIP intakte 7b-Gene. LIN und Mitarbeiter (2009a) entdeckten zwar Deletionen in den 7b-Genen einiger untersuchter FCoV von Katzen mit FIP; diese resultierten jedoch nicht in einem Wechsel des Leserahmens und beeinträchtigten damit die Funktion des 7b-Proteins sehr wahrscheinlich nicht. Da Deletionen im 7b-Gen nicht regelmäßig im Genom von FCoV bei Katzen mit FIP gefunden werden können, wird angenommen, dass diese Mutationen nicht die alleinigen bestimmenden Faktoren für den jeweiligen Pathotyp des FCoV sein können (BORSCHENSKY & REINACHER, 2014).

1.2.3. Tropismus und Replikation der feline Coronaviren

FECV zeigen eine starke Affinität für das apikale Zylinderepithel im Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon. Hier findet nach der fäkal-oralen Übertragung hauptsächlich die Virusvermehrung statt (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984a; KIPAR et al., 2010). Während der akuten Infektion kommt es vor allem (v. a.) zur Infektion des Darmes vom Duodenum bis zum Zäkum (PEDERSEN et al., 1981b; KIPAR et al., 2010). In chronisch FECV-infizierten Katzen wurden Kolon und Rektum als Haupt-Lokalisationen identifiziert (HERREWEGH et al., 1997; KIPAR et al., 2010; VOGEL et al., 2010), in einer Studie war jedoch der gesamte Darm betroffen (MELI et al., 2004). Mögliche

Läsionen sind eine Atrophie oder Verschmelzung der Darmzotten und die Trennung des Zylinderepithels vom oberen Anteil der Darmzotten im Duodenum, Jejunum und Ileum (PEDERSEN et al., 1981b). In der Vergangenheit wurde angenommen, dass FECV ausschließlich in Enterozyten replizieren und den Gastrointestinaltrakt nicht verlassen (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984b), während FIPV nach ihrer Entstehung Monozyten/Makrophagen infizieren, in ihnen replizieren und über die Blutbahn systemisch verbreitet werden (WEISS & SCOTT, 1981a; STODDART & SCOTT, 1989). Im Laufe der Zeit wurde jedoch deutlich, dass auch FECV Monozyten/Makrophagen infizieren können und es in der Folge auch bei klinisch gesunden FECV-infizierten Katzen zu einer Monozyten-assoziierten Virämie kommen kann (GUNN-MOORE et al., 1998b; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006a; KIPAR et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; FISH et al., 2017). Nach oraler Inokulation wurde FECV drei bis sieben Tage p. i. im Blut nachgewiesen (POLAND et al., 1996; DESMARETS et al., 2016). Auch umgekehrt kann FECV nach intraperitonealer Infektion über eine Virämie den Gastrointestinaltrakt erreichen und mit dem Kot ausgeschieden werden (PEDERSEN et al., 2012). Zudem konnten FCoV in Makrophagen auch im Gewebe gesunder, nicht-virämischer Virus-Carrier nachgewiesen werden, ohne dass eine FIP entstand (KIPAR et al., 2010). Natürlich und experimentell oral mit FECV infizierte klinisch gesunde Katzen beherbergen FCoV-RNA in Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Rektum, mesenterialen Lymphknoten, Leber, Milz, Niere, Thymus, Lunge, Tonsillen, Speicheldrüsen, Knochenmark, Haut, Skelettmuskulatur und Gehirn (HERREWEGH et al., 1997; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010).

Möglicherweise finden die zu FIP führenden Mutationen nicht, wie bisher angenommen, in Enterozyten, sondern in Monozyten/Makrophagen statt, indem FECV aus dem Darmepithel über Monozyten/Makrophagen in die regionären Lymphknoten und schließlich in die Blutzirkulation gelangt (PEDERSEN et al., 2012). Mittels Nachweis von Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) des M-Proteins der FCoV durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte gezeigt werden, dass virale Replikation auch im Blut klinisch gesunder infizierter Katzen stattfindet, dass also auch FECV in Monozyten replizieren können (SIMONS et al., 2005; CAN-SAHNA et al., 2007; SHARIF et al., 2011; FISH et al., 2017). Katzen mit FIP weisen allerdings eine höhere Viruslast auf, und die FCoV der Katzen mit FIP

zeigen höhere Replikationsraten (KIPAR et al., 2006a; HORNYAK et al., 2012; PORTER et al., 2014). Zudem sind nur FIPV in der Lage, die Replikation über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten und die Infektion effizient auf weitere Makrophagen zu verbreiten (STODDART & SCOTT, 1989; DEWERCHIN et al., 2005).

Bereits 1976 wurde beobachtet, dass die Replikation der FIPV ausschließlich in Makrophagen-ähnlichen Zellen stattfindet (PEDERSEN, 1976b). Makrophagen/Monozyten sind damit die Ziel- und Trägerzellen der FIPV-Infektion (WEISS & SCOTT, 1981a, 1981b; STODDART & SCOTT, 1989; KIPAR et al., 1998a; KIPAR et al., 2005; CORNELISSEN et al., 2007; PEDERSEN et al., 2015). FECV sind zwar genauso wie FIPV in der Lage, Monozyten/Makrophagen zu infizieren und in ihnen zu replizieren, allerdings wird die Replikation nicht aufrechterhalten und weniger Virus produziert (DEWERCHIN et al., 2005). In experimentellen *in-vitro*-Studien mit Peritoneal-Makrophagen und dem Knochenmark entstammenden Makrophagen infizierten FECV weniger Makrophagen als FIPV und waren nicht in der Lage, die Infektion auf benachbarte Zellen auszubreiten (STODDART & SCOTT, 1989; ROTTIER et al., 2005). Dennoch ist auch die Replikation von FIPV auf einen kleinen Anteil an Makrophagen und Monozyten beschränkt, da einige Zellen eine natürliche Resistenz zu zeigen scheinen (STODDART & SCOTT, 1989; DEWERCHIN et al., 2005; VAN HAMME et al., 2007).

Das S-Protein der FCoV ist verantwortlich für den Eintritt in die Wirtszelle; es bestimmt die normalerweise strenge Spezies-Spezifität und ist verantwortlich für den Tropismus für die jeweilige Zielzelle (KUO et al., 2000; CASAIS et al., 2003; HAIJEMA et al., 2003). Im S-Protein der FCoV ist die S2-Region für die Membranfusion zuständig und ist somit, wie zuvor beschrieben, verantwortlich für den Tropismus der FIPV für Makrophagen und die Fähigkeit, effizient in diesen zu replizieren (ROTTIER et al., 2005). Sowohl FECV als auch FIPV vom Serotyp II nutzen feline Aminopeptidase N (fAPN) als Rezeptor zum Eintritt in Makrophagen; der Rezeptor für Serotyp-I-FCoV ist bislang unbekannt (TRESNAN et al., 1996; HOHDATSU et al., 1998a; ROTTIER et al., 2005; DYE & SIDDELL, 2007; TEKES et al., 2010). Die Unterschiede im Zell-Tropismus von FECV und FIPV werden folglich nicht durch Veränderungen der Region für Rezeptor-Bindung (S1) vermittelt (ROTTIER et al., 2005). Funktionelle

Mutationen in der S1/S2-Region des S-Gens führen möglicherweise zur Spaltung des normalerweise durch Furin aktivierten S-Proteins durch Makrophagen-spezifische Proteasen (z. B. Matrix-Metalloproteasen, Cathepsin B) und zu Steigerung der Virusaufnahme in Makrophagen (LICITRA et al., 2013). Die Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) ist hierbei von besonderem Interesse, da sie in aktivierten Monozyten/Makrophagen bei FIP exprimiert wird (KIPAR et al., 2005; LICITRA et al., 2013).

Im Laufe der Entstehung einer FIP kommt es zu mehreren wiederkehrenden Phasen gesteigerter viraler Replikation, die mit Fieber, Gewichtsverlust und T-Zell-Depletion einhergehen. In früheren Studien wurden Episoden von Krankheitssymptomen beschrieben, welche mit einer Steigerung der Menge an Virus im Blut einhergehen. Es wurde postuliert, dass die Zunahme der Viruslast im Blut, welche insbesondere im Endstadium einer FIP zu beobachten ist, darauf hindeutet, dass es im Laufe der Erkrankung zum Verlust der Immunabwehr und dadurch zu unkontrollierter Virusvermehrung kommt (DE GROOT-MIJNES et al., 2005). Experimentell mit FIPV infizierte Katzen zeigen zudem eine biphasische akute-Phase-Reaktion (STODDART et al., 1988b). Eine neuere Studie konnte allerdings bei keiner von 20 experimentell mit FIPV infizierten Katzen FCoV-RNA im Vollblut, Plasma oder der Leukozytenfraktion nachweisen (PEDERSEN et al., 2015).

1.2.4. Entstehung immun-mediierter Veränderungen

Die für FIP typischen pathologischen Veränderungen sind proteinreiche Körperhöhlenergüsse mit fibrinöser und granulomatöser Serositis und/oder multifokale pyogranulomatöse Veränderungen in verschiedenen Organen, wie Augen, Epiglottis, Leber, Leptomeningen, Lunge, Lymphknoten, Magen, Milz, Myokard, Nieren, Omentum, Ösophagus, Pankreas, Pleura und Thymus (WOLFE & GRIESEMER, 1971; MONTALI & STRANDBERG, 1972; HAYASHI et al., 1977; HAYASHI et al., 1980; WEISS & SCOTT, 1981b; KIPAR et al., 1998a; PALTRINIERI et al., 1998a; KIPAR et al., 2005). Im Zentrum steht eine granulomatöse Vaskulitis und Perivaskulitis (MONTALI & STRANDBERG, 1972; HAYASHI et al., 1977; WEISS et al., 1980; KIPAR et al., 2005). Histopathologisch sind vier Arten von Läsionen beschrieben: diffuse Veränderungen auf serösen Oberflächen, granulomartige Veränderungen mit und ohne Nekrose, fokale und perivaskuläre B-Zell- und Plasmazell-Infiltrate und eine

granulomatöse bis nekrotisierende Phlebitis (KIPAR et al., 1998a).

Eine Immunpathogenese der FIP wird schon lange diskutiert (HORZINEK & OSTERHAUS, 1978; HORZINEK & OSTERHAUS, 1979a; PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS et al., 1980; WEISS & SCOTT, 1981a, 1981b, 1981c; PEDERSEN & BLACK, 1983). Zur Entstehung der für FIP typischen immunmedierten Veränderungen existieren mehrere Theorien, welche im Folgenden erläutert werden.

1.2.4.1. Rolle von aktivierten Monozyten/Makrophagen

Aktivierte Monozyten/Makrophagen und von ihnen produzierte Zytokine und Botenstoffe spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der für FIP typischen granulomatösen Vaskulitis (KIPAR et al., 2005; KIPAR et al., 2006b; TAKANO et al., 2007a; TAKANO et al., 2007b; TAKANO et al., 2009a; TAKANO et al., 2009b; TAKANO et al., 2011a). Während der Entwicklung der FIP erfahren infizierte Katzen Phasen einer Monozyten-assoziierten Virämie (KIPAR et al., 2005). Vermutlich kommt es zu mehreren solcher Phasen und während jeder dieser Phasen mit umfangreicher viraler Replikation (DE GROOT-MIJNES et al., 2005; HORNYAK et al., 2012) zur Entstehung neuer Läsionen (KIPAR et al., 1998a; KIPAR & MELI, 2014). Eine Vielzahl an Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-1 β und IL-6, sind in Katzen mit FIP überexprimiert (GOITSUKA et al., 1990; FOLEY et al., 2003; KISS et al., 2004; KIPAR et al., 2005; TAKANO et al., 2007a; TAKANO et al., 2007b; TAKANO et al., 2009b) und tragen zur Entstehung der Läsionen bei (FOLEY et al., 2003). Es ist bekannt, dass FIPV zur Aktivierung des Signalweges der p38-Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) führt, wodurch die Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-1 β) reguliert wird (KUMAR et al., 2003; REGAN et al., 2009). Aktivierte infizierte Monozyten/Makrophagen produzieren zum Einen diese Zytokine (KIPAR et al., 2005; TAKANO et al., 2007a; TAKANO et al., 2007b; TAKANO et al., 2009b), zum Anderen Adhäsionsmoleküle, die eine Interaktion mit den ebenfalls aktivierten Endothelzellen erlauben (KIPAR et al., 2005). Replizierende FIPV in aktivierten Makrophagen führen außerdem über pro-inflammatorische Zytokine zur Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle in betroffenen Venen (ACAR et al., 2016). TNF- α wirkt seinerseits auf Makrophagen und führt zu Steigerung der Expression von fAPN, einem Rezeptor für FCoV (TAKANO et al., 2007b) und zu

Verlängerung der Überlebensdauer neutrophiler Granulozyten, die zur Entzündungsreaktion und Entwicklung pyogranulomatöser Veränderungen beitragen (TAKANO et al., 2009b). IL-6 fördert die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (TAKANO et al., 2009a). Weiterhin tragen B- und T-Lymphozyten und Granulozyten zur Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen bei (OLYSLAEGERS et al., 2013). Aktivierte infizierte Monozyten/Makrophagen produzieren zusätzlich Enzyme, wie MMP-9, welche zu Spaltung von Kollagen IV, zu Auflösung der vaskulären Basalmembran und damit zu Erhöhung der vaskulären Permeabilität führen (KIPAR et al., 2005). Zusätzlich werden Granulozyten- und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren (G-CSF und GM-CSF) (TAKANO et al., 2009b), andere B-Zell-differenzierende Faktoren (TAKANO et al., 2009a) und vascular endothelial growth factor (VEGF) (TAKANO et al., 2011a) produziert. VEGF vermittelt vaskuläre Permeabilität; die Konzentration an VEGF korreliert mit der Menge an Erguss in einer an FIP erkrankten Katze (TAKANO et al., 2011a). Möglicherweise ist auch TNF- α selbst an der Entstehung der erhöhten vaskulären Permeabilität mitbeteiligt (TAKANO et al., 2011a).

FCoV-infizierte Katzen ohne FIP zeigen eine signifikant höhere Produktion von IL-10 in der Milz, eine geringere Produktion von IL-6, G-CSF und Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) in mesenterialen Lymphknoten und generell eine höhere Produktion von IL-12 in lymphatischem Gewebe als Katzen mit FIP (KIPAR et al., 2006b). Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von experimentell mit FIPV infizierten Katzen wiesen eine reduzierte Expression von IL-10 und IL-12 auf (GUNN-MOORE et al., 1998a). Eine effektive Immunantwort in Verbindung mit einer IL-10-vermittelten reduzierten Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und einer erhöhten Zell-medierten Zytotoxizität scheint eine gewisse Kontrolle der FCoV-Infektion zu ermöglichen, während das Fehlen von IL-12 zu reduzierter Immunantwort und vermehrter Aktivierung von Monozyten/Makrophagen führt (KIPAR et al., 2006b).

Dies alles spricht dafür, dass aktivierte Monozyten/Makrophagen die Schlüsselrolle in der Pathogenese der FIP spielen (KIPAR et al., 2005). Noch ist jedoch unklar, welche Faktoren letztlich zur Aktivierung der Monozyten/Makrophagen beitragen.

1.2.4.2. Rolle der humoralen Immunität

Spezifische Antikörper gegen FCoV sind nicht protektiv und ihr Vorhandensein führte in experimentellen Studien sogar zu einem rascheren und schwereren Verlauf der FIP (antibody-dependent enhancement) (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979a; PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS & SCOTT, 1981c; PEDERSEN & BLACK, 1983; PEDERSEN et al., 1984a; VENNEMA et al., 1990; HOHDATSU et al., 1998b; TAKANO et al., 2008).

Zudem scheinen FIPV einen Mechanismus entwickelt zu haben, um einer Antikörper-vermittelten Immunreaktion zu entgehen. Bei anderen viralen Erkrankungen kommt es nach der viralen Infektion einer Zelle zur Antigen-Präsentation auf der Zelloberfläche, zur Bindung spezifischer Antikörper und schließlich zur Komplement-vermittelten Zerstörung der infizierten Zelle durch das Immunsystem (OLDSTONE & LAMPERT, 1979; SISSONS & OLDSTONE, 1980). *In-vitro*-FIPV-infizierte Zellen hingegen präsentierten virales Antigen nur unregelmäßig auf ihrer Zelloberfläche (DEWERCHIN et al., 2005). Zellen, die aus Läsionen von Katzen mit FIP isoliert wurden, präsentierten sogar überhaupt kein Antigen (CORNELISSEN et al., 2007), sodass davon auszugehen ist, dass sie vor der Antikörper-mediierten Zell-Lyse durch das Immunsystem geschützt sind (CORNELISSEN et al., 2009). Zusätzlich zeigten *in-vitro*-Studien, dass es in Anwesenheit spezifischer anti-FCoV-Antikörper rasch zur Internalisierung von eventuell präsentiertem Antigen in die FIPV-infizierten Monozyten kam (DEWERCHIN et al., 2006; DEWERCHIN et al., 2008). Überraschenderweise waren aber auch teils FCoV-infizierte Zellen mit Antigen-Präsentation auf der Zelloberfläche vor immun-mediiertes Zell-Lyse geschützt (CORNELISSEN et al., 2009).

Die Beteiligung von Immunkomplexen aus freiem FCoV-Antigen und zirkulierenden anti-FCoV-Antikörpern, die im Überschuss vorhanden sind, an der Entstehung der Vaskulitis bei FIP wird von vielen Autoren diskutiert. Die Autoren erachten diese früher als „Hypersensitivitätsreaktion vom Typ III“ bezeichnete Immunreaktion als ursächlich für die immun-mediierten Veränderungen im Rahmen einer FIP. Hierbei kommt es nach der Ablagerung von Immunkomplexen im Gewebe betroffener Katzen zur Anlagerung von Komplement, daraufhin zur Phagozytose dieser Komplexe und schließlich zur Ausschüttung verschiedener Stoffe, wie Proteasen, Kollagenasen, Elastasen und Permeabilitätsfaktoren,

welche zur Vaskulitis führen (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979a; JACOBSE-GEELS et al., 1980; PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS et al., 1980; WEISS & SCOTT, 1981b, 1981c; JACOBSE-GEELS et al., 1982; PALTRINIERI et al., 1998a). Der Nachweis von FIPV-spezifischen Immunkomplexen sowie erhöhten Konzentrationen an γ -Globulinen und Komplementfaktor C3 (C3) im Blut und in den Nieren-Glomeruli von an FIP erkrankten Katzen spricht für die Hypothese der Beteiligung von Immunkomplexen (JACOBSE-GEELS et al., 1980, 1982; PALTRINIERI et al., 1998a). Auch konnte in durch FIP verursachten granulomatösen Veränderungen zellfreies Fibrinogen und C3, in mononukleären Zellen neben viralem Antigen auch Immunglobulin G (IgG) und C3 nachgewiesen werden; dies spricht ebenfalls für eine „Typ-III-Reaktion“ (PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS et al., 1980; WEISS & SCOTT, 1981c).

In fokalen Läsionen ersetzen B-Zellen im Verlauf der Erkrankung Makrophagen und stellen dann die vorherrschende Zellpopulation dar (KIPAR et al., 1998a). Sie differenzieren sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und halten so entzündliche Prozesse aufrecht (KIPAR et al., 1998a). Diese Plasmazellen und B-Zellen, die im Verlauf der FIP vermehrt am Rand der granulomatösen Veränderungen und der Vaskulitis zu finden sind, produzieren spezifische Antikörper (KIPAR et al., 1998a), welche an virales Antigen binden und über die Komplementkaskade und die Aktivierung von fragment-crystalline-Rezeptoren (Fc-Rezeptoren) zur Erhöhung der Phagozytose-Aktivität der Makrophagen führen. Dies resultiert in einer Steigerung der Virusaufnahme in neue Makrophagen (PEDERSEN & BOYLE, 1980; JACOBSE-GEELS et al., 1982; KIPAR et al., 2005). Zusätzlich kommt es zur Erhöhung der Produktion von Komplementfaktoren in Makrophagen, zur Antikörper-vermittelten Lyse der Makrophagen und damit zu einer starken Entzündungsreaktion (JACOBSE-GEELS et al., 1982; JACOBSE-GEELS & HORZINEK, 1983; KIPAR et al., 2005). Nach der Anlagerung von aus FCoV und spezifischen Antikörpern bestehenden Immunkomplexen an Gefäßwände kommt es zur Bindung von Komplementfaktoren, zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und letztlich zur Schädigung der Gefäßwand mit erhöhter vaskulärer Permeabilität mit Austritt von Flüssigkeit sowie zur Entstehung einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS et al., 1980; JACOBSE-GEELS et al., 1982; WAGNER, 2006).

Die Merkmale der typischen Vaskulitis bei FIP entsprechen jedoch nicht denen einer klassischen Immunkomplex-Vaskulitis (KIPAR et al., 2005). Zum Einen sind keine Arterien, sondern hauptsächlich die kleinen und mittelgroßen Venen betroffen und dies v. a. in den Leptomeningen, der Nierenrinde und den Augen, weniger häufig in Lunge und Leber (KIPAR et al., 2005). Zum Anderen stellen neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten nur eine Minderheit unter den beteiligten Entzündungszellen dar (KIPAR et al., 1998a; KIPAR et al., 2005). Außerdem können zirkulierende Immunkomplexe auch bei nicht an FIP erkrankten Katzen nachgewiesen werden (KIPAR et al., 1999; MELI et al., 2004). KIPAR und Mitarbeiter (2005) erachten eine „Typ-III-Hypersensitivitätsreaktion“ daher nicht als essentiell für die Entstehung der immun-medierten Vaskulitis, halten eine Beteiligung von Immunkomplexen am Krankheitsgeschehen allerdings für möglich.

1.2.4.3. Rolle der zellulären Immunität

Andere Autoren ziehen eine überschießende zelluläre Immunität als Ursache für die granulomatösen Veränderungen bei FIP in Betracht (PALTRINIERI et al., 1998a; PALTRINIERI et al., 1998b). Diese wird auch „Typ-IV-Reaktion“ oder „verzögerte oder Zell-medierte Reaktion“ genannt. Es kommt hierbei nach einem antigenen Stimulus zur Aktivierung von T-Zellen und zu einer anschließenden Entzündungsreaktion durch Aktivierung von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten oder zytotoxischen Mechanismen (WAGNER, 2006). In fokalen Granulomen von Katzen mit FIP wurden die bei einer „Typ-IV-Reaktion“ vorherrschenden Zellen, T-Lymphozyten (v. a. CD4⁺), Granulozyten und Makrophagen, um kleine Blutgefäße herum gefunden (PALTRINIERI et al., 1998a; PALTRINIERI et al., 1998b). Auch ein Zusammenspiel von Immunkomplexen bei der Entstehung der Vaskulitis und überschießender zellulärer Immunität bei der Entstehung der granulomatösen Veränderungen wird diskutiert (PALTRINIERI et al., 1998a; PALTRINIERI et al., 1998b; BERG et al., 2005).

FIPV ist ein intrazelluläres Pathogen, das sich in Makrophagen vermehrt (PEDERSEN, 1976b; WEISS & SCOTT, 1981a, 1981b; STODDART & SCOTT, 1989; KIPAR et al., 1998a; KIPAR et al., 2005; CORNELISSEN et al., 2007; PEDERSEN et al., 2015), und es ist bekannt, dass die zelluläre Immunantwort eine zentrale Rolle in der Virusabwehr spielt (PEDERSEN & BLACK, 1983;

PEDERSEN, 1987a; STODDART et al., 1988a; DE GROOT-MIJNES et al., 2005; KIPAR et al., 2006b; SATOH et al., 2011; VERMEULEN et al., 2013). Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass FIV-infizierte Katzen, die eine nur unzureichende zelluläre Immunität mit beeinträchtigter T-Zell-Funktion aufweisen (TORTEN et al., 1991), nach experimenteller oraler FECV-Infektion signifikant häufiger FIP entwickelten als nicht-FIV-infizierte Vergleichskatzen (POLAND et al., 1996). Katzen, die nach experimenteller Infektion mit FIPV zunächst klinisch gesund blieben, entwickelten nach Infektion mit FeLV eine FIP (PEDERSEN, 1987a). Katzen mit FIP zeigen eine B- und T-Zell-Depletion (KIPAR et al., 2001; PALTRINIERI et al., 2003; VERMEULEN et al., 2013), welche auch natürliche Killerzellen und regulatorische T-Zellen umfasst (VERMEULEN et al., 2013). Lymphopenie ist bei Katzen mit FIP ein wichtiger negativ prognostischer Faktor (PEDERSEN et al., 2015). Im Gegensatz dazu wiesen FECV-infizierte Katzen, welche keine FIP entwickelten, eine generalisierte B- und T-Zell-Hyperplasie auf (KIPAR et al., 1999; KIPAR et al., 2001; KIPAR et al., 2006b). Experimentelle Studien wiesen bei Katzen mit FIP eine gesteigerte Apoptose von Lymphozyten nach (HAAGMANS et al., 1996), welche durch FIPV-induzierte gesteigerte TNF- α -Expression ausgelöst wird (DEAN et al., 2003; TAKANO et al., 2007a; TAKANO et al., 2007b). Die Tatsache, dass einige Katzen nach experimenteller oronasaler Infektion mit FIPV nicht FIP entwickelten, dass Monozyten einiger Katzen *in vitro* nach Infektion mit FIPV oder FECV keine virale Replikation aufwiesen, und dass einige Katzen aus einem Umfeld, in dem FECV endemisch war, weder Antikörper gegen FECV bildeten noch FECV ausschieden, legt nahe, dass eine natürliche Resistenz gegenüber einer FCoV-Infektion und gegenüber der Entstehung einer FIP vorhanden sein kann (ADDIE & JARRETT, 2001; ADDIE et al., 2003; DEWERCHIN et al., 2005). Die Lymphozyten-Depletion tritt bei Katzen mit FIP bereits früh im Verlauf der Erkrankung und zeitgleich und im selben Gewebe wie die virale Replikation auf (DEAN et al., 2003; DE GROOT-MIJNES et al., 2005). Dagegen wird vermutet, dass eine frühe effektive T-Zell-Antwort die virale Replikation in Monozyten/Makrophagen limitieren und somit die Entwicklung einer FIP trotz Infektion mit FIPV aufhalten kann (DE GROOT-MIJNES et al., 2005).

IFN- γ ist ein wichtiger Modulator der zellulären Immunantwort. IFN- γ wurde

einerseits in erniedrigter Konzentration im Blut oder in PBMC von an FIP erkrankten Katzen und im Gewebe von Katzen mit neurologischer Manifestation von FIP nachgewiesen und es wurde daher angenommen, dass dieser Mangel zur Entwicklung der FIP beiträgt (GUNN-MOORE et al., 1998a; FOLEY et al., 2003; KISS et al., 2004; GELAIN et al., 2006; SATOH et al., 2011). Andererseits konnte bei klinisch gesunden FCoV-infizierten Katzen oder resistenten Katzen eine erhöhte IFN- γ -mRNA-Expression nachgewiesen werden (KISS et al., 2004; GELAIN et al., 2006). Besonders FCoV-infizierte Katzen aus Mehrkatzenhaushalten mit hoher FIP-Prävalenz wiesen signifikant höhere IFN- γ -Konzentrationen auf als Katzen mit FIP und Katzen aus Mehrkatzenhaushalten mit geringer FIP-Prävalenz (GIORDANO & PALTRINIERI, 2009). IFN- γ wurde deswegen eine protektive Rolle zugesprochen (KISS et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurde mittels RT-PCR eine erhöhte lokale IFN- γ -Expression in entzündlichen Läsionen von Katzen mit FIP nachgewiesen (FOLEY et al., 2003; BERG et al., 2005). Makrophagen sind die bei Weitem vorherrschenden Zellen innerhalb der akuten granulomatösen Läsionen (KIPAR et al., 1998a; BERG et al., 2005). Eine hohe lokale IFN- γ -Produktion durch T-Lymphozyten führt möglicherweise zu einer Aktivierung der Makrophagen, zur Steigerung der Fc-Rezeptor-Expression auf deren Zelloberfläche und letztlich zur Zunahme der Virusaufnahme und -replikation in den Makrophagen (BERG et al., 2005). Hierfür spricht auch die deutlich höhere IFN- γ -Konzentration im Erguss als im Serum von Katzen mit FIP. Möglicherweise ist IFN- γ also auf Gewebeebene in die Pathogenese der FIP involviert (GIORDANO & PALTRINIERI, 2009).

2. Diagnostik der felines infektiösen Peritonitis

Die *ante-mortem*-Diagnose der FIP stellt noch immer eine große Herausforderung dar (HARTMANN, 2005; SHARIF et al., 2010). Die meisten klinischen Symptome, wie Apathie, Anorexie, Gewichtsverlust oder Fieber, sind unspezifisch (NEU & PFEIFFER, 1985; HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009; GIORI et al., 2011). Mögliche labordiagnostische Veränderungen, wie Neutrophilie, Lymphopenie, Thrombozytopenie, nicht-regenerative mikrozytäre Anämie, Hyperproteinämie mit Hyperglobulinämie und Hypalbuminämie (SPARKES et al., 1991; PALTRINIERI et al., 1998a; PALTRINIERI et al., 2001; PALTRINIERI et al., 2002; RIEMER et al., 2016) und gegebenenfalls, je nach Organbeteiligung, eine Erhöhung der Aktivität von Leberenzymen,

Hyperbilirubinämie oder ein Anstieg der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979a; SPARKES et al., 1991; WEISS, 1991), sind nicht pathognomonisch (SPARKES et al., 1991; SPARKES et al., 1994; PALTRINIERI et al., 1999; PALTRINIERI et al., 2002). Bei Katzen mit FIP sind im Blut oder Erguss auch deutlich erhöhte Konzentrationen von akute-Phase-Proteinen, wie saurem alpha-1-Glykoprotein (AGP), Serum-Amyloid-A (SAA) oder Haptoglobin, festzustellen (DUTHIE et al., 1997; GIORDANO et al., 2004; PALTRINIERI et al., 2007a; GIORI et al., 2011; HAZUCHOVA et al., 2017). Wenngleich hinweisend, sind diese Veränderungen jedoch alle nicht spezifisch für FIP. Auch bei anderen entzündlichen Prozessen und Neoplasien und sogar bei gesunden FECV-infizierten Katzen kann es zum Anstieg der Konzentration von akute-Phase-Proteinen (DUTHIE et al., 1997; SELTING et al., 2000; GIORDANO et al., 2004; CERON et al., 2005; PALTRINIERI et al., 2007b; HAZUCHOVA et al., 2017) und deren Expression auf zirkulierenden Leukozyten (PALTRINIERI et al., 2012) kommen. Nur im Zusammenhang mit einem auf anderen virologischen Parametern basierenden hohen Verdacht auf FIP kann die Bestimmung von AGP-Konzentrationen von diagnostischem Nutzen sein (PALTRINIERI et al., 2007a).

Auch die makroskopische und zytologische Untersuchung von Körperhöhlenergüssen und die Bestimmung von Zellzahl und Ergusschemie können zwar hinweisend für eine FIP sein, erlauben jedoch keine eindeutige Diagnose, da die Veränderungen nicht spezifisch für FIP sind (HARTMANN, 2005; GIORI et al., 2011). Ein einfacher, billiger Test zur Untersuchung von Ergüssen, die Rivalta-Probe, weist zwar eine gute Sensitivität auf (91 % – 100 %), die Spezifität liegt allerdings nur zwischen 66 % und 81 % (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; FISCHER et al., 2012). Die Rivalta-Probe kann auch bei Ergüssen anderer Genese, wie z. B. bakterieller Peritonitis oder Lymphom, positiv ausfallen (HARTMANN et al., 2003). Als Goldstandard wurde in den existierenden Studien zur Rivalta-Probe meist die histopathologische Untersuchung verwendet (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; FISCHER et al., 2012), teils aber auch der Nachweis von FCoV-Antigen in Gewebe oder Erguss (FISCHER et al., 2012). Auf einer ähnlichen Grundlage wie die Rivalta-Probe basiert auch die Untersuchung von Ergüssen in automatischen Analysegeräten, wie z. B. im Sysmex XT-2000iV. Dieses Hämatologie-

Analysegerät misst Leukozyten in zwei verschiedenen Kanälen; in einem dieser Kanäle wird der Probe ein saures Reagenz zugegeben, welches zur Zellschrumpfung führt (normalerweise verwendet zur Zählung der basophilen Granulozyten). Aufgrund des hohen Eiweißgehaltes in Ergüssen von Katzen mit FIP kommt es dabei zur Formation von Gerinnseln, welche Zellen einschließen. Die Zellzahl in diesem Kanal ist daher bei Katzen mit FIP gering und das Verhältnis der Zellzahlen beider Kanäle, das Δ total nucleated cells (Δ TNC), höher als bei gesunden Katzen. Dieser Test wies in zwei Studien eine gute diagnostische Genauigkeit auf. Bei einem cut-off von 1,7 betrug die Sensitivität 79 % – 90 %, die Spezifität 94 % – 100 % im Vergleich zur Histopathologie beziehungsweise (bzw.) Immunhistochemie. Ein Δ TNC > 2,5 hatte eine Spezifität von 100 %; bei einem cut-off von 3,4 betrug die Sensitivität 57 % – 79 % (GIORDANO et al., 2015; STRANIERI et al., 2017b). Labordiagnostische Untersuchungen, die Ergussflüssigkeit verwenden, haben insgesamt deutlich bessere Sensitivität und Spezifität als Tests, die im Blut durchgeführt werden (PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009). Bei Katzen ohne Körperhöhlenerguss ist die Auswahl eines geeigneten diagnostischen Tests daher besonders schwierig. Die Diagnose kann nicht allein anhand von Signalement, Vorgeschichte, Klinik und labordiagnostischen Befunden gestellt werden und diese sollten nie einzeln, sondern immer als Einheit interpretiert werden, um den Verdacht einer FIP zu erhärten und die Entscheidung für invasivere diagnostische Verfahren zu treffen (ROHRER et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; ADDIE et al., 2004b; ADDIE et al., 2009; PEDERSEN, 2009).

Im Gegensatz zu den beschriebenen klinischen und labordiagnostischen Veränderungen, die zwar hinweisend, jedoch nicht spezifisch für eine FIP sind, da sie auch bei Katzen mit anderen Erkrankungen vorkommen können, erlauben spezielle mikrobiologische Untersuchungen den direkten oder indirekten Nachweis des Erregers FCoV. Die definitive Diagnose der FIP erfordert allerdings eine Unterscheidung zwischen dem FIP-verursachenden FIPV und dem avirulenten FECV. Ein idealer Test ermöglicht diese Unterscheidung auch *ante mortem* und wenig invasiv. Dies stellt insbesondere bei Katzen ohne Körperhöhlenerguss eine Herausforderung dar (HARTMANN, 2005; KIPAR & MELI, 2014).

2.1. Indirekter Erregernachweis

Eine Infektion mit FCoV führt, unabhängig davon, ob sich eine FIP entwickelt, zur Produktion spezifischer Antikörper (PEDERSEN et al., 1981a; GUNN-MOORE et al., 1998a; KIPAR et al., 1999; MELI et al., 2004; VOGEL et al., 2010). Nach experimenteller Infektion mit FECV oder mit FIPV sind zwischen dem siebten und 21. Tag erstmals Antikörper im Blut nachweisbar (PEDERSEN & BOYLE, 1980; PEDERSEN et al., 1981b; WEISS & SCOTT, 1981c; STODDART et al., 1988b; VOGEL et al., 2010; PEDERSEN et al., 2015; DESMARETS et al., 2016).

2.1.1. Nachweis von Antikörpern gegen feline Coronaviren

Der erste Test zum Nachweis von Antikörpern gegen FCoV im Serum wurde 1976 entwickelt (PEDERSEN, 1976a). Es existieren viele unterschiedliche Testmethoden: indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Tests (IFA) mit Verwendung von FCoV (PEDERSEN, 1976a; ADDIE & JARRETT, 1992b) oder Transmissible-Gastroenteritis-Viren (TGEV) (OSTERHAUS et al., 1977; HORZINEK & OSTERHAUS, 1979b; KUMMROW et al., 2005) als Antigen, Virus-Neutralisationstests, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (ADDIE et al., 2004a; PRATELLI, 2008) und immunchromatografische Schnelltests (RIM) (ADDIE et al., 2015). Ein idealer Test sollte v. a. eine hohe Spezifität und auch Sensitivität aufweisen, möglichst kleine Probenmengen benötigen und auch Erguss als Substrat erlauben, eine Quantifizierung der Antikörper ermöglichen und schnell ein Ergebnis liefern (ADDIE et al., 2015). Dabei ist zu beachten, dass das im jeweiligen Test verwendete Antigen die Sensitivität und Spezifität entscheidend beeinflussen kann. Nur Ergebnisse desselben Labors sollten im Verlauf miteinander verglichen werden (HARTMANN et al., 2003).

Ergebnisse quantitativer Antikörper-Tests werden üblicherweise als Titer angegeben. Die Titerstufe bezeichnet jeweils die höchste Verdünnung, für die noch eine positive Reaktion messbar ist (PEDERSEN, 1976a).

2.1.1.1. Serum

Im Gegensatz zu früheren Berichten, die davon ausgingen, dass der Nachweis hoher Antikörper-Titer ein spezifischer Indikator für FIP sei (PEDERSEN, 1976a; MADEWELL et al., 1978; HORZINEK & OSTERHAUS, 1979b), ist inzwischen

bekannt, dass Antikörper-Tests nicht zwischen Antikörpern gegen FECV und FIPV unterscheiden können (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN, 1995). Auch eine Kreuzreaktivität zwischen FCoV und anderen Coronaviren (CCV und TGEV) ist beschrieben (BARLOUGH & STODDART, 1988; PEDERSEN, 1995). Ein großer Teil der Katzenpopulation (bis zu 80 % und mehr, v. a. in Mehrkatzenhaushalten) hat Serum-Antikörper gegen FCoV, die meisten dieser Katzen erkranken jedoch nie an FIP (PEDERSEN, 1976a; SCOTT, 1979; ADDIE & JARRETT, 1992a; SPARKES et al., 1992; ADDIE et al., 1995; ADDIE et al., 2000; MELI et al., 2004). Ebenso kommen Antikörper im Serum von Katzen vor, die gegen FCoV geimpft wurden (GERBER et al., 1990; WASMOEN et al., 1995; HAIJEMA et al., 2004). Die Aussagekraft eines Antikörper-Titers zur Diagnose von FIP für eine individuelle Katze ist daher gering (SPARKES et al., 1991; GIORI et al., 2011), sodass die früher gebräuchliche Bezeichnung „FIP-Test“ (NEU & PFEIFFER, 1985) für den Antikörper-Nachweis heute nicht mehr verwendet wird (PEDERSEN, 1995).

Wenn ein Antikörper-Nachweis durchgeführt wird, dann sollte eine Quantifizierung der Antikörper stattfinden. Vor allem mittlere und niedrige Titerstufen sind von keinerlei Wert für die Diagnose der FIP (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). Im Verlauf der Krankheit kann zwar bei einigen Katzen ein Antikörper-Anstieg beobachtet werden (PEDERSEN, 1976a; GUNN-MOORE et al., 1998a), allerdings tritt dieser ebenso im Zusammenhang mit FECV-Reinfektion auf und ist daher kein Hinweis auf die Entwicklung einer FIP (ADDIE et al., 2000). Auch bei asymptomatischen FECV-infizierten Katzen werden oft hohe und steigende Titer festgestellt (SPARKES et al., 1992; ADDIE et al., 2000). Ein positiver Antikörper-Test kann den Verdacht einer FIP nicht bestätigen und darf niemals als Entscheidungshilfe zur Euthanasie herangezogen werden (SCOTT, 1979; ADDIE et al., 2000; KENNEDY et al., 2008). Auch kann ein negatives Testergebnis eine FIP nicht ausschließen (KENNEDY et al., 1998). Im Endstadium der FIP und v. a. bei fulminantem Verlauf mit Körperhöhlenerguss ist teils ein Abfall von Antikörpern gegen FCoV zu beobachten, manchmal sogar bis unter die Nachweisgrenze (PEDERSEN, 1976a, 1995). Ungefähr 10 % der Katzen mit klinisch manifester FIP sind Antikörpernegativ (HARTMANN et al., 2003). Möglicherweise kommt es bei diesen Katzen durch die immun-medierte Vaskulitis zu einem Übertritt von Blutbestandteilen

und auch Antikörpern aus der Blutbahn in den Erguss, sodass diese Antikörper durch Testverfahren nicht mehr erfasst werden können. Zudem sind im Endstadium viele Antikörper durch die hohe Viruslast gebunden (ADDIE & JARRETT, 1993; HARTMANN, 2005; MELI et al., 2013). Die Ergebnisse vorliegender Studien zum Nachweis von Antikörpern im Serum sind in Tabelle 1 dargestellt. Sensitivität und Spezifität variieren teilweise je nach Titerstufe und sind meist im Vergleich zur Histopathologie angegeben (SPARKES et al., 1991; HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). KENNEDY und Mitarbeiter (2008) untersuchten Katzen mit FIP, bei denen die Diagnose durch eine Kombination aus den Resultaten *ante mortem* durchgeführter Tests und histopathologisch festgestellter Gewebeläsionen bestätigt wurde. Die Studie von SOMA & ISHII (2004) schloss Katzen ein, bei denen zwar klinisch der Verdacht auf FIP bestand, bei denen die Diagnose aber nicht bestätigt wurde. Die Kontrollgruppen der verschiedenen Studien bestanden aus gesunden Katzen (KENNEDY et al., 2008) und/oder Katzen mit anderen Erkrankungen (SPARKES et al., 1991; KENNEDY et al., 2008), in den meisten Studien war FIP eine Differentialdiagnose aller Kontroll-Katzen (SPARKES et al., 1991; HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003).

GIORI und Mitarbeiter (2011) untersuchten fünf Katzen mit immunhistochemisch bestätigter FIP und vier Kontroll-Katzen mit FIP-typischen Symptomen, aber anderen Erkrankungen und ermittelten eine schlechte Übereinstimmung zwischen Antikörper-Nachweis und Immunhistochemie. Auch der Versuch, einen Antikörper-Test mit höherer Spezifität zu entwickeln, bei dem ausschließlich Antikörper gegen das 7b-Protein nachgewiesen werden sollten, scheiterte. Dieser Test wurde auf Grundlage der fälschlichen Annahme entwickelt, dass FECV kein intaktes 7b-Gen aufweisen, damit auch kein intaktes 7b-Protein und somit auch keine Produktion von Antikörpern gegen das 7b-Protein zu erwarten wäre. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl Katzen mit FIP als auch gesunde FECV-infizierte Katzen und FECV-infizierte Katzen mit anderen Erkrankungen 7b-Antikörper haben und dieser Test daher keine Verbesserung in der Antikörper-Diagnostik darstellt (KENNEDY et al., 2008).

Tabelle 1: Studien zur Evaluation des Nachweises von Antikörpern gegen FCoV im Serum (Ak: Antikörper, FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, IFA: Immunfluoreszenz-Antikörper-Test, k. A.: keine Angabe)

Studie/Autoren	Probenanzahl	Art des Ak-Nachweises	Sensitivität	Spezifität
SPARKES et al. (1991)	FIP (n = 39) Kontrollen (n = 39)	IFA	28 % – 74 %	64 % – 92 %
HIRSCHBERGER et al. (1995)	FIP (n = 70) Kontrollen (n = 214)	IFA	30 % – 79 %	64 % – 98 %
HARTMANN et al. (2003)	FIP (n = 97) Kontrollen (n = 245)	IFA	85 %	57 %
SOMA and ISHII (2004)	FIP (n = 88)	IFA	100 %	k. A.
KENNEDY et al. (2008)	FIP (n = 19) Kontrollen (n = 20)	Western blot	100 %	25 % – 45 %
GIORI et al. (2011)	FIP (n = 5) Kontrollen (n = 4)	IFA	k. A.	k. A.

Für präventive Maßnahmen und zur Bekämpfung von FCoV in Mehrkatzenhaushalten ist die Bestimmung von Antikörpern gegen FCoV dennoch sinnvoll. So dient sie beispielsweise zur Überprüfung von Katzengruppen und Haushalten auf Freiheit von FCoV, zur Überprüfung des FCoV-Status neu zu integrierender Katzen, zur Trennung FCoV-infizierter und nicht-infizierter Katzen, zur Diagnose einer FECV-bedingten Enteritis und zur Kontrolle durchgeführter Isolationsmaßnahmen (ADDIE & JARRETT, 1992b). Katzen ohne Antikörper scheiden mit großer Wahrscheinlichkeit kein FECV aus (ADDIE et al., 2000; ADDIE & JARRETT, 2001; ADDIE et al., 2015). Allerdings wurden in einer Studie auch vier Monate p. i. Virusausscheider ohne messbare Antikörper beobachtet (MELI et al., 2004).

2.1.1.2. Erguss

Einige Studien untersuchten den Nachweis von Antikörpern in Ergussflüssigkeit (OSTERHAUS et al., 1977; HARTMANN et al., 2003; SOMA & ISHII, 2004). Ein Vergleich zwischen der Antikörper-Bestimmung in Serum und Erguss von Katzen mit klinischem Verdacht auf FIP ergab eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse in beiden Flüssigkeiten; bei 23 % der im Serum positiv getesteten Katzen war der Titer im Erguss jedoch niedriger als im Serum. Die Diagnose FIP wurde in dieser Studie nicht bestätigt (SOMA & ISHII, 2004). Der Antikörper-

Nachweis (beliebige Titerstufe) im Erguss erreichte in der Studie von HARTMANN und Mitarbeitern (2003) im Vergleich zur Histopathologie eine Sensitivität von 86 % und eine Spezifität von 85 %. Als Kontrollen wurden Katzen mit Verdacht auf FIP eingeschlossen, bei denen aber eine andere Erkrankung diagnostiziert wurde. Zusammenfassend ist daher der Nachweis von Antikörpern im Erguss zur Diagnose der FIP nicht besser geeignet als der im Serum (Tabelle 2).

Tabelle 2: Studien zur Evaluation des Nachweises von Antikörpern gegen FCoV im Erguss (Ak: Antikörper, FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, IFA: Immunfluoreszenz-Antikörper-Test, k. A.: keine Angabe)

Studie/Autoren	Probenmaterial	Probenanzahl	Art des Ak-Nachweises	Sensitivität	Spezifität
HARTMANN et al. (2003)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 119) Kontrollen (n = 74)	IFA	86 %	85 %
SOMA and ISHII (2004)	Aszites	FIP (n = 88)	IFA	100 %	k. A.

2.1.1.3. Liquor

Der Antikörper-Nachweis im Liquor von Katzen mit neurologischer Manifestation wurde zunächst als hilfreich für die Diagnose der FIP angesehen (FOLEY et al., 1998). Weitere Untersuchungen unter Einbeziehung größerer und sinnvollerer Kontroll-Gruppen zeigten jedoch, dass der Nachweis von Antikörpern im Liquor, genauso wie der Antikörper-Nachweis im Serum und Erguss, nicht geeignet ist, um eine FIP *ante mortem* zu diagnostizieren (BOETTCHER et al., 2007). Sensitivität und Spezifität sind in den Studien im Vergleich zur Histopathologie angegeben, die Kontroll-Gruppen bestanden entweder nur aus Katzen mit neurologischen Erkrankungen (FOLEY et al., 1998; BOETTCHER et al., 2007) oder zusätzlich auch aus Katzen mit nicht-neurologischen Erkrankungen (BOETTCHER et al., 2007) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Studien zur Evaluation des Nachweises von Antikörpern gegen FCoV im Liquor (Ak: Antikörper, FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, IFA: Immunfluoreszenz-Antikörper-Test, k. A.: keine Angabe)

Studie/Autoren	Probenanzahl	Art des Ak-Nachweises	Sensitivität	Spezifität
FOLEY et al. (1998)	FIP ohne neurologische Symptome (n = 8)	IFA	0 %	k. A.
FOLEY et al. (1998)	FIP mit neurologischen Symptomen (n = 16) Kontrollen mit neurologischen Symptomen (n = 3)	IFA	94 %	100 %
BOETTCHER et al. (2007)	FIP ohne neurologische Symptome (n = 13) Kontrollen ohne neurologische Symptome (n = 15)	IFA	31 %	100 %
BOETTCHER et al. (2007)	FIP mit neurologischen Symptomen (n = 10) Kontrollen mit neurologischen Symptomen (n = 29)	IFA	60 %	93 %

Aufgrund der deutlichen Korrelation von Serum- und Liquor-Antikörpern und der Tatsache, dass die im Serum festgestellten Titer immer höher waren als die im Liquor, wird der Übertritt der Antikörper aus dem Blut in den Liquor über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke als wichtigste Ursache für die Anwesenheit von Antikörpern im Liquor bei Katzen mit anderen Krankheiten diskutiert. Eine andere Möglichkeit ist die lokale Antikörper-Produktion durch eingewanderte B-Lymphozyten bei Katzen mit FECV-Infektion (BOETTCHER et al., 2007). Eine Produktion spezifischer Antikörper durch intrathekale B-Lymphozyten wurde nicht gefunden (STEINBERG et al., 2008).

2.1.2. Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen

Wie bereits beschrieben, spielt das Immunsystem eine zentrale Rolle in der Pathogenese der FIP (HORZINEK & OSTERHAUS, 1978; HORZINEK & OSTERHAUS, 1979a; PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS et al., 1980; WEISS & SCOTT, 1981a, 1981b, 1981c). Die Produktion nicht protektiver Antikörper und die Bildung von Immunkomplexen sind laut Aussage vieler

Autoren entscheidend an der Entstehung immun-mediierter Läsionen bei FIP beteiligt (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979a; JACOBSE-GEELS et al., 1980; PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS et al., 1980; WEISS & SCOTT, 1981b, 1981c; JACOBSE-GEELS et al., 1982; PALTRINIERI et al., 1998a) und zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe wurden im Serum und im Erguss FCoV-infizierter Katzen gefunden (JACOBSE-GEELS et al., 1982; HORZINEK et al., 1986; PFEIFFER, 1991; SCHROO, 1994; KIPAR et al., 1999; MELI et al., 2004). Der Wert des Nachweises von Immunkomplexen mittels kompetitivem ELISA in der FIP-Diagnostik hatte im Vergleich zur Histopathologie eine Sensitivität und Spezifität von 48 % bzw. 91 % (Tabelle 4). Bei den verwendeten Kontroll-Katzen bestand der Verdacht auf FIP, es wurde jedoch eine andere Erkrankung diagnostiziert (HARTMANN et al., 2003).

Tabelle 4: Evaluation des Nachweises von Antigen-Antikörper-Komplexen (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, FIP: feline infektiöse Peritonitis)

Studie/Autoren	Proben-material	Probenanzahl	Art des Nachweises	Sensitivität	Spezifität
HARTMANN et al. (2003)	Serum	FIP (n = 29) Kontrollen (n = 83)	ELISA	48 %	91 %

Auch in weiteren Studien wurden FCoV-spezifische Immunkomplexe auch bei klinisch gesunden Katzen ohne FIP nachgewiesen (KIPAR et al., 1999; MELI et al., 2004). Es konnte allerdings beobachtet werden, dass Immunkomplexe bei FECV-infizierten Katzen nur kurzzeitig ungefähr drei Wochen p. i. auftraten (PFEIFFER, 1991). Letztlich ist auch der Nachweis von Immunkomplexen nicht zur Diagnose der FIP geeignet (HARTMANN et al., 2003).

2.2. Direkter Erregernachweis

Im Gegensatz zu indirekten Nachweismethoden, die lediglich auf eine Auseinandersetzung des Immunsystems mit FCoV hinweisen, liefert der direkte Erregernachweis den Beweis für eine bestehende Infektion (HERREWEGH et al., 1995a). Die Virusisolation in Zellkultur ist zeitaufwendig und v. a. bei dem im Feld vorherrschenden Serotyp I-FCoV (PEDERSEN et al., 1984a; ADDIE et al., 2003; BENETKA et al., 2004; KUMMROW et al., 2005; SHIBA et al., 2007; LIN et al., 2009b) nur sehr schwierig durchführbar. Sie ist daher als Routine-

Diagnostik nicht geeignet (PEDERSEN et al., 1984a; VENNEMA, 1999).

2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion

Seit der ersten Anwendung dieser Technik zum Nachweis von FCoV (LI & SCOTT, 1994) ist der direkte Virusnachweis mittels RT-PCR eine vielfach verwendete Methode in der Diagnostik der FIP. Gemäß der lange Zeit bestehenden Hypothese, dass ausschließlich FIPV und nicht FECV systemisch verbreitet werden, ging man zunächst davon aus, dass der Nachweis von FCoV im Blut, Erguss oder Gewebe außerhalb des Gastrointestinaltraktes für das Vorliegen des virulenten FIPV-Pathotyps spricht (PEDERSEN et al., 1981b; WEISS & SCOTT, 1981a; PEDERSEN et al., 1984b; STODDART & SCOTT, 1989).

2.2.1.1. Gewebe

Bei Katzen mit FIP ist FIPV-RNA in großen Mengen ausschließlich in entzündlich verändertem Gewebe zu finden. Gewebe ohne Beteiligung am Entzündungsgeschehen weisen keine oder nur geringe Mengen an RNA auf. Organe mit der größten Viruslast sind Omentum, mesenteriale Lymphknoten und Milz. Niere, Leber, Lunge, Myokard und Popliteal-Lymphknoten enthalten geringere Mengen oder gar kein Virus (PEDERSEN et al., 2015). Eine Übersicht über verschiedene Studien zur RT-PCR aus Gewebe ist in Tabelle 5 dargestellt.

Li und Scott (1994) wiesen mittels RT-PCR bei 88 % der Katzen mit klinischem FIP-Verdacht FCoV in Organmaterial (Leber, Niere und/oder Milz) nach; bei experimentell mit FIPV infizierten Katzen waren es 100 %. In dieser ersten Studie wurde allerdings auch bei 61 % der Katzen ohne FIP-Verdacht FCoV-RNA im Gewebe detektiert. KIPAR und Mitarbeiter (2006a) wiesen bei allen in ihrer Studie untersuchten Katzen mit FIP (immunhistochemisch bestätigt), aber auch bei 85 % der klinisch gesunden FECV-infizierten Katzen in mindestens einem hämolymphatischen Gewebe (Milz, mesenteriale Lymphknoten, Knochenmark) FCoV-RNA nach. Bei Katzen mit FIP verlief die real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) in 60 % der Fälle in der Milz, in 87 % der Fälle in mesenterialen Lymphknoten und in 67 % der Fälle im Knochenmark positiv. Bei FCoV-infizierten Katzen ohne FIP wurde FCoV-RNA in der Milz in 38 %, in mesenterialen Lymphknoten in 33 % und im Knochenmark in 46 % der Fälle nachgewiesen (KIPAR et al., 2006a).

Tabelle 5: Studien zur Evaluation verschiedener RT-PCR zum Nachweis von FCoV-RNA aus Gewebe (FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, k. A.: keine Angabe, mRNA: Boten-Ribonukleinsäure, RNA: Ribonukleinsäure, RT-PCR: reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, RT-qPCR: real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Studie/Autoren	Probenmaterial	Probenanzahl	Art der PCR	Sensitivität	Spezifität
LI and SCOTT (1994)	Leber, Niere, Milz	FIP (n = 8) Kontrollen (n = 84)	RT-PCR	88 %	39 %
LI and SCOTT (1994)	Leber, Niere, Milz	Experimentell induzierte FIP (n = 13)	RT-PCR	100 %	k. A.
KIPAR et al. (2006a)	Hämo-lymphatische Gewebe	FIP (n = 15) Kontrollen (n = 13)	RT-qPCR	60 % – 87 %	54 % – 67 %
HORNYAK et al. (2012)	Verschiedene Gewebe	FIP (n = 32) Kontrollen (n = 9)	RT-qPCR für mRNA	60 % – 100 %	100 %
PORTER et al. (2014)	Verschiedene Gewebe	FIP (n = 45) Kontrollen (n = 41)	RT-qPCR	96 %	78 %

In einer anderen Studie wurde mittels RT-qPCR in 71 % der Gewebeprobe von Katzen mit FIP (immunhistochemisch bestätigt) FCoV-mRNA gefunden. Am häufigsten enthielten mesenteriale Lymphknoten (100 %), Milz (88 %), Lunge (86 %), Leber (75 %), bronchiale Lymphknoten (67 %), Niere (63 %) und Darm (60 %) vermehrungsfähiges Virus. Gewebe von gesunden Katzen mit FECV-Infektion wurde zu 100 % negativ getestet (HORNYAK et al., 2012). PORTER und Mitarbeiter (2014) untersuchten Katzen mit immunhistochemisch bestätigter FIP und Kontroll-Katzen mit anderen Erkrankungen.

2.2.1.2. Blut

Basierend auf der ursprünglichen Annahme, dass ausschließlich FIPV und nicht FECV systemisch verbreitet werden, wurde eine RT-PCR entwickelt, welche das 3'-Ende des FCoV-Genoms amplifizierte und dadurch alle bekannten FCoV-Isolate erkennen sollte. Die RT-PCR konnte nicht zwischen FECV und FIPV und ebenso nicht zwischen FCoV und CCV oder TGEV unterscheiden. Es wurde aber angenommen, dass in Blut oder Erguss nur FIPV nachzuweisen wäre. Studien zeigten jedoch, dass, anders als bislang angenommen, FCoV mittels RT-PCR auch im Plasma von Katzen mit anderen Erkrankungen als FIP und von

asymptomatischen Katzen nachgewiesen werden konnte (HERREWEGH et al., 1995a; HERREWEGH et al., 1997). Mehrere Studien, die den diagnostischen Wert der RT-PCR aus Serum, Plasma oder Vollblut evaluierten, bestätigten diese Ergebnisse (EGBERINK et al., 1995; FEHR et al., 1996; GUNN-MOORE et al., 1998b; KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003). Eine Übersicht dieser Studien ist in Tabelle 6 dargestellt. Wurden unterschiedliche Blutfraktionen in einer Studie untersucht, so sind Sensitivität bzw. Spezifität als Spanne angegeben. In den meisten Studien wurde als vergleichender Standard die Histopathologie verwendet (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998b; KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; SIMONS et al., 2005; DOENGES et al., 2017), in einer Studie teils auch der Antigen-Nachweis im Erguss (DOENGES et al., 2017). Andere Studien schlossen Katzen mit klinischem FIP-Verdacht ein, die Diagnose wurde jedoch nicht oder nicht bei allen Katzen bestätigt (SIMONS et al., 2005; CAN-SAHNA et al., 2007; SHARIF et al., 2011). Die Kontroll-Gruppen enthielten entweder gesunde Katzen (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998b; SIMONS et al., 2005; CAN-SAHNA et al., 2007; SHARIF et al., 2011) und/oder Katzen mit anderen Erkrankungen als FIP, teilweise auch mit FIP-typischen Symptomen (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; SIMONS et al., 2005; DOENGES et al., 2017).

FEHR und Mitarbeiter (1996) untersuchten 63 Serumproben von 62 Katzen mit abdominalen Symptomen. Eine definitive Diagnose wurde nicht gestellt, sodass die Berechnung der Sensitivität und Spezifität nicht möglich war. Bei 18 Katzen ergab sich ein positives nested reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-nPCR)-Ergebnis. Eine dieser Katzen überlebte beinahe drei Jahre, vier weitere Katzen lebten mindestens 70 Monate nach der Untersuchung. Dies spricht aufgrund der medianen Überlebenszeit von neun Tagen (RITZ et al., 2007) gegen FIP. Es ist also davon auszugehen, dass bei diesen Katzen ein falsch-positives Ergebnis vorlag (FEHR et al., 1996).

Tabelle 6: Studien zur Evaluation verschiedener RT-PCR zum Nachweis von FCoV-RNA aus Blut (FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, k. A.: keine Angabe, mRNA: Boten-Ribonukleinsäure, n. d.: nicht differenziert, PBMC: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, RNA: Ribonukleinsäure, RT-LAMP: reverse-Transkriptase-Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation, RT-nPCR: nested reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, RT-PCR: reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, RT-qPCR: real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Studie/Autoren	Probenmaterial	Probenanzahl	Art der PCR	Sensitivität	Spezifität
HERREWEGH et al. (1995a)	Serum, Plasma	FIP (n = 17) Kontrollen (n = 15)	RT-nPCR	56 % – 75 %	75 % – 88 %
EGBERINK et al. (1995)	Plasma	FIP (n = 42) Kontrollen (n = 141)	RT-nPCR	71 %	89 %
FEHR et al. (1996)	Serum	n. d. (n = 63)	RT-nPCR	k. A.	k. A.
GUNN-MOORE et al. (1998b)	Serum, Plasma, Vollblut	FIP (n = 47) Kontrollen (n = 69)	semi-nested RT-PCR	67 % – 87 %	10 % – 20 %
KENNEDY et al. (1998)	Serum, Plasma, Vollblut	FIP (n = 6) Kontrollen (n = 5)	RT-nPCR	20 % – 75 %	100 %
HARTMANN et al. (2003)	Serum	FIP (n = 17) Kontrollen (n = 8)	RT-nPCR	53 %	88 %
SIMONS et al. (2005)	PBMC	FIP (n = 81) Kontrollen (n = 17)	RT-PCR für mRNA	93 %	100 %
SIMONS et al. (2005)	PBMC	FIP (n = 651) Kontrollen (n = 424)	RT-PCR für mRNA	46 %	95 %
CAN-SAHNA et al. (2007)	Vollblut	FIP (n = 1) Kontrollen (n = 25)	RT-PCR für mRNA	100 %	48 %
SHARIF et al. (2011)	Vollblut	FIP (n = 10) Kontrollen (n = 40)	RT-PCR	100 %	33 %
SHARIF et al. (2011)	Vollblut	FIP (n = 10) Kontrollen (n = 40)	RT-PCR für mRNA	100 %	85 %
HORNYAK et al. (2012)	Leukozyten	FIP (n = 2)	RT-qPCR für mRNA	100 %	k. A.
DOENGES et al. (2017)	Serum, PBMC	FIP (n = 43) Kontrollen (n = 49)	RT-qPCR	15 % – 29 %	100 %
STRANIERI et al. (2017a)	Vollblut	FCoV-positiv (n = 4) FCoV-negativ (n = 5)	RT-LAMP	25 % – 50 %	100 %

GUNN-MOORE und Mitarbeiter (1998b) fanden eine Virämie, also eine positive PCR, bei 80 % – 90 % klinisch gesunder FECV-infizierter Katzen. Die RT-PCR aus Blut sollte also, v. a. aufgrund der zu niedrigen Spezifität, nicht allein zur Diagnosestellung verwendet werden. Aus Blut wird die höchste Sensitivität für Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Plasma als Matrix angegeben, gefolgt von EDTA-Vollblut und Serum (HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998b; KENNEDY et al., 1998). Eine neuere Studie demonstrierte eine bessere Sensitivität für PBMC im Vergleich zu Serum (DOENGES et al., 2017). Dennoch ist Blut insgesamt aufgrund des nur sehr niedrigen Virusgehaltes und der damit verbundenen niedrigen Sensitivität der RT-PCR als Probenmaterial nicht zu empfehlen (PEDERSEN et al., 2015).

Zwar können FECV Monozyten und Makrophagen infizieren, sie besitzen allerdings nicht die Fähigkeit zu effektiver Replikation innerhalb dieser Zellen (STODDART & SCOTT, 1989; DEWERCHIN et al., 2005; ROTTIER et al., 2005). Auf der Grundlage dieser Tatsache wurde eine RT-PCR entwickelt, die speziell die mRNA der FCoV amplifizierte und damit nur aktiv replizierende FCoV in mononukleären Zellen nachwies. Da in einer ersten Studie 93 % der Katzen mit histopathologisch bestätigter FIP und keine der Kontroll-Katzen mit gleichen Symptomen, aber anderen Erkrankungen als FIP positiv getestet wurden, wurde die mRNA-PCR zunächst als nützliche diagnostische Methode erachtet. Allerdings war die Methode in einer Folgestudie bei 5 % einer Gruppe klinisch gesunder Katzen positiv (SIMONS et al., 2005). FCoV-mRNA und damit eine Replikation der FCoV auch im Blut wurde in weiteren Studien bei 52 % (CANSAHNA et al., 2007) und 15 % (SHARIF et al., 2011) der gesunden FECV-infizierten Katzen nachgewiesen. Katzen mit FIP weisen allerdings grundsätzlich eine größere Viruslast auf und zeigen höhere Replikationsraten als FECV-infizierte Katzen (KIPAR et al., 2006a; PORTER et al., 2014). Eine RT-qPCR, welche die Amplifizierung und gleichzeitige Quantifizierung viraler mRNA erlaubt, könnte daher eine Unterscheidung zwischen der geringgradigen Replikation der FECV und der deutlich höheren Replikation der FIPV ermöglichen. Mit einer Sensitivität von 100 % (im Vergleich zur Immunhistochemie) für Leukozyten aus kardialem Blut erwies sich eine solche auf dem Förster-Resonanzenergietransfer basierende RT-qPCR als vielversprechende diagnostische Nachweismethode (HORNYAK et al., 2012).

Diese wurde allerdings bislang nur an sehr geringen Patientenzahlen und nicht im Feld getestet.

Eine neuere Methode ist die loop-mediated isothermal amplification (LAMP), welche den Vorteil einer sehr schnellen Amplifikation von Nukleinsäure birgt. Die reverse-Transkriptase-Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation (RT-LAMP) wurde in einer aktuellen Studie bei Katzen, bei denen der Verdacht auf FIP bestand, in Blut, Erguss, Lymphknoten und Kot angewandt. Der Vergleich der Ergebnisse erfolgte allerdings nicht mit dem Goldstandard, dem immunhistochemischen Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen in Gewebeläsionen (KIPAR et al., 1998a; ADDIE et al., 2004b; PEDERSEN, 2009; GIORI et al., 2011; KIPAR & MELI, 2014), sondern mit den Ergebnissen einer RT-nPCR. Hierbei wurde in allen Materialien eine Spezifität von 100 % erreicht, die Sensitivität war aber auch mit zwei unterschiedlichen Visualisierungstechniken nur gering bis mäßig (s. Tabelle 6 und 7). Die Zahl der Lymphknotenproben war zu gering, als dass eine Aussage über den diagnostischen Nutzen möglich gewesen wäre (STRANIERI et al., 2017a).

2.2.1.3. Erguss

Bei Katzen mit FIP und Körperhöhlenerguss ist die Viruslast im Erguss deutlich höher als im Blut (PEDERSEN et al., 2015). Eine Übersicht über verschiedene Studien zur RT-PCR aus Erguss mit Sensitivitäten und Spezifitäten ist in Tabelle 7 dargestellt. Wie daraus ersichtlich, war der Probenumfang bei vielen der älteren Studien relativ gering. Sensitivität und Spezifität wurden meist im Vergleich zur Histopathologie ermittelt (HIRSCHBERGER et al., 1995; GAMBLE et al., 1997; HARTMANN et al., 2003; TSAI et al., 2011; DOENGES et al., 2017), in anderen Studien teils auch im Vergleich zum Antigen-Nachweis im Erguss (DOENGES et al., 2017) oder Gewebe (LONGSTAFF et al., 2017) oder im Vergleich zur labordiagnostischen Untersuchung von Ergussflüssigkeit (GAMBLE et al., 1997). Die Kontroll-Gruppen enthielten Katzen, bei denen klinisch der Verdacht auf FIP bestand, bei denen aber andere Erkrankungen diagnostiziert wurden (HIRSCHBERGER et al., 1995; GAMBLE et al., 1997; HARTMANN et al., 2003; DOENGES et al., 2017; LONGSTAFF et al., 2017).

Tabelle 7: Studien zur Evaluation verschiedener RT-PCR zum Nachweis von FCoV-RNA aus Erguss (FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, k. A.: keine Angabe, n. d.: nicht differenziert, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, RNA: Ribonukleinsäure, RT-LAMP: reverse-Transkriptase-Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation, RT-nPCR: nested reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, RT-PCR: reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, RT-qPCR: real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Studie/Autoren	Probenmaterial	Probenanzahl	Art der PCR	Sensitivität	Spezifität
HERREWEGH et al. (1995a)	Aszites	FIP (n = 5) Kontrollen (n = 1)	RT-nPCR	100 %	100 %
GAMBLE et al. (1997)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 12) Kontrollen (n = 11)	RT-nPCR	91 %	94 %
KENNEDY et al. (1998)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 5) Kontrollen (n = 3)	RT-nPCR	100 %	100 %
HARTMANN et al. (2003)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 5) Kontrollen (n = 1)	RT-nPCR	100 %	100 %
TSAI et al. (2011)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 27)	RT-nPCR	96 %	k. A.
SOMA et al. (2013)	Aszites	n. d. (n = 854)	RT-PCR	k. A.	k. A.
LONGSTAFF et al. (2017)	Aszites, Thoraxerguss oder Perikarderguss	FIP (n = 20) Kontrollen (n = 23)	RT-qPCR	85 %	100 %
DOENGES et al. (2017)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 36) Kontrollen (n = 33)	RT-qPCR	89 %	100 %
STRANIERI et al. (2017a)	k. A.	FCoV-positiv (n = 5) FCoV-negativ (n = 3)	RT-LAMP	40 %	100 %

SOMA und Mitarbeiter (2013) untersuchten zwar Erguss von 854 Katzen mit dem klinischen Verdacht auf FIP, die Krankheit wurde jedoch nicht bestätigt. Außerdem fehlen Angaben darüber, ob die in der RT-PCR negativ getesteten Katzen andere Erkrankungen hatten als FIP, sodass eine Berechnung einer Sensitivität und Spezifität nicht möglich war. In dieser Studie wurde bei 377 der 854 Katzen (44 %) FCoV-RNA im Erguss nachgewiesen (SOMA et al., 2013). In einer anderen Studie wurden Plasma und/oder Aszites von 42 Katzen mit histopathologisch bestätigter FIP und 141 Kontroll-Katzen (gesund oder mit FIP typischen Symptomen, aber nicht an FIP erkrankt) untersucht. Bei 70 % der

Katzen mit FIP wurde FCoV-RNA im Plasma nachgewiesen. Bei fünf zusätzlichen Katzen, deren Plasma negativ getestet wurde, verlief die RT-nPCR aus Erguss positiv. Es fehlen Angaben darüber, wie viele Ergussproben insgesamt getestet wurden (EGBERINK et al., 1995), weshalb die Studie nicht in die Tabelle aufgenommen wurde. KENNEDY und Mitarbeiter (1998) untersuchten insgesamt 27 Katzen mit Verdacht auf FIP, eine histopathologische Bestätigung lag jedoch nur bei 13 Katzen vor. Erguss war bei acht dieser 13 Katzen vorhanden. Trotz der in älteren Studien ermittelten vielversprechenden hohen Spezifität PCR-basierter Nachweismethoden aus Erguss ist zu bedenken, dass die RT-PCR im Vergleich zu anderen direkten Nachweismethoden möglicherweise auch kleine Mengen an FCoV-RNA nachweist, die bei Katzen mit zirkulierenden FCoV im Rahmen verschiedener Entzündungsprozesse (auch ohne FIP) aus dem Blut in den Erguss übertreten könnten (ADDIE et al., 2004b).

2.2.1.4. Liquor

Die Evaluation von RT-PCR im Liquor ergab bislang immer eine Spezifität von 100 %. FCoV-RNA konnte also nur bei Katzen mit FIP (mit und ohne neurologische Symptome), nicht aber bei Kontroll-Katzen nachgewiesen werden (Tabelle 8). Die Diagnose FIP wurde in den Studien histopathologisch (FOLEY et al., 1998; DOENGES et al., 2016) und/oder mittels Antigen-Nachweises im Erguss gestellt (DOENGES et al., 2016). Die Kontroll-Gruppen bestanden entweder nur aus Katzen mit neurologischen Erkrankungen (FOLEY et al., 1998) oder zusätzlich auch aus Katzen mit nicht-neurologischen Erkrankungen, aber FIP-typischen Symptomen (DOENGES et al., 2016).

Die Blut-Hirn-Schranke wurde bislang nicht speziell bei Katzen mit FIP untersucht, dennoch ist davon auszugehen, dass sie im Zuge der Entzündung bei FIP gestört ist (WEBB & MUIR, 2000). Generell kommt es im Zuge verschiedener Infektionen und Entzündungen des zentralen Nervensystems zur Ausschüttung von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Metalloproteasen und anderen Mediatoren, welche zur Schädigung der tight junctions, der Basalmembran und des zerebrovaskulären Endothels führen. Dies ermöglicht letztlich den Übertritt von Zellen und Erregern über die Blut-Hirn-Schranke (WEBB & MUIR, 2000). Obwohl bisher keine positiven PCR-Ergebnisse im Liquor von Katzen ohne FIP auftraten, ist also denkbar, dass FCoV über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke, beispielsweise im Rahmen anderer neurologischer

Erkrankungen, in das zentrale Nervensystem und damit auch den Liquor übertreten können, so wie es auch für Antikörper vermutet wird (BOETTCHER et al., 2007).

Tabelle 8: Studien zur Evaluation verschiedener RT-PCR zum Nachweis von FCoV-RNA aus Liquor (FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, RNA: Ribonukleinsäure, RT-PCR: reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, RT-qPCR: real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Studie/Autoren	Probenmaterial	Probenanzahl	Art der PCR	Sensitivität	Spezifität
FOLEY et al. (1998)	Liquor	FIP (n = 24) Kontrollen (n = 3)	RT-PCR	21 %	100 %
FOLEY et al. (1998)	Liquor	FIP mit neurologischen Symptomen (n = 16) Kontrollen mit neurologischen Symptomen (n = 3)	RT-PCR	31 %	100 %
DOENGES et al. (2016)	Liquor	FIP (n = 19) Kontrollen (n = 15)	RT-qPCR	42 %	100 %
DOENGES et al. (2016)	Liquor	FIP mit neurologischen und/oder okulären Symptomen (n = 7) Kontrollen mit neurologischen und/oder okulären Symptomen (n = 3)	RT-qPCR	86 %	100 %

2.2.1.5. Anderes Material

Ein anderes Material, das zur Untersuchung mittels RT-PCR zur Verfügung steht, ist z. B. das Augenkammerwasser. Der diagnostische Nutzen einer RT-PCR aus Kammerwasser wurde bislang noch nicht in Studien untersucht. Ein Fallbericht zeigte, dass die RT-PCR aus Kammerwasser bei drei von zehn Katzen mit Uveitis positiv verlief, allerdings gab es keine eindeutig definierten FIP- und Kontrollgruppen (JINKS et al., 2016).

2.2.2. Nachweis von felinem Coronavirus-Antigen in Makrophagen

Monozyten/Makrophagen sind die Zielzellen der Vermehrung des FIPV (WEISS & SCOTT, 1981a, 1981b; STODDART & SCOTT, 1989; KIPAR et al., 1998a; KIPAR et al., 2005; CORNELISSEN et al., 2007). Sowohl FECV als auch FIPV

können sich in Monozyten/Makrophagen vermehren und zu einer Monozyten-assoziierten Virämie führen (GUNN-MOORE et al., 1998b; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006a; KIPAR et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012). Allerdings wurde bislang angenommen, dass nur FIPV in der Lage ist, in so ausreichendem Maße in den Zellen zu replizieren, dass sich virales Antigen intrazellulär in den Makrophagen anfärben lässt (ADDIE et al., 2009).

2.2.2.1. Gewebe

Die Immunhistochemie (IHC) aus histologisch verändertem Gewebe gilt als der Goldstandard zur Diagnose der FIP (KIPAR et al., 1998a; ADDIE et al., 2004b; PEDERSEN, 2009; GIORI et al., 2011; KIPAR & MELI, 2014). Die ersten Berichte über den immunhistochemischen Nachweis von FCoV-Antigen im Gewebe von an FIP erkrankten Katzen stammen aus dem Jahr 1989. Eine Studie beschrieb den Nachweis von FCoV-Antigen in Epithelzellen des dritten Augenlides mittels indirekter Immunfluoreszenz aus Abklatschpräparaten (HOK, 1989). Eine andere Studie verwendete eine Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode zum Nachweis von FCoV in Paraffinschnitten verschiedener Organe (WALTER et al., 1989). Die Anfärbung des Virus-Antigens mittels indirekter Immunfluoreszenz in Kryoschnitten verschiedener Gewebe (HOK, 1990, 1991) und mittels IHC in gewebeständigen Makrophagen in durch FIP verursachten Läsionen (histopathologisch festgestellt) wurde seitdem mehrfach beschrieben (TAMMER et al., 1995; KIPAR et al., 1998a). Die IHC erreichte eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 100 %. Untersucht wurden Katzen mit histopathologisch bestätigter FIP und Kontroll-Katzen mit anderen histopathologisch diagnostizierten Erkrankungen (TAMMER et al., 1995). Eine Übersicht über verschiedene Studien zum Antigen-Nachweis in Makrophagen im Gewebe ist in Tabelle 9 dargestellt.

Oft wird die IHC erst *post mortem* durchgeführt, da die Entnahme der Gewebeproben *ante mortem* mittels Laparotomie oder Laparoskopie sehr invasiv ist. Aufgrund der variablen Verteilung des FCoV-Antigens innerhalb FIP-induzierter Gewebeläsionen (KIPAR et al., 1998a) müssen oft mehrere Organe biopsiert werden, um eine positive Anfärbung des Antigens zu erzielen. Die Aussagekraft der Verwendung von perkutan entnommenen Feinnadelaspirationsbiopsien (FNA) oder Tru-cut-Biopsien zum immunzyto-/immunhistochemischen Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen in Leber

und Niere wurde als weniger invasive diagnostische Methode evaluiert. Aufgrund der niedrigen Sensitivität von sowohl Tru-cut-Biopsien (24 % für Leber, 31 % für Niere) als auch FNA (17 % – 31 % für Leber (je nach Technik), 11 % – 20 % für Niere) waren diese Arten der Gewebe-/Zell-Entnahme für den Antigen-Nachweis in Makrophagen jedoch nicht zu empfehlen. Da nur Katzen mit FIP (histopathologisch bestätigt) untersucht wurden, konnte über die Spezifität keine Aussage gemacht werden (GIORDANO et al., 2005).

Tabelle 9: Studien zur Evaluation des Nachweises von FCoV-Antigen im Gewebe (FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, FNA: Feinnadelaspirationsbiopsie, ICC: Immunzytochemie, IHC: Immunhistochemie, k. A.: keine Angabe)

Studie/Autoren	Probenmaterial	Probenanzahl	Art des Antigen-Nachweises	Sensitivität	Spezifität
TAMMER et al. (1995)	Verschiedene Gewebe	FIP (n = 102) Kontrollen (n = 6)	IHC	98 %	100 %
GIORDANO et al. (2005)	Tru-cut-Biopsien Leber	FIP (n = 25)	IHC	24 %	k. A.
GIORDANO et al. (2005)	Tru-cut-Biopsien Niere	FIP (n = 18)	IHC	31 %	k. A.
GIORDANO et al. (2005)	FNA Leber	FIP (n = 22)	ICC	17 % – 31 %	k. A.
GIORDANO et al. (2005)	FNA Niere	FIP (n = 24)	ICC	11 % – 20 %	k. A.

Die IHC wurde auch genutzt, um FCoV in Makrophagen in eher ungewöhnlichen Geweben oder bei Großkatzen nachzuweisen. So wurde FCoV in der Haut zweier Katzen mit atypischen Hautläsionen (DECLERCQ et al., 2008; BAUER et al., 2013), in verschiedenen Geweben eines Pumas (STEPHENSON et al., 2013), im Auge eines Löwen (MWASE et al., 2015) und im Penisgewebe eines Katers (ROTA et al., 2008) angefärbt.

2.2.2.2. Erguss

In der Ergussflüssigkeit wird für den Antigen-Nachweis meist eine Immunfluoreszenzfärbung verwendet. So kann FCoV mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper im Zytoplasma von Makrophagen angefärbt

werden (CAMMARATA PARODI et al., 1993). In früheren Studien wurde für diesen Test eine ausgezeichnete Spezifität von 100 % für die Diagnose der FIP ermittelt. Man ging daher davon aus, dass ein positives Testergebnis eine definitive Diagnosestellung ermöglichen würde (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003). In einer neueren Studie wurden hingegen auch positive Ergebnisse in der Immunfluoreszenzfärbung bei Katzen mit Körperhöhlenergüssen aufgrund anderer Erkrankungen gefunden (LITSTER et al., 2013). Die Spezifität wurde in dieser Studie mit 71 % angegeben. Mögliche Ursachen für die „falsch-positiven“ Ergebnisse sind beispielsweise die Bindung der verwendeten Antikörper an andere als virale Strukturen innerhalb der Makrophagen oder Kontamination während des Testverfahrens (LITSTER et al., 2013).

Die Sensitivität des Immunfluoreszenz-Tests war in den meisten Studien mit 57 % – 95 % relativ niedrig; ein negatives Testergebnis kann demnach nicht zum Ausschluss der FIP herangezogen werden (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003). Die hohe Anzahl an falsch-negativen Ergebnissen kann mit einer zu geringen Anzahl von Makrophagen in einigen Ergussproben erklärt werden (HARTMANN et al., 2003). Auch die kompetitive Bindung des FCoV-Antigens durch zirkulierende Antikörper im Erguss, das damit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern nicht mehr zur Verfügung steht, kommt als mögliche Ursache für falsch-negative Ergebnisse infrage; in einer Studie hatten alle Katzen mit falsch-negativem Antigen-Nachweis im Erguss Antikörper im Serum oder Punktat (HIRSCHBERGER et al., 1995). Eine neuere Studie ermittelte, im Gegensatz zu den Resultaten vorhergehender Studien, eine Sensitivität von 100 % (LITSTER et al., 2013). Diese Studie untersuchte ausschließlich *ante mortem* gewonnene Ergussproben, anders als manche frühere Studien, die sowohl *ante mortem* als auch *post mortem* gewonnene Proben verwendeten (CAMMARATA PARODI et al., 1993; PALTRINIERI et al., 1999). Zudem wurde in der neuen Studie ein Biotin-gekoppelter monoklonaler anti-FCoV-Antikörper verwendet (LITSTER et al., 2013), während zuvor Fluoreszein-markierte polyklonale anti-FCoV-Antiseren verwendet wurden (CAMMARATA PARODI et al., 1993; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003). Außerdem wurden die vorhandenen Proben in der Studie von LITSTER und Mitarbeitern (2013)

innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme untersucht. Mit wachsender Zeitspanne zwischen Probengewinnung und Testdurchführung war eine Abnahme der Sensitivität zu beobachten. Bei Lagerung der Ergussproben bei 4 °C oder auch bei Raumtemperatur konnte FCoV-Antigen aber zumindest für zwei Tage mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (LITSTER et al., 2013). Eine Übersicht über die Ergebnisse der verschiedenen Studien zum Antigen-Nachweis im Erguss ist in Tabelle 10 zu finden. Die Diagnose der FIP erfolgte in diesen Studien entweder histopathologisch (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; LITSTER et al., 2013) oder immunhistochemisch (PALTRINIERI et al., 1999). Die Kontroll-Gruppen bestanden aus Katzen mit FIP-typischen Symptomen, bei denen eine andere Erkrankung diagnostiziert wurde (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003; LITSTER et al., 2013).

Tabelle 10: Studien zur Evaluation des Nachweises von FCoV-Antigen im Erguss (FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis)

Studie/Autoren	Probenmaterial	Probenanzahl	Art des Antigen-Nachweises	Sensitivität	Spezifität
CAMMARATA PARODI et al. (1993)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 21) Kontrollen (n = 11)	Immunfluoreszenz	95 %	100 %
HIRSCHBERGER et al. (1995)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 49) Kontrollen (n = 50)	Immunfluoreszenz	69 %	100 %
PALTRINIERI et al. (1999)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 79) Kontrollen (n = 31)	Immunfluoreszenz	95 %	100 %
HARTMANN et al. (2003)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 109) Kontrollen (n = 62)	Immunfluoreszenz	57 %	100 %
LITSTER et al. (2013)	Aszites oder Thoraxerguss	FIP (n = 10) Kontrollen (n = 7)	Immunfluoreszenz	100 %	71 %

2.2.2.3. Liquor

Bei einer Katze mit neurologischer Manifestation der FIP wurde FCoV mittels immunzytochemischer Anfärbung auch in Makrophagen des Liquors nachgewiesen (IVES et al., 2013). Eine aktuelle prospektive Studie ermittelte eine Sensitivität von 85 % und eine Spezifität von 83 % für den immunzytochemischen Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen im Liquor von Katzen mit Verdacht auf FIP, die teilweise neurologische Symptome aufwiesen (Tabelle 11). Bei einem Teil der Katzen wurde immunhistochemisch FIP diagnostiziert, die anderen Katzen hatten eine andere Erkrankung und wurden als Kontroll-Katzen eingeschlossen. Wurden nur Katzen mit neurologischen Symptomen betrachtet, so betrug die Sensitivität 78 %, die Spezifität 88 %. Bei Evaluation ausschließlich der Katzen ohne neurologische Symptome betrug die Sensitivität 91 %, die Spezifität 50 % (GRUENDL et al., 2016).

Tabelle 11: Evaluation des Nachweises von FCoV-Antigen im Liquor (FCoV: felines Coronavirus, FIP: feline infektiöse Peritonitis, ICC: Immunzytochemie)

Studie/Autoren	Probenanzahl	Art des Antigen-Nachweises	Sensitivität	Spezifität
GRUENDL et al. (2016)	FIP (n = 20) Kontrollen (n = 18)	ICC	85 %	83 %
GRUENDL et al. (2016)	FIP mit neurologischen Symptomen (n = 9) Kontrollen mit neurologischen Symptomen (n = 16)	ICC	78 %	88 %
GRUENDL et al. (2016)	FIP ohne neurologische Symptome (n = 11) Kontrollen ohne neurologische Symptome (n = 2)	ICC	91 %	50 %

III. PUBLIKATION 1

Sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction detecting feline coronavirus mutations in effusion and serum/plasma to diagnose feline infectious peritonitis

Sandra Felten¹

Christian M. Leutenegger², Dr. med. vet., PhD

Hans-Joerg Balzer³, Dr. rer. nat.

Nikola Pantchev³, Dr. med. vet.

Kaspar Matiasek⁴, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Associate Member ECVN

Gerhard Wess¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine), Dipl. ECVIM-CA (Cardiology), Dipl. ACVIM (Cardiology)

Herman F. Egberink⁵, DVM, PhD, Associate Prof.

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

² IDEXX Laboratories, Inc., West Sacramento, USA

³ IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

⁴ Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

-
- ⁵ Faculty of Veterinary Medicine, Department of Infectious Diseases and Immunology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

BMC Veterinary Research, veröffentlicht

BMC Veterinary Research 2017; 13(1): 228; doi: 10.1186/s12917-017-1147-8.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction detecting feline coronavirus mutations in effusion and serum/plasma of cats to diagnose feline infectious peritonitis

Sandra Felten^{1*}, Christian M. Leutenegger², Hans-Joerg Balzer³, Nikola Pantchev³, Kaspar Matiasek⁴, Gerhard Wess¹, Herman Egberink⁵ and Katrin Hartmann¹

Abstract

Background: Feline coronavirus (FCoV) exists as two pathotypes, and FCoV spike gene mutations are considered responsible for the pathotypic switch in feline infectious peritonitis (FIP) pathogenesis. The aim of this study was to evaluate sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) specifically designed to detect FCoV spike gene mutations at two nucleotide positions. It was hypothesized that this test would correctly discriminate feline infectious peritonitis virus (FIPV) and feline enteric coronavirus (FECV).

Methods: The study included 63 cats with signs consistent with FIP. FIP was confirmed in 38 cats. Twenty-five control cats were definitively diagnosed with a disease other than FIP. Effusion and/or serum/plasma samples were examined by real-time RT-PCR targeting the two FCoV spike gene fusion peptide mutations M1058 L and S1060A using an allelic discrimination approach. Sensitivity, specificity, negative and positive predictive values including 95% confidence intervals (95% CI) were calculated.

Results: FIPV was detected in the effusion of 25/59 cats, one of them being a control cat with chronic kidney disease. A mixed population of FIPV/FECV was detected in the effusion of 2/59 cats; all of them had FIP. RT-PCR was negative or the pathotype could not be determined in 34/59 effusion samples. In effusion, sensitivity was 68.6% (95% CI 50.7–83.2), specificity was 95.8% (95% CI 78.9–99.9). No serum/plasma samples were positive for FIPV.

Conclusions: Although specificity of the test in effusions was high, one false positive result occurred. The use of serum/plasma cannot be recommended due to a low viral load in blood.

Keywords: Feline infectious peritonitis (FIP), Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), Feline coronavirus (FCoV), Feline enteric coronavirus (FECV), Feline infectious peritonitis virus (FIPV)

* Correspondence: sfelten@medizinische-kleintierklinik.de

¹Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The key event in the pathogenesis of feline infectious peritonitis (FIP) is the switch in viral cell tropism, which originates from mutations of the feline coronavirus (FCoV) genome [1]. According to the internal mutation hypothesis, feline infectious peritonitis virus (FIPV) emerges from feline enteric coronavirus (FECV) by spontaneous mutations within an infected cat [2, 3]. While FECV causes asymptomatic infection or mild enteritis and is widespread among the cat population [4–6] and especially common in multi-cat environments [7–9], FIPV causes FIP, a lethal immune-mediated disease [10, 11]. FECV has a tropism for the small intestine apical villi epithelium [4, 12], while FIPV can infect monocytes/macrophages and replicate sufficiently within these cells to allow systemic spread and macrophage activation [13].

Mutations in the FCoV spike gene and resulting amino acid substitutions in the spike protein are considered responsible for the acquisition of macrophage tropism due to the spike protein's role in receptor binding and cell entry [14–16]. Although amino acid substitutions M1058L and S1060A within the spike protein correlated with the FIP phenotype in >95% of cases in one study [15], a subsequent study found them to be rather associated with systemic spread of FCoV in cats with and without FIP [14]. Focusing on a furin cleavage site in the region between receptor-binding and fusion domains of the spike gene, a recent study detected functionally relevant mutations strongly correlated with FIP and documented the emergence of one of these substitutions in a cat during the development of FIP [16].

Definitive ante-mortem diagnosis currently still requires invasive tissue sample collection for immunohistochemical demonstration of FCoV antigen in macrophages in tissue lesions [17–20]. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is frequently applied to detect FCoV RNA in diagnostic samples, and recent studies reported relatively satisfying results for real-time RT-PCR results using different materials [21–23]. Nevertheless, standard RT-PCR cannot distinguish FECV from FIPV and has been shown to detect FCoV RNA also in the blood of healthy cats that never developed FIP [24, 25].

Therefore, it was the aim of this study to evaluate sensitivity and specificity of a real-time RT-PCR (FIP Virus RealPCR Test, IDEXX Laboratories) able to discriminate between FECV and FIPV in effusions and serum/plasma. It was hypothesized that this discriminative PCR would correctly identify FIPV and thus, would be a non-invasive and reliable method to definitively diagnose FIP.

Methods

Animals

Overall, 63 cats with signs consistent with FIP were included in the study. All cats were presented either as

sick feline patients ($n = 48$) or directly submitted for necropsy ($n = 15$).

For 38 cats (FIP group, Table 1), a definitive diagnosis of FIP was established post-mortem either by histopathology ($n = 10$) (Fig. 1a-c), or by histopathology and immunohistochemical (IHC) staining of FCoV antigen in tissue samples (Fig. 1d) obtained at necropsy ($n = 28$). In the cats with histopathological confirmation, a diagnosis of FIP was based on the occurrence of effusions (Fig. 1a) and/or yellow to white foci or nodules in different organs (Fig. 1b) plus presence of typical histological lesions, including plasma-cellular perivascularitis and/or accumulation of plasma cells accompanied by a necropurulent inflammation (Fig. 1c).

Cats in the control group ($n = 25$) were suspected of having FIP (Table 2) based on the existence of one or more of the following signs consistent with FIP: effusion ($n = 24$), fever with $\leq 20,000$ white blood cells/ μL and ≤ 1000 band neutrophils/ μL ($n = 1$), icterus ($n = 2$), or neurological signs ($n = 1$). Some of the included cats showed several of these signs. For all cats in the control group, a disease other than FIP was definitively diagnosed either at full post-mortem examination plus histopathology ($n = 10$), by histopathology of organ samples obtained post-mortem ($n = 1$), by bacterial culture and cytology diagnosing bacterial pleuritis ($n = 2$), by echocardiography diagnosing decompensated cardiac disease explaining pleural or abdominal effusion ($n = 7$), or by cytology diagnosing neoplasia ($n = 5$).

Samples

In total, 59 effusion samples and 17 serum/plasma samples were collected between 2009 and 2014. Effusion fluids (34 ascites, 25 pleural effusions) of 43 cats (25 with FIP, 18 controls) were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and effusion fluids of 16 cats (ten with FIP, six controls) were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Of twelve of the cats (nine with FIP, three controls) for which blood was available, plasma was obtained and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 2 mL low temperature freezer vials (VWR International GmbH) until assayed. Of the remaining five cats (all of them had FIP) for which blood was available, serum was obtained and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1.5 mL Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tubes (Eppendorf GmbH) until assayed.

All samples collected ante-mortem were originally obtained for diagnostic and, in the case of effusion, also for therapeutic purposes.

Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed blinded with regard to the final diagnosis.

Total nucleic acid was extracted from effusion and serum/plasma samples by QIAamp DNA Blood BioRobot MDx Kit on an automated Qiagen platform (QIAGEN

Table 1 Detailed information for cats of the feline infectious peritonitis (FIP) group

cat	symptoms leading to inclusion	diagnosis	method of confirmation of diagnosis	samples available	result of RT-PCR of effusion samples	result of RT-PCR of serum/plasma samples	detected mutation
1	pleural effusion, fever, uveitis	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
2	pleural effusion	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	negative	n.d.	n.d.
3	ascites, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
4	ascites, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
5	ascites, fever, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
6	ascites, fever, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	mixed	n.d.	n.d.
7	ascites, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
8	ascites, neurological signs, uveitis	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
9	ascites	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	BLD	n.d.	n.d.
10	ascites	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	BLD	n.d.	n.d.
11	ascites, icterus, hyperglobulinemia	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion and plasma	FIPV	BLD	M1058L
12	fever, icterus, neurological signs, hyperglobulinemia	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	plasma	n.d.	negative	n.d.
13	ascites, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
14	ascites	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
15	ascites, fever, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion and plasma	FIPV	negative	M1058L
16	ascites, fever, hyperglobulinemia, uveitis	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion and plasma	FIPV	negative	M1058L
17	ascites, icterus, neurological signs, hyperglobulinemia	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
18	ascites, fever, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
19	ascites, fever, hyperglobulinemia	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	plasma	n.d.	negative	n.d.
20	pleural effusion, fever, hyperglobulinemia	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion and plasma	FIPV	negative	M1058L
21	ascites	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion and plasma	mixed	negative	n.d.
22	ascites	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	BLD	n.d.	n.d.
23	ascites	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion and plasma	IND	negative	n.d.
24	ascites, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion and plasma	FIPV	negative	M1058L
25	ascites, icterus, hyperglobulinemia	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
26	ascites, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
27	ascites, icterus, hyperglobulinemia	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
28	ascites and pleural effusion, icterus	FIP	histopathology	serum	n.d.	negative	n.d.
29	ascites, fever, hyperglobulinemia, uveitis	FIP	histopathology	effusion and serum	BLD	negative	n.d.

Table 1 Detailed information for cats of the feline infectious peritonitis (FIP) group (Continued)

30	ascites	FIP	histopathology	effusion	IND	n.d.	n.d.
31	pleural effusion, fever	FIP	histopathology	effusion and serum	BLD	negative	n.d.
32	pleural effusion, icterus	FIP	histopathology	effusion and serum	FIPV	negative	M1058L
33	ascites, fever, icterus	FIP	histopathology	effusion	IND	n.d.	n.d.
34	ascites, icterus	FIP	histopathology	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
35	ascites, icterus	FIP	histopathology	effusion and serum	BLD	BLD	n.d.
36	pleural effusion, fever, uveitis	FIP	histopathology	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
37	pleural effusion, icterus, hyperglobulinemia	FIP	histopathology	effusion	BLD	n.d.	n.d.
38	ascites, icterus	FIP	histopathology plus immunohistochemistry	effusion	FIPV	n.d.	M1058L

BLD feline coronavirus present, but below limit of detection, *FIP* feline infectious peritonitis, *FIPV* feline coronavirus present, but indeterminate sequence variations, *n.d.* not determined, *RT-PCR* reverse transcriptase polymerase chain reaction

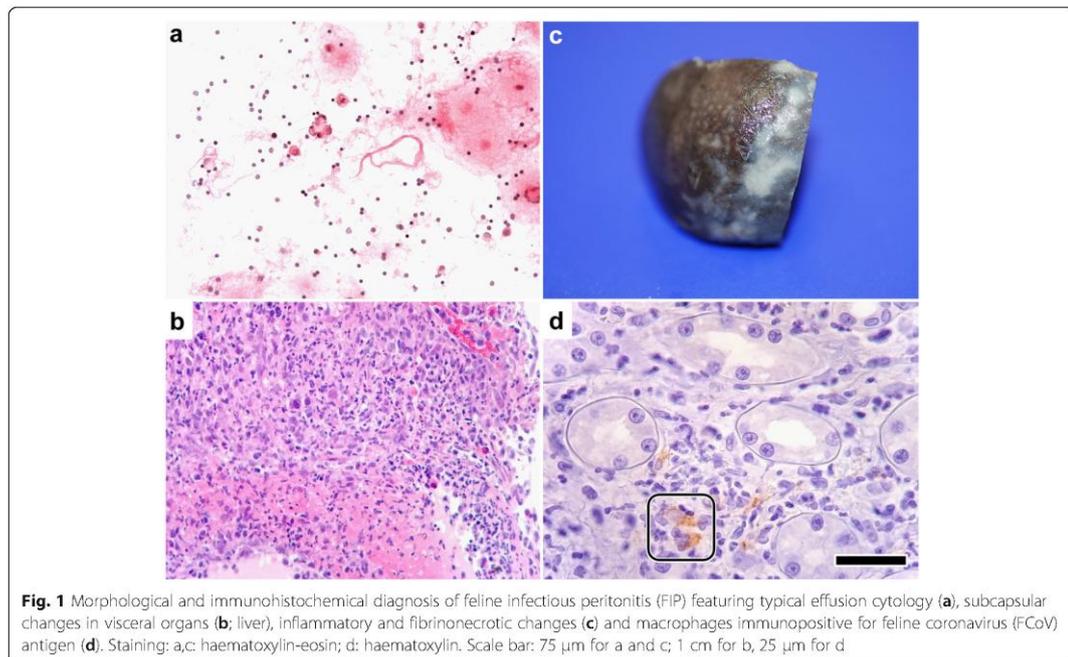


Fig. 1 Morphological and immunohistochemical diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP) featuring typical effusion cytology (a), subcapsular changes in visceral organs (b; liver), inflammatory and fibrinonecrotic changes (c) and macrophages immunopositive for feline coronavirus (FCoV) antigen (d). Staining: a,c: haematoxylin-eosin; d: haematoxylin. Scale bar: 75 μ m for a and c; 1 cm for b, 25 μ m for d

GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer instructions with slight modifications. In order to first detect FCoV and second to pathotype the FCoV strain, three real-time PCR assays were performed in parallel as singleplex reactions at a commercial reference laboratory (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany); the first real-time PCR was based on the 7b gene [26] to quantify viral load, the other two real-time PCRs were targeting the M1058L and S1060A single nucleotide polymorphisms described before to correlate with the occurrence of the lethal FIPV genotype [15]. These two PCR tests allow typing of an FCoV strain based on the presence (FIPV) or absence (FECV) of one of two single nucleotide polymorphisms within the fusion peptide of the spike gene. Briefly, highly specific hydrolysis probes were designed to either detect the mutation at position 3174 or 3180 (corresponding to amino acid positions 1058 and 1060, M1058L and S1060A of reference sequence FJ938051 [15], respectively) or wild-type sequences by using an allelic discrimination approach using real-time PCR. Fluorescence intensities were used to calculate ratios of the probes detecting the mutation or the wildtype sequences. FIPV was assigned if the mutation probe exceeded a 2-fold higher fluorescence than the wildtype probe.

Real-time PCR was run with six quality controls (Table 3).

Interpretation of real-time RT-PCR results

According to the outcome of the typing assay, there were six possible results of the real-time RT-PCR.

1. Pathotype FIPV: The mutated pathotype (containing either M1058L or S1060A) was detected in the sample.
2. Pathotype FECV: Feline enteric coronavirus without spike gene mutations was detected in the sample.
3. Mixed pathotype: A mixed population of FECV and FIPV was detected in the sample.
4. Below limit of detection (BLD): FCoV RNA viral load was low (below 1.5 million viral RNA equivalents per mL of sample). Owing to the insufficient number of viral RNA targets, pathotyping was not possible.
5. Indeterminate (IND): FCoV RNA viral load was high (above 1.5 million viral RNA equivalents per mL of sample), but pathotyping was not possible due to the occurrence of an unknown FCoV strain (failed amplification) or infection with a serotype II FCoV strain.
6. Negative: No FCoV RNA was detected in the sample.

Statistical evaluation

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and overall accuracy

Table 2 Detailed information for cats of the control group

cat	symptoms leading to inclusion	diagnosis	method of confirmation of diagnosis	samples available	result of RT-PCR of effusion samples	result of RT-PCR of serum/plasma samples	detected mutation
1	pleural effusion	bacterial pleuritis	bacterial culture and cytology	effusion	negative	n.d.	n.d.
2	pleural effusion	chronic kidney disease, hypertensive encephalopathy; effusion most likely due to hypervolemia	full post-mortem examination including histopathology	effusion	FIPV	n.d.	M1058L
3	pleural effusion	decompensated cardiac disease	echocardiography	effusion	negative	n.d.	n.d.
4	pleural effusion	decompensated cardiac disease	echocardiography	effusion	negative	n.d.	n.d.
5	ascites	persistent foramen ovale	histopathology	effusion	negative	n.d.	n.d.
6	pleural effusion	decompensated cardiac disease	echocardiography	effusion	negative	n.d.	n.d.
7	pleural effusion	decompensated cardiac disease	echocardiography	effusion	negative	n.d.	n.d.
8	ascites	invasive pancreatic adenocarcinoma	histology of organ samples (obtained post-mortem)	effusion	negative	n.d.	n.d.
9	pleural effusion	decompensated cardiac disease	echocardiography	effusion	negative	n.d.	n.d.
10	pleural effusion	pulmonary adenocarcinoma	full post-mortem examination including histopathology	effusion	negative	n.d.	n.d.
11	pleural effusion	carcinoma	cytology	effusion	negative	n.d.	n.d.
12	ascites	carcinoma	cytology	effusion	negative	n.d.	n.d.
13	pleural effusion	lymphoma	cytology	effusion	negative	n.d.	n.d.
14	ascites	lymphoma	full post-mortem examination including histopathology	effusion and plasma	negative	negative	n.d.
15	pleural effusion	decompensated cardiac disease	echocardiography	effusion	negative	n.d.	n.d.
16	pleural effusion, neurological signs	carcinoma	full post-mortem examination including histopathology	effusion and plasma	negative	negative	n.d.
17	pleural effusion	chronic cardiomyopathy	full post-mortem examination including histopathology	effusion	negative	n.d.	n.d.
18	fever, icterus	cholangiohepatitis	full post-mortem examination including histopathology	plasma	n.d.	negative	n.d.
19	pleural effusion	pulmonary adenocarcinoma	full post-mortem examination including histopathology	effusion	negative	n.d.	n.d.
20	pleural effusion	lymphoma	full post-mortem examination including histopathology	effusion	negative	n.d.	n.d.
21	pleural effusion and ascites	malignant round cell tumor	cytology	effusion	BLD	n.d.	n.d.
22	pleural effusion	lymphoma	cytology	effusion	BLD	n.d.	n.d.
23	pleural effusion	decompensated cardiac disease	echocardiography	effusion	negative	n.d.	n.d.
24	pleural effusion	bacterial pleuritis	bacterial culture and cytology	effusion	negative	n.d.	n.d.
25	ascites	cholangiocarcinoma	full post-mortem examination including histopathology	effusion	negative	n.d.	n.d.

BLD feline coronavirus present, but below limit of detection, FIPV feline infectious peritonitis virus, n.d. not determined, RT-PCR reverse transcriptase polymerase chain reaction

Table 3 Details of the six quality controls used in the real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

quality controls	goal of quality controls
1 PCR positive controls (quantitatively, using synthetic DNA covering the real-time PCR target region (Integrated DNA Technologies IDT, Coralville, IA, USA))	functionality of PCR test protocols
2 PCR negative controls (PCR-grade nuclease free water)	absence of contamination in reagents
3 negative extraction controls (extraction positions filled with lysis solution and PCR-grade nuclease free water only)	absence of cross-contamination during the extraction process
4 RNA pre-analytical quality control targeting feline ssr rRNA (18S rRNA) gene complex	quality and integrity of the RNA as a measure of sample quality
5 a swab-based environmental contamination monitoring control	absence of contamination in laboratory
6 spike-in internal positive control (using lambda phage DNA)	absence of PCR inhibitory substances as a carryover from sample matrix

(sum of true positive and true negative test results divided by the total number of test results) were calculated using a four-field-chart. To quantify uncertainty, 95% confidence intervals (95% CI) were calculated. A sample containing a mixed pathotype was defined as a positive result. Samples typed as BLD or IND were defined as a negative result, as no pathotype could be determined.

Results

The FIPV pathotype was detected in 25/59 effusion samples. Of these, 24 were from cats with FIP, but one effusion sample from a control cat was also positive for FIPV with mutation M1058L. Mutation M1058L was found in 23/25 FIPV samples. Mutation S1060A was found in none of the FIPV samples. A mixed pathotype of FIPV and FECV was detected in 2/59 effusion samples (all from cats with FIP). In 12/59 effusion samples, FCoV RNA was detected, but pathotyping was not possible (BLD or IND). The remaining 22/59 effusion samples did not contain FCoV RNA (Tables 1, 2, 4, and 5).

Real-time RT-PCR was negative in 15/17 serum/plasma samples. In the remaining two serum/plasma samples (all from cats with FIP), FCoV RNA could be detected, but only in low concentrations (BLD). Therefore, the pathotype could not be determined. None of the serum/plasma samples of control cats contained FCoV RNA (Tables 1, 2, 6, and 7).

Sensitivity, specificity, PPV, NPV, and overall accuracy are shown in Table 8.

Discussion

This study evaluated the use of a new diagnostic test which is able to distinguish FIPV from FECV pathotypes in the diagnosis of FIP based on the presence of mutation M1058L or S1060A in the FCoV spike protein.

In a lethal disease like FIP, specificity of a diagnostic test is more important than sensitivity, because it helps to prevent euthanasia of cats misdiagnosed with FIP. Specificity of the real-time RT-PCR in effusion was 95.8%. The FIPV pathotype (M1058L) was found in an effusion sample from one control cat that had chronic kidney disease. There are several reasons that could explain this positive result. First, FCoV spike protein mutations M1058L and S1060A have previously been discussed as being a marker for the systemic spread of the virus rather than for the FIP phenotype, since they could also be found in tissue samples of healthy cats infected with FCoV [14]. If this was correct, then it would be possible that the cat was infected with a “benign” FCoV that spread systemically and therefore exhibited mutation M1058L. Second, full post-mortem examination including histopathology was performed in the cat and did not reveal any typical changes indicative of FIP. Nevertheless, it cannot be excluded that the cat suffered from early-stage FIP in addition to chronic kidney disease, but histopathological changes of FIP were still absent. Finally, it is possible that the result was a true false positive due to a methodological error.

The effusion samples of two control cats contained FCoV RNA but the pathotype could not be determined due to a low virus load (BLD). If a PCR had been used

Table 4 Results of effusion samples ($n = 59$)

group	FIPV ^a M1058L	FIPV ^a S1060A	FECV ^b	mixed pathotype ^a	BLD ^b	IND ^b	negative ^b	total
FIP	22	0	0	2	7	3	1	35
controls	1	0	0	0	2	0	21	24
total	23	0	0	2	9	3	22	59

BLD feline coronavirus present, but below limit of detection, FECV feline enteric coronavirus, FIP feline infectious peritonitis, FIPV feline infectious peritonitis virus, IND feline coronavirus present, but indeterminate sequence variations

^aDefined as positive for statistical analysis

^bDefined as negative for statistical analysis

Table 5 Results of effusion samples^a

	FIP	control	total
positive	24	1	25
negative	11	23	34
total	35	24	59

FIP feline infectious peritonitis

^aBLD (feline coronavirus present, but below limit of detection) and IND (feline coronavirus present, but indeterminate sequence variations) were defined as negative for statistical analysis, as the pathotype could not be determined. A mixed pathotype of feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus was defined as positive, as the mutated pathotype was detected

that was not able to differentiate pathotypes, these cats would have falsely been diagnosed as having FIP. This fact emphasizes that the detection of any FCoV in effusion is not accurate enough to establish the diagnosis FIP. It has been shown previously that FECV can circulate systemically in blood monocytes during initial infection [12].

A moderate sensitivity of 68.6% was found in effusion in the present study. This is comparable to or even lower than sensitivities reported in recent studies (65–89%) for different RT-PCR assays of effusions [22, 23, 27]. Most of these earlier studies determined the sensitivity of a RT-PCR that did not distinguish the two FCoV pathotypes [22, 23]. In contrast, the present study was designed to allow pathotyping of FCoV. In order to prevent false positive real-time RT-PCR results arising from the detection of rare random spike gene mutations, the degree of fluorescence for the reported pathotype needed to exceed twice that of the other pathotype. Therefore, even FCoV-positive samples were regarded as negative for the calculation of sensitivity if they did not allow definitive determination of either FIPV or FECV. Three of the effusion samples from cats with FIP typed as IND (high viral load but pathotyping was not possible) and therefore were considered negative for the calculation of sensitivity despite a high viral load. Additionally, in two of the serum/plasma and seven of the effusion samples from cats with FIP, FCoV RNA was detected, but the concentration was too low to allow pathotyping and therefore, these samples also were considered negative for the calculation of sensitivity. If sensitivity of the real-time RT-PCR had only been calculated for the detection of FCoV in general in the study

population, then sensitivity would have been much better (97.1% for effusion and 14.3% for serum/plasma).

The FIPV pathotype was detected in the majority (24/34, 71%) of FCoV-positive effusion samples from cats with FIP. Substitution M1058L was found in 22/34 (65%), substitution S1060A in 0/34. These results are quite similar to a recent study detecting M1058L in 65% and S1060A in 6% of FCoV-positive effusions from cats with FIP [23]. Two of the effusion samples of cats with FIP were typed as mixed pathotype, meaning that populations of FECV and FIPV were present in the cat at the same time. It is likely that these cats were in an early stage during the transition of FECV to FIPV. Additionally, it is conceivable that these cats with FIP were superinfected with an FECV, as described previously [28, 29], and that their effusion samples were tested positive for both pathotypes due to leakage of FECV into the effusion.

As stated before, three of the effusion samples of cats with FIP typed as IND (high virus load but pathotyping was not possible). The reason for this might be the existence of unknown spike gene sequence variations in the sample, which are not recognized by the current primer set. Since the spike gene assay is specific for serotype I FCoV, infection with a serotype II FCoV also could cause typing as IND. Cats with FIP have been shown to exhibit higher viral loads than healthy FECV-infected cats [30] and therefore, if a sample is typed as IND, it is likely that the cat has FIP. Possibly, these cats exhibited alternative mutations in other parts of their genome that are characteristic for the development of the FIPV genotype. The 3c gene and other regions in the S1 and S2 domains of the spike gene have been identified as other potential sites for mutation(s) involved in FIP pathogenesis [16, 28, 29, 31, 32]. For example, variations in a furin cleavage site in the region between receptor-binding (S1) and fusion (S2) domains of the spike gene were detected when comparing FECV and FIPV sequences [16]. Another study compared FCoV from FIP lesions with FCoV from the feces of healthy cats and identified a consistent substitution of isoleucine with threonine at position 1108 of the spike protein in cats with FIP [32]. Additionally, mutations of the 3c gene might contribute to FIP pathogenesis. Mutations in this gene were observed in the majority of FIPV, whereas an intact 3c gene

Table 6 Results of serum/plasma samples (n = 17)

group	FIPV ^a M1058L	FIPV ^a S1060A	FECV ^b	mixed pathotype ^a	BLD ^b	IND ^b	negative ^b	total
FIP	0	0	0	0	2	0	12	14
controls	0	0	0	0	0	0	3	3
total	0	0	0	0	2	0	15	17

BLD feline coronavirus present, but below limit of detection, FECV feline enteric coronavirus, FIP feline infectious peritonitis, FIPV feline infectious peritonitis virus,

IND feline coronavirus present, but indeterminate sequence variations

^aDefined as positive for statistical analysis

^bDefined as negative for statistical analysis

Table 7 Results of serum/plasma samples^a

	FIP	control	total
positive	0	0	0
negative	14	3	17
total	14	3	17

FIP feline infectious peritonitis

^aBLD (feline coronavirus present, but below limit of detection) and IND (feline coronavirus present, but indeterminate sequence variations) were defined as negative for statistical analysis, as the pathotype could not be determined. A mixed pathotype of feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus was defined as positive, as the mutated pathotype was detected

was detected in most FECV, suggesting that the 3c gene also plays a role in the pathogenesis of FIP [28, 29, 32, 33]. It should be considered to retest cats with effusion samples typed as BLD or IND in order to increase the possibility of correctly identifying the FIPV or FECV pathotype. Additionally, an effusion sample typed as IND should at least raise a strong suspicion of FIP, especially if other clinical or laboratory parameters are indicative of FIP.

Sensitivity in serum/plasma was low, confirming recent studies [22, 34]. A low concentration of FCoV RNA was detected in the serum/plasma of two cats with FIP, but the low virus load did not allow pathotype determination. Thus, sensitivity of the real-time RT-PCR in serum/plasma was 0%. This is in contrast to results of previous studies evaluating different RT-PCR assays and reporting sensitivities of 53–87% using serum, plasma, or whole blood [24, 25, 35, 36]. Nevertheless, in regard of the findings of a recent study, a low sensitivity in blood was expected, as FCoV RNA could not be detected in the whole blood, plasma, or white cell fraction of cats with experimentally induced FIP at any stage of disease. In the cats with FIP, viremia was either non-existent, or virus load was below the detection limit [34]. It is also likely that in the present study the majority of cats with FIP either were not viremic or that FCoV RNA levels were below detection limit of the real-time RT-PCR. It could be argued that sensitivity would have been better when investigating whole blood, as FIPV replication is restricted to macrophages [34, 37, 38]. However, real-time RT-PCR of serum and peripheral

Table 8 Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, and overall accuracy of the real-time RT-PCR

	effusion	serum/plasma
sensitivity % (95% CI)	68.6 (50.7–83.2)	0 (0–23.2)
specificity % (95% CI)	95.8 (78.9–99.9)	n.d.
NPV % (95% CI)	67.6 (49.5–82.6)	17.6 (3.8–43.4)
PPV % (95% CI)	96.0 (80.0–99.9)	n.d.
overall accuracy % (95% CI)	79.7 (67.2–89.0)	17.6 (3.8–43.4)
FIP prevalence %	59.3	82.4

FIP feline infectious peritonitis, *n.d.* not determined, *NPV* negative predictive value, *PPV* positive predictive value, *RT-PCR* reverse transcriptase polymerase chain reaction, *95% CI* 95% confidence interval

blood mononuclear cells (PBMC) has been compared and both showed rather low sensitivities, even though the sensitivity of PBMC (31.6%) was slightly better than that of serum (23.1%) [22]. In general, viral load in effusion is much higher than in blood [34].

One limitation of the present study was the inclusion criterion for some of the control cats. Histopathology could not be performed in all cats and confirmation of diagnosis was therefore achieved ante-mortem in 14 of the 25 control cats. Consequently, it cannot be totally excluded that some of these cats suffered from FIP in addition to their diagnosed diseases. Nevertheless, this seems rather unlikely, as real-time RT-PCR was false positive only in one of the control cats and in this specific cat, histopathology had been performed. A second limitation of the present study is the fact that in some of the cats, only one sample type (effusion or serum/plasma) was available and overall, the number of available serum/plasma samples was rather low.

Conclusions

This study evaluated a discriminating real-time RT-PCR using effusion and/or serum/plasma in the diagnosis of FIP. The results indicate that the detection of the FIPV pathotype with substitution M1058L is very specific for the FIP phenotype and can be a useful tool in the diagnosis of FIP. Nevertheless, substitution M1058L was also detected in one control cat without FIP. As none of the FIPV-positive effusion samples contained substitution S1060A, it is considered a weak discriminatory factor for the diagnosis of FIP. The fact that in two other control cats FCoV was detected, even though the pathotype could not be determined, shows that FCoV can cause viremia and therefore, traditional non-discriminating RT-PCR is not sufficient to definitively diagnose FIP. Discriminative RT-PCR should be performed in order to minimize the risk of euthanasia of cats suffering from different diseases. The use of serum/plasma is not recommended owing to the low viral load in blood.

Abbreviations

95% CI: 95% confidence interval; BLD: Below limit of detection; FCoV: Feline coronavirus; FECV: Feline enteric coronavirus; FIP: Feline infectious peritonitis; FIPV: Feline infectious peritonitis virus; IHC: Immunohistochemistry; IND: Indeterminate; NPV: Negative predictive value; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PPV: Positive predictive value; RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

Acknowledgements

The authors would like to thank Stephanie Doenges, Stefanie Gruendl and Laura Sangl for helping with the collection of samples.

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

SF was responsible for recruitment of cats, sample collection, organization of data, and statistical analysis. She performed the IHC testing and wrote all sections of the article except for the one by CML. CML contributed to the study design, conception, and interpretation of data and wrote the real-time RT-PCR section. HUB performed the PCR testing at IDEXX Laboratories in Ludwigsburg, Germany and additionally was involved in data interpretation. NP was substantially involved in data interpretation. KM helped with sample collection, and was substantially involved in postmortem diagnosis, supervision of immunostaining and interpretation of data. GW helped with sample collection and performed echocardiography to diagnose cardiac disease in control cats. HE was part of the team that initially detected the critical mutations and critically revised the manuscript for important intellectual content. KH was responsible for study design, conception and together with SF drafted the manuscript. All authors read, revised, and approved the final manuscript.

Ethics approval

All blood and effusion samples collected ante-mortem were originally obtained for diagnostic and, in the case of effusion, also for therapeutic purposes. Only surplus material was used in the study. Sampling of dead animals or using surplus material in Germany does not require an application for animal experiments according to national guidelines on animal research (German Animal Welfare Act §8).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

Dr. Christian Leutenegger is the Head of Molecular Diagnostics at IDEXX Laboratories, Inc. Dr. Hans-Joerg Balzer and Dr. Nikola Pantchev are employed at IDEXX Laboratories, Ludwigsburg. This laboratory offers the FCoV and FIP virus real-time RT-PCR on a commercial basis and performed the testing in this study. IDEXX played no role in the study design, in the collection and interpretation of data, or in the decision to submit the manuscript for publication. There is no commercial conflict of interest as the information generated here is solely for scientific dissemination. The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 München, Germany. ²IDEXX Laboratories, Inc., 2825 KOVR Drive, West Sacramento, USA. ³IDEXX Laboratories, Moerikestr. 28/3, 71636 Ludwigsburg, Germany. ⁴Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 München, Germany. ⁵Faculty of Veterinary Medicine, Department of Infectious Diseases and Immunology, Utrecht University, Yalelaan 1, 3584 CL Utrecht, The Netherlands.

Received: 22 October 2016 Accepted: 24 July 2017

Published online: 02 August 2017

References

- Rottler PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Hajjema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol*. 2005;79:14122–30.
- Poland AM, Vennema H, Foley JE, Pedersen NC. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol*. 1996;34:3180–4.
- Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*. 1998;243:150–7.
- Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K, Fudge A, Barker J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*. 1981;42:368–77.
- Pedersen NC. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*. 1976;37:1449–53.
- Horzinek M, Osterhaus A. Feline infectious peritonitis: a coronavirus disease of cats. *Small Anim Pract*. 1978;19:623–30.
- Addie DD. Clustering of feline coronaviruses in multicat households. *Vet J*. 2000;159:8–9.
- Cave TA, Golder MC, Simpson J, Addie DD. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *J Feline Med Surg*. 2004;6:53–8.
- Pedersen NC, Sato R, Foley JE, Poland AM. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *J Feline Med Surg*. 2004;6:83–8.
- Pedersen NC. Coronavirus diseases (coronavirus enteritis, feline infectious peritonitis). In: Holzworth J, editor. *Diseases of the cat, medicine and surgery*. Philadelphia: Saunders; 1987. p. 193–214.
- Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am J Vet Res*. 1981;42:363–7.
- Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ, Lutz H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol*. 2010;91:1698–707.
- Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwymck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol*. 2005;150:2483–500.
- Porter E, Tasker S, Day MJ, Harley R, Kipar A, Siddell SG, et al. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Vet Res*. 2014;45:49–59.
- Chang HW, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ, Rottier PJ. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1089–95.
- Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE, et al. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1066–73.
- Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol*. 2014;51:505–26.
- Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J Feline Med Surg*. 2009;11:225–58.
- Addie DD, Paltrinieri S, Pedersen NC. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J Feline Med Surg*. 2004;6:125–30.
- Giori L, Giordano A, Giudice C, Grieco V, Paltrinieri S. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *J Small Anim Pract*. 2011;52:152–7.
- Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, Fux R, Fischer A, Matiassek LA, et al. Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *J Feline Med Surg*. 2016;18:104–9.
- Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, Fux R, Hartmann K. Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg*. 2017;19:344–50.
- Longstaff L, Porter E, Crossley VJ, Hayhow SE, Helps CR, Tasker S. Feline coronavirus quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction on effusion samples in cats with and without feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg*. 2017;19:240–5.
- Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:684–9.
- Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*. 1998;62:193–205.
- Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods*. 1999;77:37–46.
- Felten S, Weider K, Doenges S, Gruendl S, Matiassek K, Hermanns W, et al. Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg*. 2017;19:321–35.
- Bank-Wolf BR, Stallkamp I, Wiese S, Moritz A, Tekes G, Thiel HJ. Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*. 2014;173:177–88.

29. Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJ. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol.* 2010;91:415–20.
30. Kipar A, Baptiste K, Barth A, Reinacher M. Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *J Feline Med Surg.* 2006;8:69–72.
31. Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H, et al. Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res.* 2012;165:17–28.
32. Lewis CS, Porter E, Matthews D, Kipar A, Tasker S, Helps CR, et al. Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. *J Gen Virol.* 2015;96:1358–68.
33. Pedersen NC, Liu H, Dodd KA, Pesavento PA. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses.* 2009;1:166–84.
34. Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H, Leutenegger C, Murphy B. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Vet Microbiol.* 2015;175:157–66.
35. Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, Cole D, Reinacher M, Schroo S, et al. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med.* 2003;17:781–90.
36. Egberink HF, Herrewegh AP, Schuurman NM, van der Linde-Sipman JS, Horzinek MC, de Groot RJ. FIP, easy to diagnose? *Vet Q.* 1995;17(Suppl 1):24–5.
37. Weiss RC, Scott FW. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: nature and development of viremia. *Am J Vet Res.* 1981;42:382–90.
38. Kipar A, May H, Menger S, Weber M, Leukert W, Reinacher M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol.* 2005;42:321–30.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



IV. PUBLIKATION 2

An investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions to diagnose feline infectious peritonitis

Sandra Felten¹

Kaspar Matiasek², Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Associate Member ECVN

Stefanie Gruendl¹

Laura Sangl¹

Gerhard Wess¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine), Dipl. ECVIM-CA (Cardiology), Dipl. ACVIM (Cardiology)

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

² Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

Journal of Feline Medicine and Surgery, veröffentlicht

Journal of Feline Medicine and Surgery 2017; 19: 410-8;
doi: 10.1177/1098612x16630357.



Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis

Journal of Feline Medicine and Surgery
1–9

© The Author(s) 2016

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1098612X16630357

jfms.com



Sandra Felten¹, Kaspar Matiasek², Stefanie Gruendl¹,
Laura Sangl¹, Gerhard Wess¹ and Katrin Hartmann¹

Abstract

Objectives Feline coronaviruses (FCoV) exist as two biotypes, feline enteric coronavirus and feline infectious peritonitis virus. Although feline infectious peritonitis (FIP) is a very common disease, the ante-mortem diagnosis of this disease still remains a challenge. Immunofluorescence staining of FCoV in macrophages in effusion has been considered as the reference standard for the diagnosis, but recently this method has been shown to have lower specificity than previously reported. In addition, this method is not widely available and requires the use of fluorescence microscopes. Therefore, it was the aim of this study to evaluate the diagnostic potential of an immunocytochemical (ICC) assay using body cavity effusion.

Methods Effusion samples from 27 cats with immunohistochemically confirmed FIP and 29 cats with suspected FIP but a definitive diagnosis of another disease were examined. ICC specimens were evaluated with respect to positive immunostaining. In addition, effusion samples were stained with haematoxylin and eosin and evaluated cytologically.

Results A diagnostic sensitivity of 85.2% was recorded for effusion specimens (95% confidence interval [CI] 66.3–95.8), while the diagnostic specificity was only 72.4% (95% CI 52.8–87.3).

Conclusions and relevance Once the clinical disease FIP develops in a cat, it always leads to death, and most of the cats are euthanased within a few days or weeks. As false-positive results might lead to euthanasia of cats suffering from potentially treatable diseases, the diagnostic specificity of a diagnostic tool is the most important factor in a fatal disease like FIP. Thus, the diagnostic utility of this test proved to be insufficient and positive ICC results should be interpreted with caution. Nevertheless, full-body necropsy could not be performed in 13/29 control cats. It is possible that these cats actually suffered from early-stage FIP and that this fact might have influenced the diagnostic specificity of the ICC. Based on the results of the present study, however, ICC of effusion samples currently cannot be recommended to confirm a suspicion of FIP.

Accepted: 8 January 2016

Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) is one of the leading infectious causes of death among the cat population worldwide. The causative agent of FIP is the feline coronavirus (FCoV) that occurs as two distinct biotypes, feline enteric coronavirus (FECV) and feline infectious peritonitis virus (FIPV).^{1–3} Coronaviruses are well known for their high mutability.^{4–6} The internal mutation hypothesis, which is widely accepted, suggests that FIPV originates as a mutant from its parental FECV within an infected cat.^{7,8} Both FECV and FIPV infect

¹Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

²Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

Corresponding author:

Sandra Felten, Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany
Email: s.felten@medizinische-kleintierklinik.de

macrophages, but only the disease-causing FIPV is capable of efficiently replicating within the macrophages and maintaining the replication at a sufficient level.^{9,10} The replication of the virus within the macrophages is believed to play the central role in the development of FIP.¹¹ Replication leads to a positive immunostaining of viral antigen in the cytoplasm of macrophages.¹²

If a cat is presented with effusion, a number of diagnostic tests can be performed. However, macroscopic, cytological and biochemical analysis of effusion fluid can be misleading, as abnormalities are not specific for FIP.^{13,14} The Rivalta test is a simple and inexpensive test, which has been used to differentiate transudates from exudates.¹⁵ This test has been frequently used in feline effusions, but it can produce false-positive results.¹⁶ Reverse transcriptase PCR and measurement of FCoV antibodies in effusion, although more promising than in blood,^{17–19} are not diagnostic and should only be interpreted in conjunction with history, clinical presentation and results of other tests.^{12,20,21} Therefore, the diagnosis of FIP remains a challenge, even in cats with body cavity effusion.

In earlier studies evaluating the utility of immunostaining of FCoV antigen within macrophages, immunofluorescence was used in effusion samples.^{17,22–25} This technique was shown to have excellent specificity for the diagnosis of FIP in earlier studies,^{17,23–25} however, most of these studies were retrospective in nature and lacked necropsy confirmation of FIP vs other diseases. In contrast, a recent study revealed false-positive results of an immunofluorescence assay in two cats with diseases other than FIP.²² In contrast to immunofluorescence, immunocytochemistry (ICC) uses chromogens rather than fluorochromes such as fluorescein isothiocyanate, allowing assessment by standard bright field microscopy and cytomorphological evaluation of the cells. Moreover, this method does not require a fluorescence microscope, which makes the technique accessible to more diagnostic facilities. Additionally, ICC has the advantage of the possibility to reassess the slides at a later point in time, whereas immunofluorescence staining fades with time, and thus allows the slides to be transported to other laboratories for further evaluation.

The aim of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of an ICC assay in effusion from cats with confirmed FIP and a defined control group of cats for which FIP was considered an important differential diagnosis by a clinician. It was hypothesised that this technique would allow a definitive ante-mortem diagnosis of FIP in cats with effusion. All samples were additionally evaluated cytologically in order to facilitate the assessment of the ICC results.

Materials and methods

Animals

The study was designed as a prospective study and included 56 cats. All the cats were suspected of having FIP based on clinical and/or laboratory signs and were therefore either presented as patients to the Clinic of Small Animal Medicine (n = 41), or directly submitted for necropsy to the Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany (n = 15).

All 56 cats were classified into two groups. The FIP group (n = 27) consisted of cats definitively diagnosed with FIP in necropsy. The diagnosis was established by histopathology and immunohistochemical staining of FCoV antigen in macrophages in FIP-typical lesions in tissue samples obtained at necropsy. For immunohistochemistry (IHC), formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples were cut into 5 µm sections and dried overnight at 37°C. These sections were then deparaffinised in xylene and rehydrated in a graded series of alcohol. In order to reverse the antigen-masking effects due to fixation, heat-induced antigen retrieval was carried out using microwave pretreatment in citrate buffer (pH 6.0). The tissue samples were then further processed as described below for ICC on effusion slides.

The control group (n = 29) consisted of cats for which FIP was regarded as a differential diagnosis by clinicians because of the presence of effusion. Cats were only included if a definitive diagnosis of a disease other than FIP, which explained the clinical signs, was established. These diagnoses were confirmed either by full post-mortem examination, including histopathology (n = 15), by histopathology of organ samples obtained post mortem (n = 1), by bacterial culture and cytology to diagnose bacterial pleuritis or peritonitis (n = 2), by echocardiography to diagnose decompensated cardiac disease explaining pleural or abdominal effusion (n = 7), or by cytology to diagnose neoplasia (n = 4). In order to reduce the likelihood of failure to detect FIP as a comorbidity in control cats, the necropsy protocols for the 15 control cats in which full post-mortem examination was performed included IHC for FCoV in the affected tissues. All 15 cats showed negative IHC results.

Samples

In total, 57 effusion samples were collected between 2012 and 2014. From one cat in the FIP group, two effusion samples (ascites and pleural effusion) were obtained. Effusion samples were collected either ante-mortem by abdominocentesis or thoracocentesis, or post mortem.

Aliquots of 100 µl of the effusion samples (ascites, n = 32; pleural effusion, n = 23; pericardial effusion, n = 2) were cytocentrifuged in a cytospin centrifuge (Universal R; Hettich), and the slides were stored at –20°C until use. At

least two slides of each sample were prepared for each cat. The effusion samples collected ante-mortem were originally obtained for diagnostic and/or therapeutic purposes.

Cytological evaluation

One slide of each effusion sample was stained with haematoxylin and eosin and evaluated semi-quantitatively for cellularity, cellular composition, blood contamination/haemorrhage and erythrophagocytosis, protein, aspiration of autochthonous cells (eg, liver cells) and mesothelial cells (Table 1 in Supplementary material). Based on these parameters, slides were classified as cytologically 'typical for FIP', 'compatible with FIP' or 'not indicative of FIP'. Pyogranulomatous cytology with engulfment of neutrophils by macrophages and absence of microorganisms and giant cells was regarded as 'typical for FIP' (Figure 1). Mixed white blood cell populations containing macrophages were regarded as 'compatible with FIP'. Other cellular compositions, such as exclusively neutrophilic or neoplastic cells, were regarded as 'not indicative of FIP'.

ICC

Slide reading and interpretation of ICC results were performed by two independent investigators, who were blinded to all data of the cats, including their diagnoses.

The cytological slides for ICC were thawed at room temperature. The slides remained wrapped in aluminium foil during thawing in order to avoid condensation, which could lead to the loss of cellular material on the slides. In order to reduce background staining, endogenous peroxidase was inhibited using 2.3% hydrogen peroxide in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.0–7.4) for cytological samples and 3% hydrogen peroxide in methanol for histological samples. After washing these slides three times with PBS, all the slides were incubated with normal goat serum (1:20; MP Biomedicals) in a humidity chamber for 30 mins at room temperature to block non-specific binding of the antibodies. An anti-FCoV mouse monoclonal IgG2A (FIPV3-70; Linaris) diluted to 1:400 in PBS was applied as the primary antibody, and the slides were incubated overnight at 4°C in a humidity chamber. The following day, after washing the slides three times with PBS, the secondary antibody, a goat antimouse IgG conjugated to biotin (Dako), diluted to 1:200 in PBS was applied. The slides were incubated in the humidity chamber for 1 h at room temperature and afterwards washed three times with PBS. A complex of avidin and biotinylated horseradish peroxidase (ABC) (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories) was formed by preincubating the mixture for 30 mins. The slides were then incubated with the ABC for 1 h at room temperature in the

humidity chamber. The slides were washed three times with PBS followed by the addition of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (pH 7.0; Kem-En-Tec Diagnostics) acting as chromogen and incubated for 5 mins at room temperature. Then the slides were washed with PBS and dipped in distilled water followed by counter-staining with Mayer's Hemalaun (AppliChem GmbH) and rinsing in running tap water. The slides were then dehydrated in an ascending series of alcohol and coverslipped using xylene-based mounting medium (Histokitt; Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG). In order to ensure adequate performance of the antibody, a positive tissue control was included in each of the staining protocols.

Cellularity and positivity of the immunostained samples were evaluated using bright-field microscopy. Only samples with >50 nucleated cells in total were included in the statistical analysis. Samples lacking unimpaired cellular material were excluded from statistical analysis. If positive immunostaining was present within a sample, cells with a positive signal were further assessed considering the cell type, the signal pattern and the intensity of the staining. A positive sample was defined as containing macrophages with brown, intensely coloured and granulated cytoplasm (Figure 1). A negative sample was defined as containing macrophages without any immunostaining or cells with non-specific immunostaining. Immunostaining of mesothelial cells, lymphocytes, plasma cells, neutrophils, or erythrocytes was considered non-specific. Also, a diffuse and/or light staining of the cytoplasm was considered non-specific. Non-specific staining was considered negative in ICC. All ICC-positive samples were categorised semi-quantitatively with respect to their yield of true positive cells (low-yield positive: few single macrophages with strong positive signal; medium-yield positive: about half of the macrophages with strong positive signal; high-yield positive: majority of macrophages with strong positive signal).

Statistical evaluation

To evaluate the diagnostic value of the ICC assay in the diagnosis of FIP, sensitivity (the proportion of positive test results among all cats with FIP), specificity (the proportion of negative test results among all cats with diseases other than FIP), positive predictive value (PPV; the probability that a cat with a positive test result has FIP), negative predictive value (NPV; the probability that a cat with a negative test result does not have FIP) and overall accuracy (the sum of true positive and true negative test results divided by the total number of test results) were determined. To quantify uncertainty, 95% confidence intervals (CIs) were calculated. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel and Prism version 5.04 (GraphPad Software).

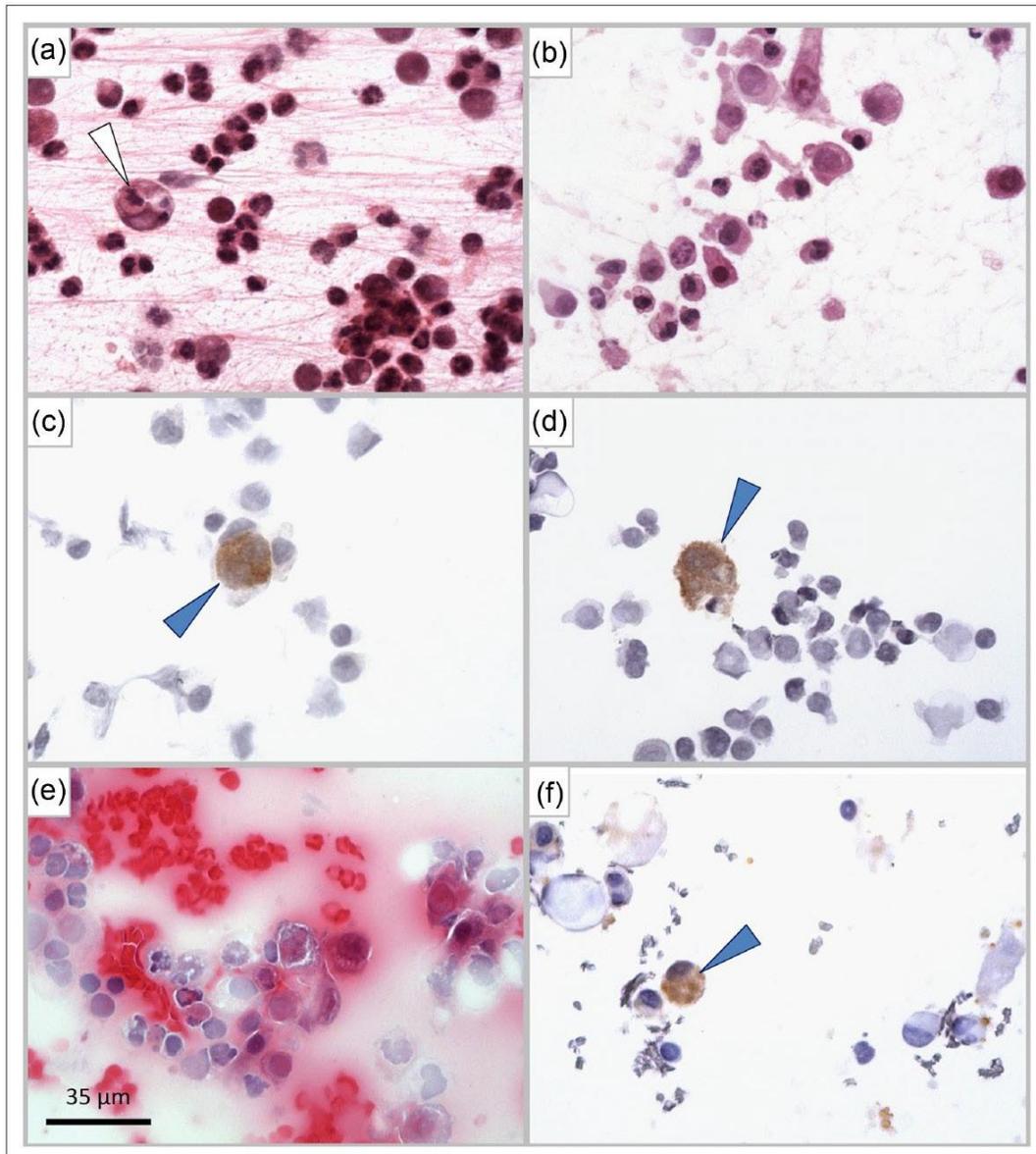


Figure 1 Cytological and immunocytochemical findings. (a) Feline infectious peritonitis (FIP)-typical cytology showing macrophages engulfing polymorphonuclear neutrophils (arrowhead) and extracellular fibrin mesh. (b) Cytology compatible with FIP, seen in cats with other inflammatory aetiologies. Immunopositive macrophages (arrowheads) seen in (c) peritoneal effusion and (d) pleural effusion. (e, f) FIP-compatible cytology (e) with non-specific immunopositive cells (f) within the effusion of a control cat affected by purulent and granulomatous epi- and myocarditis.

Results

Cytological evaluation

The results of the cytological evaluation of effusion samples are presented in Table 1. There was a good to very

good intra- and inter-rater agreement throughout. Overall, the cellular composition was either predominantly neutrophilic with ($n = 1$) or without necrotic cells ($n = 6$), predominantly lymphocytic-monocytic ($n = 7$),

Table 1 Cytological evaluation of 57 haematoxylin and eosin-stained effusion samples from the 56 cats (for definitions see Supplementary material)

Group		FIP	Controls
Number of samples		28	29
Cytological signs for FIP	Typical	19	4
	Compatible	5	5
	Not indicative	4	20
Cellularity	Low	9	9
	Medium	13	10
	High	6	10
Blood contamination/ haemorrhage	Negative	6	2
	+	11	6
	++	10	9
	+++	1	12
Erythrophagocytosis	Negative	11	8
	+	13	15
	++	4	5
	+++	0	1
Protein	Negative	3	5
	+	10	11
	++	10	11
	+++	5	2
Fibrin	Negative	9	15
	+	8	9
	++	8	1
	+++	3	4
Aspiration of autochthonous cells	Negative	20	23
	+	5	2
	++	3	3
	+++	0	1
Mesothelial cells	Negative	4	7
	+	11	12
	++	12	7
	+++	1	1
	Not determined	0	2

FIP = feline infectious peritonitis

predominately lymphocytic (n = 3), pyogranulomatous with (n = 2) or without necrotic cells (n = 22), or neoplastic (n = 7). A mixed leukocyte population was present in five of the effusion samples. In the remaining four effusion samples, pleocytosis was absent.

ICC

Cellularity and the results of the immunostaining of all samples from cats with FIP are presented in Table 2. The results of the control cats are presented in Table 3. Of the 57 effusion samples, 31 (23 with FIP, eight controls) showed positive ICC results (Table 4). One effusion sample was considered non-diagnostic owing to the absence of cellular material, and this sample was excluded from statistical analysis. Diagnostic sensitivity, specificity, NPV, PPV and overall accuracy are presented in Table 5.

Discussion

The aim of this study was to determine the usefulness of ICC in effusion as a tool to diagnose FIP. While the demonstration of FCoV antigen in macrophages by immunofluorescence in effusion has previously been assessed,^{17,22–25} this study is the first to evaluate the use of ICC analysis in the diagnosis of FIP.

A relatively high number of false-positive test results were identified in this study, consequently leading to a diagnostic specificity of only 72.4%. This is in stark contrast to the results of immunofluorescence assays in older studies that reported a specificity and PPV of 100% for immunofluorescence testing of effusion.^{17,23–25} However, Litster et al recently reported false-positive results in immunofluorescence in 2/17 cats (specificity 71.4%).²² This specificity is very similar to that of the

Table 2 Cellularity and results of immunostaining of the effusion samples from the 27 cats of the feline infectious peritonitis group

Cat	Effusion	
	Cellularity*	Immunostaining†
1	+++	+++
2	–	ND
3	+++	Non-specific‡
4	+++	+++
5	+++	+++
6	+++	+++
7	+++	++
8	++	+
9	++	+++
10	+	–
11	Ascites: ++ Pleural effusion: ++	Ascites: ++ Pleural effusion: +
12	+++	+
13	++	+
14	+++	+
15	+++	+++
16	++	–
17	++	+
18	++	+++
19	++	+++
20	++	++
21	++	+++
22	+	+
23	+++	+
24	+	+
25	+++	+
26	+++	+
27	++	Non-specific

* (+) = Low cellular (<3 cells per high power field [HPF]); (++) = medium cellular (4–10 cells per HPF); (+++) = high cellular (>11 cells per HPF); (–) = lack of cellular material, non-diagnostic

† (+) = Low-yield positive immunostaining (few single macrophages with strong positive signal); (++) = medium-yield positive immunostaining (about half of the macrophages with strong positive signal); (+++) = high-yield positive immunostaining (majority of macrophages with strong positive signal); (–) = negative immunostaining

‡ Non-specific staining was defined as diffuse and/or light cytoplasmic staining of macrophages. Samples with non-specific staining were regarded as immunocytochemistry negative
ND = not determined

present study. It remains unclear why cats without FIP can show positive staining of FCoV antigen in macrophages. Of the eight cats with false-positive ICC results in the present study, three suffered from lymphoma, two had carcinoma and three other cats had decompensated cardiac disease. In four cats (two with lymphoma, one with adenocarcinoma and one with chronic cardiomyopathy), full post-mortem examination, including histopathology and IHC, was performed.

Table 3 Cellularity and results of immunostaining of the effusion samples from the 29 cats of the control group

Cat	Effusion	
	Cellularity*	Immunostaining†
1	+++	–
2	+++	–
3	+++	Non-specific Mφ‡
4	+++	–
5	+++	–
6	+++	Non-specific PMN
7	+++	Non-specific MC
8	+++	Non-specific MC
9	+	–
10	+++	Non-specific PMN
11	+++	–
12	+++	+++
13	+++	Non-specific RBC
14	++	–
15	+++	+++
16	++	Non-specific Mφ
17	++	Non-specific RBC
18	+++	Non-specific RBC
19	+++	–
20	++	++
21	+++	–
22	++	++
23	+++	–
24	+++	+
25	+++	+
26	++	++
27	+	–
28	+++	+
29	++	–

* (+) = Low cellular (<3 cells per high power field [HPF]); (++) = medium cellular (4–10 cells per HPF); (+++) = high cellular (>11 cells per HPF); (–) = lack of cellular material, non-diagnostic

† (+) = Low-yield positive immunostaining (few single macrophages with strong positive signal); (++) = medium-yield positive immunostaining (about half of the macrophages with strong positive signal); (+++) = high-yield positive immunostaining (majority of macrophages with strong positive signal); (–) = negative immunostaining

‡ Non-specific staining was defined as diffuse and/or light cytoplasmic staining of macrophages (Mφ) or different cells (MC = mesothelial cells; PMN = polymorphonuclear leukocytes; RBC = red blood cells). Samples with non-specific staining were regarded as immunocytochemistry negative

In the other four cats (two with decompensated cardiac disease, one with lymphoma and one with carcinoma), the diagnosis was established by cytology to diagnose neoplasia or by echocardiography to diagnose decompensated cardiac disease. It cannot fully be excluded that these eight cats suffered from FIP in addition to their diagnosed diseases. Even in the four cats that had necropsy performed, it might be that they suffered from early-stage FIP, but histopathological lesions were still

Table 4 Results of immunocytochemistry (ICC) in 56 effusion samples from the 55 cats (one effusion sample was considered non-diagnostic and was therefore excluded from the statistical analysis)

	FIP	Control	Total
Positive ICC	23	8	31
Negative ICC	4	21	25
Total	27	29	56

FIP = feline infectious peritonitis

Table 5 Sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) and overall accuracy of immunocytochemistry (ICC) and prevalence of feline infectious peritonitis in 56 samples from the 55 cats (one effusion sample was considered non-diagnostic and was therefore excluded from the statistical analysis)

	ICC in effusion
Sensitivity (95% CI)	85.2 (66.3–95.8)
Specificity (95% CI)	72.4 (52.8–87.3)
NPV (95% CI)	84.0 (63.9–95.5)
PPV (95% CI)	74.2 (55.4–88.1)
Overall accuracy (95% CI)	78.6 (65.6–88.4)
Prevalence	48.2

Data are % (95% confidence interval)

absent in the examined tissue material. Two of the eight cats with false-positive ICC results (both with decompensated cardiac disease) also presented 'FIP-typical' effusion cytology; and the cytology was at least 'compatible with FIP' in another two cats suffering from lymphoma or adenocarcinoma, respectively. However, in three of them, histopathology was performed, but they did not reveal FIP-typical lesions. If the eight cats of the control group that had positive ICC results actually had FIP, the specificity of the ICC assay might have been falsely reduced.

The target cell for viral replication is the macrophage.^{10,26–28} Thus, it is important to distinguish macrophages from other types of cells and to only consider staining of macrophages as true-positive during microscopic evaluation of the immunostained slides. The binding of the antibody to cellular structures other than FCoV antigen might lead to non-specific staining of other cells (eg, mesothelial cells, neutrophils, red blood cells). It is possible that some of these cells were misclassified as macrophages upon reading the slides. Nevertheless, these cell types usually can easily be differentiated and therefore this seems unlikely.

The antibody used in the ICC protocol in this study is known to be specific for the nucleocapsid of FCoV. Nevertheless, non-specific binding of the antibody to

other structures within the cytoplasm of macrophages also might lead to false-positive results.

As all the slides were kept in close proximity during the staining procedure, cross-contamination between the slides cannot completely be ruled out. The inclusion of negative control slides could help rectify this problem in future investigations.

Moreover, the staining of non-mutated FCoV within macrophages cannot fully be excluded. Monocyte-associated viraemia in healthy cats that never developed FIP has been reported earlier,^{18,29–32} allowing for systemic spread of FECV.³³ It is possible that cell-bound FECV might reach the body cavities through leakage of blood components, especially in the presence of inflammation.³⁴

The diagnostic sensitivity of the ICC was 85.2% in effusion samples. Similar or even lower sensitivities of 57–95% have been reported previously for immunofluorescence staining of effusion.^{17,23–25} Recently, however, a sensitivity of 100% was reported for immunofluorescence staining.²² This variation can possibly be explained by differences in the sample collection. In the present study and in some of the former studies mentioned, effusion samples were collected both ante- and post mortem,^{23,24} while the study of Litster et al only included effusion specimens collected ante-mortem.²² In the present study, all of the four effusion samples with false-negative ICC results were obtained post mortem. This could have negatively influenced the sensitivity of the test. Unfortunately, the delay between death and sample collection was not always recorded as some cats were directly submitted for necropsy from referring veterinarians. However, all of the cats with FIP, including those with false-negative ICC results, showed positive IHC results. In addition, it is possible that FCoV antigen was competitively bound in immune complexes by circulating antibodies and therefore could not be detected by the primary antibody used in the ICC protocol. Finally, a monoclonal antibody was used for ICC staining in this study. It is possible that the sensitivity would have been better had a polyclonal antibody been used. However, previous studies using a polyclonal antibody conjugate in immunofluorescence tests reported even lower sensitivities in effusion.^{17,25}

One effusion specimen was considered non-diagnostic owing to the lack of cellular material on the slide. It is possible that the body fluid had a low cell count or the cells were destroyed or washed off during the processing of the slide; the steps, such as cytocentrifugation, freezing, thawing and washing, can decrease the number of adequate cells on the slide. Overall, cellularity was higher on haematoxylin and eosin-stained slides than on immunostained slides. The inclusion of a fixation step in the staining protocol might lead to a better cellularity of the ICC samples and should be further investigated.

The major study limitation is possible misclassification bias as cats in the control ('FIP-negative') group could possibly have suffered from early-stage FIP in addition to another disease. Some of the control cases yielded positive ICC results; if these cats were misclassified, then the specificity of the ICC test might have been falsely reduced. In addition, if some control cats with negative ICC results truly had FIP, the diagnostic sensitivity would have been falsely increased.

Another limitation is the fact that the slides were stored at -20°C until use. Sample degradation can occur unless specimens are stored at -80°C , which might have influenced the diagnostic performance of the ICC assay.

Conclusions

The present study evaluated the utility of an ICC assay in the diagnosis of FIP using effusion samples. The diagnostic specificity was 72.4%, while diagnostic sensitivity was 85.2%. As specificity is a far more important parameter in a lethal disease like FIP, the usefulness of this method is limited based on the results of the present study, and ICC cannot, in its present form, be used to confirm a suspicion of FIP.

Acknowledgements We would like to thank Karin Stingl, Institute of Veterinary Pathology, for her excellent technical support while performing the ICC and IHC tests.

Conflict of interest The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Supplementary material Semiquantitative scores empirically established for feline effusions cytospun by centrifuge Universal R (Hettich) at the given settings and using columns with a 27 high power field cross-sectional area.

References

- Pedersen N, Boyle J and Floyd K. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am J Vet Res* 1981; 42: 363–367.
- Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K, et al. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1981; 42: 368–377.
- Pedersen NC. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv Exp Med Biol* 1987; 218: 529–550.
- Compton SR, Barthold SW and Smith AL. The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab Anim Sci* 1993; 43: 15–28.
- Horzinek M, Herrewegh A and De Groot R. Perspectives on feline coronavirus evolution. *Feline Pract* 1995; 23: 34–39.
- Pedersen NC, Liu H, Dodd KA, et al. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses* 2009; 1: 166–184.
- Vennema H, Poland A, Foley J, et al. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 1998; 243: 150–157.
- Poland AM, Vennema H, Foley JE, et al. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3180–3184.
- Dewerchin HL, Cornelissen E and Nauwynck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol* 2005; 150: 2483–2500.
- Stoddart CA and Scott FW. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol* 1989; 63: 436–440.
- Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, et al. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol* 2005; 79: 14122–14130.
- Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, et al. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 594–604.
- Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35: 39–79.
- Giori L, Giordano A, Giudice C, et al. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *J Small Anim Pract* 2011; 52: 152–157.
- Berti-Bock G, Vial F, Premuda L, et al. Exudates, transudates and the Rivalta reaction (1895). Current status and historical premises [article in Italian]. *Minerva Med* 1979; 70: 3573–3580.
- Fischer Y, Sauter-Louis C and Hartmann K. Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol* 2012; 41: 558–567.
- Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, et al. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 781–790.
- Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A, et al. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 684–689.
- Kennedy MA, Brenneman K, Millsaps RK, et al. Correlation of genomic detection of feline coronavirus with various diagnostic assays for feline infectious peritonitis. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 93–97.
- Kipar A and Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol* 2014; 51: 505–526.
- Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J* 2014; 201: 133–141.
- Litster AL, Pogranichniy R and Lin TL. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *Vet J* 2013; 198: 362–366.
- Paltrinieri S, Parodi MC and Cammarata G. In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology, and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 358–361.

- 24 Parodi MC, Cammarata G, Paltrinieri S, et al. **Using direct immunofluorescence to detect coronaviruses in peritoneal in peritoneal and pleural effusions.** *J Small Anim Pract* 1993; 34: 609–613.
- 25 Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, et al. **Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis** [article in German]. *Tierarztl Prax* 1995; 23: 92–99.
- 26 Weiss RC and Scott FW. **Pathogenesis of feline infectious peritonitis: nature and development of viremia.** *Am J Vet Res* 1981; 42: 382–390.
- 27 Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, et al. **Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis.** *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 65: 243–257.
- 28 Kipar A, May H, Menger S, et al. **Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis.** *Vet Pathol* 2005; 42: 321–330.
- 29 Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ and Harbour DA. **Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis.** *Vet Microbiol* 1998; 62: 193–205.
- 30 Fehr D, Bolla S, Herrewegh AA, et al. **Detection of feline coronavirus using RT PCR: basis for the study of the pathogenesis of feline infectious peritonitis (FIP)** [article in German]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1996; 138: 74–79.
- 31 Meli M, Kipar A, Müller C, et al. **High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats.** *J Feline Med Surg* 2004; 6: 69–81.
- 32 Kipar A, Baptiste K, Barth A, et al. **Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats.** *J Feline Med Surg* 2006; 8: 69–72.
- 33 Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, et al. **Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats.** *J Gen Virol* 2010; 91: 1698–1707.
- 34 Addie DD, Paltrinieri S and Pedersen NC. **Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium.** *J Feline Med Surg* 2004; 6: 125–130.

V. PUBLIKATION 3

Utility of an immunocytochemical assay using aqueous humor in the diagnosis of feline infectious peritonitis

Sandra Felten¹

Kaspar Matiasek², Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Associate Member ECVN

Stefanie Gruendl¹

Laura Sangl¹

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

² Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

Veterinary Ophthalmology, veröffentlicht

Veterinary Ophthalmology 2018; 21(1): 27-34; doi: 10.1111/vop.12474.

Utility of an immunocytochemical assay using aqueous humor in the diagnosis of feline infectious peritonitis

Sandra Felten,* Kaspar Matiasek,† Stefanie Gruendl,* Laura Sangl* and Katrin Hartmann*

*Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Veterinaerstrasse 13, Munich 80539, Germany; and †Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Veterinaerstrasse 13, Munich 80539, Germany

Address communications to:

S. Felten

Tel.: +49 89 2180 2650

Fax: +49 89 2180 6240

e-mail: s.felten@medizinische-kleintierklinik.de

Abstract

Objective In cats suffering from feline infectious peritonitis (FIP) without effusion, antemortem diagnosis is challenging. Uveitis is common in these cats. It was the aim of this study to evaluate sensitivity and specificity of an immunocytochemical assay (ICC) in aqueous humor of cats suspected of having FIP.

Animals studied The study included 26 cats with immunohistochemically confirmed FIP and 12 control cats for which FIP was suspected due to similar clinical or laboratory changes, but which suffered from other diseases confirmed via histopathology.

Procedures All aqueous humor samples were collected postmortem by paracentesis. ICC was carried out as avidin–biotin complex method. Sensitivity, specificity, and the overall accuracy including 95% confidence intervals (95% CI) were calculated.

Results Immunocytochemistry was positive in 16 of 25 cats with FIP and 2 of 11 control cats (one cat with lymphoma, one with pulmonary adenocarcinoma). Aqueous humor samples of one cat with FIP and of one control cat were excluded from statistical analysis. Sensitivity was 64.0% (95% CI: 42.5–82.0); specificity 81.8% (95% CI: 48.2–97.7); and overall accuracy 69.4% (95% CI: 51.9–83.7).

Conclusions As false-positive results occurred and specificity is most important in the diagnosis of FIP, the diagnostic utility of ICC in aqueous humor is limited. Further studies are required to clarify the origin of false-positive ICC results.

Key Words: FIP, immunocytochemistry, sensitivity, specificity, uveitis

INTRODUCTION

Feline infectious peritonitis virus (FIPV) and feline enteric coronavirus (FECV) are two distinct pathotypes of the feline coronavirus (FCoV).^{1,2} FIPV can sustain replication within macrophages at high levels and can spread the infection to adjacent cells, ultimately causing feline infectious peritonitis (FIP).^{3,4} Thus, in the past, it was believed that positive immunostaining of viral antigen within the cytoplasm of macrophages was diagnostic for FIP.⁵ Therefore, immunostaining has been considered reference standard for diagnosing FIP in cats with effusion for a long time.⁵ In the past 3 years, however, a number of studies suggested that immunostaining can be false-positive and this has questioned its usefulness.^{6–8}

In cats without effusion, the definitive diagnosis of FIP currently can only be achieved by invasive procedures such as laparotomy or laparoscopy to obtain biopsy samples of

affected tissue for immunostaining of macrophages.^{9–12} Uveitis and neurological signs are often present in cats suffering from FIP without detectable body cavity effusions,¹⁰ and FIP has been shown to be the most common infectious cause of uveitis in cats.¹³ In cats suffering from FIP without significant effusions, ocular and/or neurological signs are present in about 60% of the affected cats. In contrast, if effusion is present, ocular and/or neurological signs occur in less than 9%.¹⁰ More recently, however, it has been discussed that eye involvement might actually be underestimated, as 29% of cats confirmed to have FIP showed eye involvement.¹¹ The most common ocular signs seen in cats with FIP are uveitis and chorioretinitis.^{14–16} A mixed uveal inflammatory cell infiltrate consisting of neutrophils and mononuclear inflammatory cells can usually be seen histologically.¹⁷

Aqueous humor is commonly obtained in cats with uveitis for cytology but is often nondiagnostic in cats with

infectious uveitis.^{18–20} A mixed inflammatory cell population including macrophages is usually present within the anterior eye segment of cats suffering from uveitis secondary to FIP.^{14, 17, 19, 21}

Whereas usefulness of immunostaining of macrophages in the cerebrospinal fluid (CSF) has been reported recently,^{8, 22} immunocytochemical demonstration (ICC) of coronavirus antigen in macrophages in aqueous humor has not been evaluated before.

The hypothesis of the present study was that staining of coronavirus antigen in macrophages of aqueous humor could be a valuable diagnostic method to confirm FIP in cats with or without uveitis, especially in cats without body cavity effusions. Therefore, the aim of the study was to evaluate the sensitivity and specificity of an ICC assay in aqueous humor in cats suspected of having FIP. Additionally to ICC analysis, all samples were evaluated cytologically in order to validate ICC results.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Overall, 38 cats suspected of having FIP based on clinical and/or laboratory signs were prospectively included in the study. The cats were presented either as patients of the Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany ($n = 27$), or directly submitted for postmortem examination to the Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany ($n = 11$).

The FIP group ($n = 26$) consisted of cats definitively diagnosed with FIP. The diagnosis in all these cats was confirmed by histopathology plus positive immunohistochemical (IHC) staining of FCoV antigen in macrophages in FIP-typical lesions in tissue samples obtained at postmortem examination. IHC was performed as described before.⁷ Histopathological examination and IHC included the eyes if macroscopic changes were present at postmortem examination, which was the case in three cats with FIP.

The control group ($n = 12$) consisted of cats for which FIP was considered an important differential diagnosis. An inclusion criterion therefore was the presence of one or more of the following signs consistent with FIP: effusion ($n = 7$), fever with not more than 20 000 white blood cells/ μL and not more than 1000 band neutrophils/ μL ($n = 1$), icterus ($n = 5$), or neurological signs ($n = 5$) (Table 1). Additionally, all control cats had to be definitively diagnosed with a disease other than FIP which explained the clinical signs, and in all cats, diagnoses were confirmed by full postmortem examination including histopathology after the cats were euthanized due to disease progression independent of the purpose of this study. In all control cats, IHC staining of affected tissues was performed and was always negative.

Table 1. Inclusion criteria, definitive diagnosis, and immunocytochemical (ICC) results for the 12 control cats. Diagnoses were confirmed by histopathology including negative immunohistochemical staining of affected tissues in all cats

Cat	Signs leading to inclusion	Diagnosis	ICC result
1	Pleural effusion	Bronchial carcinoma	Negative
2	Icterus	Systemic salmonellosis	Negative
3	Ascites, icterus, neurological signs	Cholangiohepatitis	Negative
4	Neurological signs	Globoid cell leukodystrophy	Negative
5	Neurological signs	Intracranial neoplasia	Negative
6	Pleural effusion	Pulmonary adenocarcinoma	Positive
7	Icterus, neurological signs	Meningoencephalitis	Negative
8	Ascites	Lymphoma	Negative
9	Pleural effusion	Lymphoma	Positive
10	Fever, icterus	Cholangiohepatitis	Negative
11	Icterus, neurological signs	Cholangitis and cholecystitis, degenerative polioencephalopathy	Negative
12	Pleural effusion	Pulmonary adenocarcinoma	n.d.

n.d., nondiagnostic (owing to the lack of cellular material).

Samples

In total, 38 aqueous humor samples were collected between 2012 and 2014. All aqueous humor samples were obtained postmortem by anterior eye segment paracentesis after the cats were euthanized or died naturally. In most cases, samples were collected within 24 h. A 22-G needle was inserted into the anterior eye segment at the limbus, above and parallel to the plane of the iris. Aqueous humor was then gently aspirated into a 2-mL syringe.

Aliquots of 100 μL of aqueous humor samples were cytocentrifuged (231 g for 5 min, then the supernatant was discarded, and the cell pellet was centrifuged at 643 g for 1 min) in a cytospin centrifuge (Universal 16R, Hettich), and slides were stored at -20°C until use. Two slides were prepared for each cat.

Cytological evaluation

One slide of each aqueous humor sample was stained with hematoxylin and eosin and semiquantitatively evaluated for cellularity, cellular composition, blood contamination/hemorrhage and erythrophagocytosis, protein, fibrin and aspiration of autochthonous material (e. g. melanin, fragments of punctured cornea). Considering these parameters, slides were classified as cytologically 'typical for FIP', 'compatible with FIP', or 'not indicative of FIP'. Pyogranulomatous inflammation with macrophagic engulfment of neutrophils and absence of microorganisms and giant cells was regarded as 'typical for FIP'. Mixed white blood cell populations containing macrophages were regarded as 'compatible with FIP'. Other cellular compositions, such

as exclusively neutrophilic or neoplastic cells, were regarded as 'not indicative of FIP' (Fig. 1).

ICC

Slide reading and interpretation of ICC results were performed by two independent investigators, who were blinded to all data of the cats, including their diagnoses.

Immunocytochemistry of aqueous humor samples was performed as described previously for effusion samples.⁷

All immunostained aqueous humor samples were evaluated for cellularity and positivity of the immunostaining using light microscopy. Only samples with more than 50 nucleated cells in total, including mononuclear cells, were included in the statistical analysis. Samples lacking unimpaired cellular material were excluded from statistical analysis. If positive immunostaining was present within a sample, cells with a positive signal were further assessed considering cell type, signal pattern, and intensity of the staining. A positive sample was defined if containing macrophages that revealed brown, intensely stained and granulated cytoplasm independent of possible pigmentophagia (Fig. 1). A negative sample was defined as containing macrophages without any immunostaining or cells with nonspecific immunostaining. Immunostaining of lymphocytes, plasma cells, neutrophils, or erythrocytes was considered nonspecific. Additionally, diffuse and/or light cytoplasmic staining was considered nonspecific and was classified as negative on ICC. All ICC-positive samples were categorized semi-quantitatively regarding their yield of true positive cells (low-yield positive: few single macrophages with strong positive signal; medium-yield positive: about half of the macrophages with strong positive signal;

high-yield positive: majority of macrophages with strong positive signal).

Statistical evaluation

To evaluate the diagnostic value of the ICC in aqueous humor in the diagnosis of FIP, sensitivity, specificity, and overall accuracy were determined. To quantify uncertainty, 95% confidence intervals (95% CI) were calculated. Statistical analysis was performed using MS Excel (Microsoft Inc., Redmond, Washington, USA) and Prism Version 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA).

RESULTS

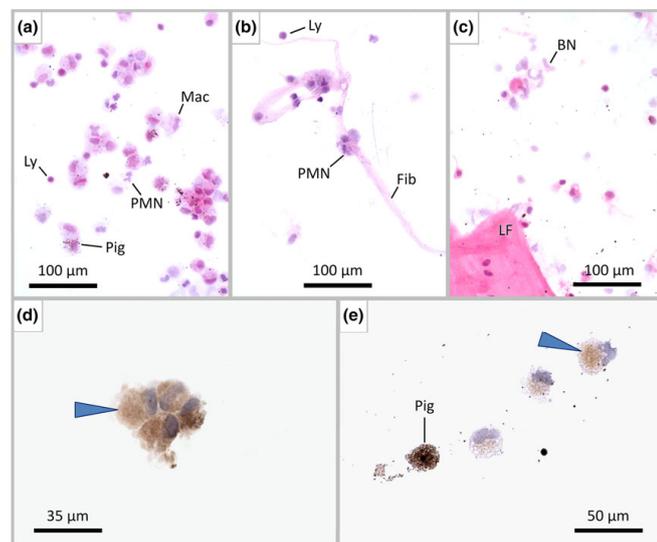
Ocular signs and histopathology of the eye

In all cats that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine ($n = 27$), routine physical examination was performed and did not reveal clinical signs of uveitis.

In total, three cats with confirmed FIP had ocular changes on postmortem examination. Twenty-two of the 26 cats with FIP had effusions; two of them also had postmortem changes consistent with uveitis. Macroscopic postmortem changes included conjunctivitis, white miliary foci within the iris, and turbidity within the anterior chamber. Histopathological changes included lymphocytic-plasmacytic infiltration of the iris, multifocal lymphocytic conjunctivitis, plasmacytic and macrophagic infiltration of the anterior chamber, and accumulation of fibrin within the anterior chamber.

None of the control cats had ocular signs on physical or macroscopic postmortem examination.

Fig. 1. Cytological and immunocytochemical (ICC) findings. (a) Feline infectious peritonitis (FIP)-typical cytology showing pyogranulomatous inflammation including neutrophils (PMN), macrophages (Mac), rare lymphocytes (Ly), and macrophages containing melanin pigment (Pig). (b) Cytology compatible with FIP showing mixed white blood cells and fibrin threads (Fib). (c) Cytology not indicative of FIP in a case of phacoclastic uveitis containing lense fragments (LF) and band neutrophils (BN). (d) Immunopositive macrophages in a cat with FIP (arrowhead). (e) Autochthonous pigmented cells (Pig) should not be confused with macrophages (arrowhead).



Cytological evaluation

Results of the cytological evaluation of the hematoxylin-eosin-stained aqueous humor samples are shown in Table 2. A 100% inter-rater agreement was achieved through robust criteria. Overall, cellular composition was either predominantly neutrophilic with ($n = 1$) or without necrosis ($n = 3$), lymphomonocytic ($n = 14$), monocytic/macrophagic ($n = 2$), lymphoplasmacytic ($n = 2$), pyogranulomatous ($n = 8$), or neoplastic ($n = 1$). An equivocally mixed white blood cell population comprising neutrophils, monocytes/macrophages, and lymphocytes was present in five aqueous humor samples. Two hematoxylin-eosin-stained aqueous humor samples did not contain inflammatory cells.

ICC

Positive ICC results were obtained in 18 (16 with FIP, two controls) of the 38 cats (Table 3, 4). The two false-positive results occurred in a cat with lymphoma and in a cat with pulmonary adenocarcinoma diagnosed at full postmortem examination including histopathology. Only one of the 18 cats with positive aqueous humor samples had gross

Table 2. Cytological evaluation of hematoxylin- and eosin-stained aqueous humor samples

Group		FIP	Controls	Total
Number of samples		26	12	38
Cellularity	Low	11	5	16
	Medium	12	6	18
	High	2	1	3
	No cells	1	0	1
Blood contamination/hemorrhage	+	7	3	10
	++	3	1	4
	+++	0	0	0
	Negative	14	7	21
	Not evaluable	2	1	3
Erythrophagocytosis	+	4	0	4
	++	0	0	0
	+++	0	0	0
	Negative	20	11	31
	Not evaluable	2	1	3
Protein	+	11	7	18
	++	4	0	4
	+++	4	0	4
	Negative	6	4	10
	Not evaluable	1	1	2
Fibrin	+	6	5	11
	++	8	2	10
	+++	4	0	4
	Negative	5	5	10
	Not evaluable	3	0	3
Aspiration of melanin	+	12	5	17
	++	5	1	6
	+++	2	3	5
	Negative	6	3	9
	Not evaluable	1	0	1
Cytological signs for FIP	Typical	9	0	9
	Compatible	9	1	10
	Not indicative	8	11	19

FIP, feline infectious peritonitis.

postmortem changes consistent with uveitis. Two immunostained aqueous humor samples of one cat with FIP and of one control cat were considered nondiagnostic owing to the lack of cellular material. These samples were excluded from statistical analysis. The ICC result of two aqueous humor samples of control cats was questionable, as dark brown immunostaining was present within macrophages, but the typical granular pattern was missing. As these samples did not fulfill the inclusion criteria for a positive ICC result, they were considered ICC-negative.

Diagnostic sensitivity, specificity, and overall accuracy are shown in Table 5.

Table 3. Cellularity and results of immunocytochemical staining (ICC) of aqueous humor samples

Cat	Cellularity*	Immunostaining [†]	Group
1	++	Nonspecific ‡	FIP
2	+++	Neg.	FIP
3	+++	+++	FIP
4	+++	Neg.	FIP
5	+	+	FIP
6	+	++	FIP
7	+++	+++	FIP
8	++	Neg.	FIP
9	++	Neg.	FIP
10	+++	+	FIP
11	+++	+	FIP
12	+	+	FIP
13	++	Neg.	FIP
14	+	Neg.	FIP
15	++	+++	FIP
16	++	+	FIP
17	-	Acellular	FIP
18	+++	+++	FIP
19	+	Neg.	FIP
20	++	+	FIP
21	++	+++	FIP
22	++	+++	FIP
23	+	+	FIP
24	+	+	FIP
25	++	Neg.	FIP
26	+++	+	FIP
27	+++	Nonspecific [‡]	Control
28	+++	Neg.	Control
29	++	Neg.	Control
30	+	Neg.	Control
31	+	Neg.	Control
32	+++	+++	Control
33	++	Nonspecific	Control
34	+	Neg.	Control
35	++	+++	Control
36	+	Nonspecific	Control
37	+++	Neg.	Control
38	-	Acellular	Control

FIP, feline infectious peritonitis. *, low cellular; ++, medium cellular; +++, high cellular; - lack of cellular material, nondiagnostic. [†]+, low-yield positive immunostaining; ++, medium-yield positive immunostaining; +++, high-yield positive immunostaining; neg., negative immunostaining; acellular samples were regarded as nondiagnostic. [‡]Nonspecific staining was defined as diffuse and/or light cytoplasmic staining of macrophages. Samples with nonspecific staining were regarded as ICC-negative.

Table 4. Results of immunocytochemistry (ICC) in 36 aqueous humor samples (two samples were considered nondiagnostic and were therefore excluded from statistical analysis)

	FIP	Control	Total
Positive ICC	16	2	18
Negative ICC	9	9	18
Total	25	11	36

FIP, feline infectious peritonitis.

Table 5. Sensitivity, specificity, and overall accuracy of immunocytochemistry (ICC) in 36 aqueous humor samples (two samples were considered nondiagnostic and were therefore excluded from statistical analysis)

	ICC in aqueous humor
Sensitivity % (95% CI)	64.0 (42.5–82.0)
Specificity % (95% CI)	81.8 (48.2–97.7)
Overall accuracy % (95% CI)	69.4 (51.9–83.7)

95% CI, 95% confidence interval.

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the diagnostic value of an ICC assay in aqueous humor in cats suspected of having FIP. This study is the first to evaluate the use of aqueous humor for ICC analysis in the diagnosis of FIP.

In cats without effusion, antemortem diagnosis of FIP is still difficult. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is often applied to establish a diagnosis in various diagnostic samples such as effusion.^{23–26} In the absence of effusion, however, there is a need for other appropriate material. Whereas sensitivity of RT-PCR is very good in effusions,^{24–27} blood has proven not to be suitable due to a very low virus load. Even though cell-associated viremia was detected in all three cats experimentally infected with an enteric strain of FCoV in a recent study,²⁸ FCoV RNA could be detected in the whole blood, plasma, or white cell fraction of none of 20 cats in which FIP was experimentally induced in a different study.²⁷ In addition, sensitivity of realtime RT-PCR was also very low in PBMC, serum, or plasma of naturally infected cats with FIP.^{24,25} A recent study examined RT-PCR in CSF, which showed a slightly better but still insufficient sensitivity.²³ Specificity of a RT-PCR detecting FCoV in blood is only 20–88% and healthy cats can be positive by blood RT-PCR.^{29–31} Thus, a discriminative RT-PCR specifically able to distinguish FECV and FIPV could have improved specificity, but further studies are required to determine its diagnostic value, especially in material other than effusion. Therefore, evaluation of other diagnostic possibilities, such as ICC, is important to further facilitate the diagnosis of FIP.

Diagnostic specificity of the FCoV ICC in aqueous humor samples was only 81.8%. This is unexpected, as many previous studies evaluating immunostaining of

FCoV in macrophages in effusion described an excellent specificity of 100%,^{31–34} giving the impression that false-positive results do not occur. Two more recent studies, however, also found false-positive cats in immunofluorescence or ICC staining of effusion macrophages, and specificity was even slightly lower than in the present study (71% and 72%, respectively).^{6,7} Additionally, false-positive results have also been reported for ICC in CSF, and specificity was comparable to the present study (83%).⁸

It is possible that nonspecific staining of cells other than macrophages was misclassified in the present study as positive upon microscopic evaluation of the slides, leading to a false interpretation of the ICC results in these two cats. Viral replication of FIPV is restricted to monocytes/macrophages^{4,35–37} and therefore only immunostaining within the cytoplasm of macrophages should be considered ICC-positive. Nonspecific staining of other cells (e.g., red blood cells, neutrophils) might result from binding of the antibody to cellular structures other than the FIPV nucleocapsid. Nevertheless, as macrophages usually can easily be differentiated, this possibility seems unlikely, especially as two different investigators independently interpreted the false-positive results as positive.

In 9/12 aqueous humor samples of control cats, melanin was present to variable extents (Table 2). The two samples which were false-positive in ICC also were melanin-positive. Given the very similar colors of pigment and the chromogen diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB), there is a small likelihood of confusion between these two, and the identification of ICC-positive macrophages becomes more difficult. Melanin was also present in 19/25 samples of cats with FIP for which cytological data were available. Twelve of these 19 were ICC-positive. It could be argued that some of these could also be false-positive due to confusion of melanin with DAB. Thus, the use of a different chromogen for aqueous humor samples should be considered in the future. Nevertheless, the isometric and even distribution of FCoV antigen within the cytoplasm usually allows a definitive identification of ICC-positive macrophages, even in the presence of melanin.

Contamination might have been a problem during the staining procedure as well, as slides were kept in close proximity during all washing and incubation steps. Negative control slides could help to potentially identify this problem in future studies.

The two cats with false-positive ICC results suffered from lymphoma and pulmonary adenocarcinoma. In both cases, the diagnosis was confirmed by full postmortem examination including histopathological examination of tissue material. However, these two cats with false-positive results in the present study were severely ill. Similarly, all cats with false-positive immunostaining in previous studies suffered from terminal diseases, such as lymphoma, carcinoma, end-stage cardiac disease, or meningoencephalitis.^{6–8} These cats were certainly immunocompromised due to their diseases, and therefore were rather susceptible to

developing FIP. Thus, there is the possibility that the two cats with false-positive staining in the present study suffered from two diseases, their tumors and early-stage FIP, but still without histopathological lesions. Nevertheless, neither of the two cats with false-positive ICC results had 'FIP-typical' aqueous humor cytology.

In contrast to what was believed previously,^{38,39} replication of FECV is not restricted exclusively to the intestinal tract. As a consequence, FECV can be detected in monocytes in the blood of clinically healthy cats.^{29,30,40,41} Subsequently, FECV can spread systemically,⁴² and it might be possible that it enters the aqueous humor with other blood components in the presence of inflammation. The two cats that were tested false-positive suffered from end-stage neoplasia. Possibly, they were infected with a 'harmless' FECV that was able to cross the blood-aqueous barrier and enter the aqueous humor in the presence of their systemic disease. As a consequence, ICC might then have detected FECV, which could explain the false-positive results.

Overall, this lack of specificity, however, is a serious problem, because a very high specificity of a diagnostic test is required for a deadly disease like FIP. False-positive results can lead to euthanasia of cats suffering from potentially treatable diseases. Further studies are required to answer the question of false-positive staining.

Diagnostic sensitivity of the ICC assay in aqueous humor was 64.0%. Previous studies on ICC or immunofluorescence using effusion or CSF have reported higher sensitivities of 85–100%.^{6–8} One explanation that not all cats with FIP were positive in ICC is a low number of macrophages in the examined specimens. Especially in cats without uveitis the number of macrophages in the aqueous humor can be low, but could be much higher if inflammation is present. Given the fact that only one of the cats with positive ICC results on aqueous humor samples showed clinical signs or histopathological changes indicative of uveitis, the sensitivity appears rather high when compared to sensitivity of immunostaining in other material, such as effusion. Nevertheless, aqueous humor cytology was abnormal in all of the cats with FIP for which cytological data was available and in 11/12 of the control cats, regardless of whether they showed signs of uveitis. All of the control cats suffered from severe diseases, such as neoplasia, commonly associated with inflammation, which can explain their abnormal aqueous humor. Apparently, inflammatory and neoplastic cells originating from other parts of the body are able to cross the blood-aqueous barrier, even without the presence of uveitis. A sufficient number of macrophages was detected cytologically in 8/9 cats with FIP with false negative ICC results. Thus, lack of cellularity is unlikely responsible for the false-negative results.

All aqueous humor samples were obtained postmortem after the cats were euthanized or died due to disease progression, which is a limitation to the present study. It is

possible that antemortem paracentesis would lead to a better diagnostic utility of the ICC. Some degradation of macrophages might have occurred at the time of sampling. Antemortem paracentesis therefore might lead to a higher sensitivity of the ICC. Further explanations for a low sensitivity are a competitive binding of FCoV in immune complexes by circulating antibodies. Also the use of a monoclonal antibody in the staining protocol could be a reason, and a polyclonal antibody conjugate might have increased sensitivity (but concurrently decreased specificity).

Two aqueous humor samples were considered nondiagnostic, as adequate evaluation was not possible owing to the absence of a sufficient number of cells on the slides. It is possible that the aqueous humor already did not contain a large number of cells upon sampling. Additionally, processing of the samples during ICC staining could have further decreased the number of adequate cells upon the slides. Potentially, fixation of the cellular material on the slides could increase cellularity of the ICC slides and further studies should compare and evaluate different fixation methods to avoid low cellularity.

As aqueous humor was collected postmortem in the present study, a 22-G needle was used for paracentesis to increase the amount of sample material and facilitate the collection. If performed antemortem, 27- to 29-G needles are usually used to reduce the risk of ocular damage.²⁰ The use of the larger needle could have resulted in improved cell retrieval and reduced cell disruption which might be a problem in antemortem samples. This is a limitation of the present study. Another limitation is the fact that no control cats with uveitis were included, and future studies are required to compare this new method in cats with and without uveitis by taking antemortem samples. Additionally, ophthalmological examination was not routinely performed in all of the cats, and only a relatively small number of cats was included in each group. Another limitation of this study is the fact that only four cats with FIP did not have effusions. Therefore, the usefulness of ICC in the diagnosis of FIP in cats without effusion cannot be determined and further studies should be performed in cats without effusion. Finally, the present study would have been enhanced by the inclusion of a RT-PCR assay using aqueous humor samples. Possibly, RT-PCR would have been useful in the clarification of the origin of the positive immunostaining in the two cats without histopathologically confirmed FIP and in the equivocal samples. This comparison should be investigated in future studies.

The present study for the first time evaluated an ICC assay in the diagnosis of FIP using aqueous humor samples. The lack of specificity, however, is disappointing, as a high specificity would be required to confirm a diagnosis of FIP.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Karin Stingl, Institute of Veterinary Pathology, for her excellent technical support

while performing the ICC and IHC tests. Preliminary results were presented as an Abstract at the 25th ECVIM-CA congress, Lisbon, 10th to 12th September 2015 and at the 24th German Internal Medicine and Clinical Pathology Conference, Berlin, 29th to 30th January 2016.

REFERENCES

1. Pedersen NC. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1987; **218**: 529–550.
2. Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *American Journal of Veterinary Research* 1981; **42**: 363–367.
3. Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Archives of Virology* 2005; **150**: 2483–2500.
4. Stoddart CA, Scott FW. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *Journal of Virology* 1989; **63**: 436–440.
5. Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C *et al.* Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2009; **11**: 594–604.
6. Litster AL, Pogranichniy R, Lin TL. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *The Veterinary Journal* 2013; **198**: 362–366.
7. Felten S, Matiasek K, Gruendl S, *et al.* Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2017; **19**: 410–418.
8. Gruendl S, Matiasek K, Matiasek L *et al.* Diagnostic utility of cerebrospinal fluid immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the central nervous system. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2016; <https://doi.org/10.1177/1098612x16640839>.
9. Addie DD, Paltrinieri S, Pedersen NC. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2004; **6**: 125–130.
10. Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2009; **11**: 225–258.
11. Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Veterinary Pathology* 2014; **51**: 505–526.
12. Giori L, Giordano A, Giudice C *et al.* Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *Journal of Small Animal Practice* 2011; **52**: 152–157.
13. Jinks MR, English RV, Gilger BC. Causes of endogenous uveitis in cats presented to referral clinics in North Carolina. *Veterinary Ophthalmology* 2016; **19**(Suppl 1): 30–37.
14. Slauson DO, Finn JP. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1972; **160**: 729–734.
15. Doherty MJ. Ocular manifestations of feline infectious peritonitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1971; **159**: 417–424.
16. Gelatt KN. Iridocyclitis-panophthalmitis associated with feline infectious peritonitis. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician* 1973; **68**: 56–57.
17. Peiffer RL Jr, Wilcock BP. Histopathologic study of uveitis in cats: 139 cases (1978–1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; **198**: 135–138.
18. Lappin MR. Feline infectious uveitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2000; **2**: 159–163.
19. Wiggins KT, Vernau W, Lappin MR *et al.* Diagnostic utility of aqueocentesis and aqueous humor analysis in dogs and cats with anterior uveitis. *Veterinary Ophthalmology* 2014; **17**: 212–220.
20. Linn-Pearl RN, Powell RM, Newman HA *et al.* Validity of aqueocentesis as a component of anterior uveitis investigation in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology* 2015; **18**: 326–334.
21. Olin DD. Examination of the aqueous humor as a diagnostic aid in anterior uveitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1977; **171**: 557–559.
22. Ives EJ, Vanhaesebrouck AE, Cian F. Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2013; **15**: 1149–1153.
23. Doenges SJ, Weber K, Dorsch R *et al.* Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2016; **18**: 104–109.
24. Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, *et al.* Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2017; **19**: 344–350.
25. Felten S, Weider K, Doenges S, *et al.* Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2017; **19**: 321–335.
26. Longstaff L, Porter E, Crossley VJ, *et al.* Feline coronavirus quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction on effusion samples in cats with and without feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2017; **19**: 240–245.
27. Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H *et al.* Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Veterinary Microbiology* 2015; **175**: 157–166.
28. Desmarests LM, Vermeulen BL, Theuns S *et al.* Experimental feline enteric coronavirus infection reveals an aberrant infection pattern and shedding of mutants with impaired infectivity in enterocyte cultures. *Scientific Reports* 2016; **6**: 20022.
29. Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A *et al.* Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**: 684–689.
30. Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology* 1998; **62**: 193–205.
31. Hartmann K, Binder C, Hirschberger J *et al.* Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; **17**: 781–790.
32. Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N *et al.* Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis. *Tierärztliche Praxis* 1995; **23**: 92–99.
33. Paltrinieri S, Parodi MC, Cammarata G. In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology, and direct immunofluorescence test on peritoneal and

34 FELTEN ET AL.

- pleural effusions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; **11**: 358–361.
34. Parodi MC, Cammarata G, Paltrinieri S *et al.* Using direct immunofluorescence to detect coronaviruses in peritoneal and pleural effusions. *Journal of Small Animal Practice* 1993; **34**: 609–613.
35. Weiss RC, Scott FW. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: nature and development of viremia. *American Journal of Veterinary Research* 1981; **42**: 382–390.
36. Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J *et al.* Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1998; **65**: 243–257.
37. Kipar A, May H, Menger S *et al.* Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Veterinary Pathology* 2005; **42**: 321–330.
38. Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K *et al.* An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *American Journal of Veterinary Research* 1981; **42**: 368–377.
39. Pedersen NC, Evermann JF, McKeirnan AJ *et al.* Pathogenicity studies of feline coronavirus isolates 79–1146 and 79–1683. *American Journal of Veterinary Research* 1984; **45**: 2580–2585.
40. Meli M, Kipar A, Muller C *et al.* High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2004; **6**: 69–81.
41. Kipar A, Baptiste K, Barth A *et al.* Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2006; **8**: 69–72.
42. Kipar A, Meli ML, Baptiste KE *et al.* Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *Journal of General Virology* 2010; **91**: 1698–1707.

VI. DISKUSSION

In den Studien der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Katzen untersucht, bei denen FIP aufgrund klinischer und/oder labordiagnostischer Veränderungen eine wichtige Differentialdiagnose darstellte. Alle Katzen der drei Studienpopulationen zeigten eines oder mehrere mit FIP zu vereinbarende Probleme, wie Erguss, Fieber, Ikterus, Hyperglobulinämie, Uveitis oder neurologische Symptome. Die Diagnose FIP wurde bei allen Katzen der drei Studien histopathologisch und i. d. R. zusätzlich auch immunhistochemisch bestätigt. Bei allen Katzen der Kontroll-Gruppen wurde eine andere Erkrankung als FIP sicher diagnostiziert. Die Diagnosestellung erfolgte entweder *post mortem* mittels histopathologischer Untersuchung von Gewebeproben oder echokardiographisch (zur Diagnose dekompensierter Herzerkrankungen), zytologisch (zur Diagnose verschiedener Neoplasien) oder durch Kombination von Zytologie und bakteriologischer Untersuchung (zur Diagnose bakterieller Peritonitiden oder Pleuritiden). Aufgrund der gewählten Einschlusskriterien spiegeln die Studienpopulationen genau das Patientenkollektiv einer tierärztlichen Klinik oder Praxis wider, bei dem FIP als Differentialdiagnose eine Rolle spielt, eine diagnostische Probe auf FIP untersucht wird und das Ergebnis beurteilt werden muss. Viele bislang publizierte Studien zur Evaluation verschiedener diagnostischer Methoden beinhalteten Kontroll-Gruppen, welche ganz oder zu einem Teil aus klinisch gesunden, FECV-infizierten Katzen bestanden (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998b; SIMONS et al., 2005; CAN-SAHNA et al., 2007; HORNYAK et al., 2012). Dies sind jedoch weniger geeignete Kontrollen, da sich die Interpretation eines Testergebnisses bei Katzen ohne FIP-verdächtige Symptome deutlich von der bei Katzen mit Verdacht auf FIP unterscheidet. Einige Studien untersuchten zwar nur Katzen mit FIP-verdächtigen Symptomen, es erfolgte jedoch keine eindeutige Diagnosestellung und Einteilung in FIP- oder Kontroll-Gruppe (FEHR et al., 1996; SOMA et al., 2013). Die Aussagekraft dieser Studien ist daher fraglich. Weiterhin existieren Studien, die ausschließlich Katzen mit FIP betrachteten (GIORDANO et al., 2005; TSAI et al., 2011). Andere Studien wiederum werteten die Ergebnisse verschiedener diagnostischer Methoden für FIP-verdächtige Fälle retrospektiv aus (HARTMANN et al., 2003; GIORI et al.,

2011). Bislang mangelt es jedoch an prospektiven Studien, die diagnostische Tests anhand des Vergleichs von Katzen mit FIP und vergleichbar kranken Katzen mit einer definierten anderen Krankheit evaluieren.

Die größte Schwierigkeit der *ante-mortem*-Diagnose der FIP liegt in der Existenz der beiden Pathotypen FECV und FIPV. Wenngleich sich die beiden grundlegend in ihrer Virulenz unterscheiden, so sind sie doch elektronenoptisch und serologisch nicht zu differenzieren (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984a). Infolge vorangegangener Infektion mit FECV kommt es, unabhängig von der Entwicklung einer FIP, zur Bildung spezifischer Antikörper (PEDERSEN et al., 1981a; GUNN-MOORE et al., 1998a; KIPAR et al., 1999; MELI et al., 2004; VOGEL et al., 2010). Daher ist der Antikörper-Nachweis zur Diagnose der FIP nicht geeignet. Bislang beschriebene RT-PCR-Tests weisen zwar eine akute Infektion mit einem FCoV nach, erlauben jedoch keine Aussage über den vorhandenen Pathotyp (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; FEHR et al., 1996; GAMBLE et al., 1997; HERREWEGH et al., 1997; FOLEY et al., 1998; GUNN-MOORE et al., 1998b; KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; SIMONS et al., 2005; CAN-SAHNA et al., 2007; SHARIF et al., 2011; HORNYAK et al., 2012; DOENGES et al., 2016; DOENGES et al., 2017). Somit kann nicht mit letzter Sicherheit unterschieden werden, ob eine Katze mit positiver RT-PCR oder vorhandenen Antikörpern und FIP-verdächtigen Symptomen diese aufgrund einer FIP oder aufgrund einer anderen Erkrankung und begleitender FECV-Infektion hat. Eine solche Differenzierung ist im Hinblick auf den tödlichen Verlauf der FIP jedoch von entscheidender Bedeutung, um die Euthanasie von Katzen mit potenziell therapierbaren Erkrankungen zu vermeiden. Punktmutationen an den in enger Nachbarschaft liegenden Nukleotidpositionen 23531 und 23537 des S-Gens der FCoV (und die daraus resultierenden Substitutionen M1058L bzw. S1060A im S-Protein) korrelierten in > 95 % der untersuchten FCoV mit dem FIP-Phänotyp (CHANG et al., 2012). Diese Ergebnisse stellten die Grundlage für die Entwicklung einer real-time RT-PCR dar, welche in der ersten Studie der vorliegenden Arbeit evaluiert wurde. Sie erlauben die Hypothese, dass der Nachweis der beschriebenen Mutationen eine Unterscheidung zwischen FIPV und FECV und folglich eine sichere Diagnose *ante mortem* ermöglicht. Die Verfügbarkeit eines solchen Diagnostikums für eine möglichst große Zahl an veterinärmedizinischen Praxen oder Kliniken wäre sehr

wünschenswert.

Das Ziel der ersten Studie der vorliegenden Arbeit war daher die Evaluation der Sensitivität und Spezifität dieser real-time RT-PCR mit Mutations-spezifischen Hydrolyse-Sonden in Erguss und Serum oder Plasma von Katzen mit klinischem FIP-Verdacht. Diese PCR ist aktuell bereits kommerziell erhältlich (FIPV RealPCR™, IDEXX Laboratories (IDEXX REFERENCE LABORATORIES, 2015)). Sie wird im Folgenden zur Vereinfachung als „Mutations-PCR“ bezeichnet.

In der vorliegenden Studie betrug die Spezifität der Mutations-PCR im Erguss 95,8 %, nicht aber, wie eigentlich erwartet, 100 %, da FIPV mit Substitution M1058L auch im Erguss einer Kontroll-Katze mit chronischer Nierenerkrankung gefunden wurde. Bereits in einer früheren Studie wurden FCoV mit einer der beiden Substitutionen M1058L oder S1060A nicht nur bei Katzen mit FIP, sondern auch im Gewebe von gesunden FCoV-infizierten Katzen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde diskutiert, dass die genannten Substitutionen im S-Protein möglicherweise eher ein Marker für die systemische Verbreitung des FCoV als für den Pathotyp FIPV seien (PORTER et al., 2014). Dies könnte eine Erklärung für den Nachweis eines FCoV mit Substitution M1058L in der Kontroll-Katze in der ersten Studie dieser Arbeit sein. Möglicherweise war die Katze aber auch zusätzlich zu ihrer chronischen Nierenerkrankung an FIP erkrankt. Zwar wurde eine histopathologische Untersuchung durchgeführt, bei der keine FIP-typischen Gewebeläsionen auffindbar waren, und auch die IHC verlief negativ. Allerdings ist dennoch nicht auszuschließen, dass die Katze in einem frühen Stadium erkrankt war, in dem noch keine histopathologischen Läsionen feststellbar waren. Schließlich kann es sich natürlich auch um ein echtes falsch-positives Ergebnis aufgrund eines methodischen Fehlers handeln.

Die Sensitivität der Mutations-PCR betrug im Erguss 68,6 %. Im Vergleich zu den Ergebnissen früherer Studien, welche RT-PCR-Tests aus Erguss evaluierten und Sensitivitäten von 85 % – 100 % ermittelten, ist die Sensitivität in dieser Studie deutlich geringer (HERREWEGH et al., 1995a; GAMBLE et al., 1997; KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; TSAI et al., 2011; DOENGES et al., 2017; LONGSTAFF et al., 2017). Die Mutations-PCR, welche in dieser Studie evaluiert wurde, unterscheidet sich jedoch grundlegend von anderen RT-PCR-Methoden durch ihre Fähigkeit zur Differenzierung zwischen

FIPV und FECV. Nur Proben, die eindeutig einem Pathotyp zuzuordnende FCoV enthielten, wurden für die Berechnung von Sensitivität und Spezifität als positiv bewertet. Proben, welche entweder zu wenig FCoV-RNA enthielten, um den Pathotyp zu bestimmen oder Proben mit hoher Konzentration an FCoV, aber unbekanntem Sequenzvariationen wurden für die Berechnung der Sensitivität als negativ bewertet. Dies führte insgesamt zu einer niedrigeren Sensitivität der Mutations-PCR. Wäre die Sensitivität wie bei einer nicht-diskriminativen RT-PCR allein für den Nachweis von FCoV-RNA, egal welchen Pathotyps, berechnet worden, so läge sie im Erguss deutlich höher bei 97,1 %, was früheren Studienergebnissen entspricht (HERREWEGH et al., 1995a; GAMBLE et al., 1997; KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; TSAI et al., 2011; DOENGES et al., 2017; LONGSTAFF et al., 2017). Nur bei einer Katze mit FIP wurde im Erguss keine FCoV-RNA nachgewiesen. Es ist bekannt, dass die Viruslast bei Katzen mit FIP im Erguss deutlich höher ist als im Blut (PEDERSEN et al., 2015). Eine höhere Sensitivität der Mutations-PCR im Erguss als in Serum/Plasma war daher, wie auch bereits zuvor beschrieben (DOENGES et al., 2017), zu erwarten. In einer Studie mit experimentell mit FIPV infizierten Katzen wurde zu keinem Zeitpunkt der Infektion bei einer der Katzen FCoV-RNA nachgewiesen. Entweder waren die Katzen nicht virämisch oder die Konzentration der RNA lag unterhalb der Nachweisgrenze der RT-PCR (PEDERSEN et al., 2015). Auch in der vorliegenden Studie konnte bei keiner der Katzen in Serum oder Plasma ein eindeutiger FCoV-Pathotyp bestimmt werden; die Sensitivität lag bei 0 %. Daher war auch die Berechnung der Spezifität nicht sinnvoll. Lediglich bei zwei Katzen der FIP-Gruppe wurde FCoV-RNA in Serum/Plasma nachgewiesen, eine Bestimmung des Pathotyps war aber aufgrund der geringen Konzentration viraler Partikel nicht möglich. Dieses Ergebnis steht doch im Kontrast zu früheren Studienergebnissen mit Sensitivitäten von 15 % – 87 % für RT-PCR-Tests aus Blut. Allerdings sind die Ergebnisse der bisherigen Studien ebenfalls recht unterschiedlich (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998b; KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; DOENGES et al., 2017). Zudem wäre die Sensitivität der real-time RT-PCR für Serum/Plasma in dieser Studie, wenn sie, wie oben bereits für Erguss beschrieben, allein für den Nachweis von FCoV-RNA, egal welchen Pathotyps, berechnet worden wäre, mit 14,3 % etwas höher gewesen. Insgesamt eignen sich Serum und Plasma nicht für die Verwendung in der

Mutations-PCR.

Die Untersuchung der Proben mittels Mutations-PCR erlaubte die Unterscheidung sechs verschiedener Testergebnisse (IDEXX REFERENCE LABORATORIES, 2015):

1. „Nachweis des FIPV-Pathotyps“. Dies bedeutet, dass die nachgewiesenen FCoV zum FIPV-Pathotyp mit Substitution M1058L oder S1060A im S-Protein mutiert sind. Bei Katzen mit klinischen Symptomen unterstützt dieses Ergebnis die Diagnose einer FIP. In der vorliegenden Studie beherbergte die Mehrzahl (22/34) der FCoV-positiven Ergussproben der Katzen mit FIP diesen Pathotyp. Hierbei wurde ausschließlich Substitution M1058L nachgewiesen. S1060A kam in der vorliegenden Studienpopulation nicht vor. Diese Anteile sind vergleichbar mit den Ergebnissen einer aktuellen Studie, in der M1058L ebenfalls bei 65 % und S1060A nur bei 6 % der FCoV-positiven Ergussproben von Katzen mit FIP nachgewiesen wurde (LONGSTAFF et al., 2017). Zudem entsprechen die Ergebnisse früher schon ermittelten Zahlen für die Sequenzierung des S-Gens von FCoV: in der Mehrzahl der mutierten FIPV wurde Substitution M1058L aufgefunden. PORTER und Mitarbeiter (2014) ermittelten Substitution M1058L in 91 % der FCoV aus Gewebeproben von Katzen mit FIP. S1060A wurde nur bei einem von fünf FCoV nachgewiesen, welche nicht auch M1058L enthielten. CHANG und Mitarbeiter (2012) fanden Punktmutationen der Nukleotidposition 23531, aus denen Substitution M1058L resultiert, bei 92 % der FIPV. Nur 4 % der FIPV enthielten Mutationen an Nukleotidposition 23537 (verantwortlich für Substitution S1060A).

2. „Nachweis des FECV-Pathotyps“. Die nachgewiesenen FCoV sind nicht mutiert und die Katze hat ein geringes Risiko, an FIP zu erkranken. Keine der Katzen der Studienpopulation beherbergte FCoV vom Pathotyp FECV.

3. „Nachweis einer gemischten Population von FECV und FIPV“. Zwei Ergussproben von Katzen mit FIP enthielten eine gemischte Population von FIPV und FECV. Möglicherweise befanden sich diese Katzen in einem Übergangsstadium der FECV- zur FIPV-Infektion, in dem die Population an FECV nach der Mutation langsam von den schnell in Monozyten/Makrophagen replizierenden FIPV verdrängt wird. Alternativ ist es möglich, dass bei diesen Katzen mit FIP eine Superinfektion mit einem FECV vorlag. Dies wurde in der

Vergangenheit bereits beschrieben (CHANG et al., 2010; BANK-WOLF et al., 2014).

4. „Below limit of detection“. In zwei Blut- und neun Ergussproben wurde FCoV-RNA in geringer Konzentration nachgewiesen. Durch die geringe Konzentration viraler RNA unterhalb der Nachweisgrenze war die Bestimmung des Pathotyps nicht möglich. Zwei der Katzen mit einem solchen Ergebnis im Erguss waren nicht an FIP erkrankt. Möglicherweise handelte es sich bei den nachgewiesenen FCoV um FECV, die sich systemisch verbreitet hatten und in den Erguss übergetreten waren. Es ist bekannt, dass auch FECV systemisch in Monozyten zirkulieren und so auch im Erguss von Katzen mit anderen Erkrankungen als FIP vorhanden sein können (GUNN-MOORE et al., 1998b; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006a; KIPAR et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; FISH et al., 2017). Zu bedenken ist, dass diese Proben in einer nicht-diskriminativen RT-PCR falsch-positiv getestet worden wären. Dies verdeutlicht, dass der reine Nachweis von FCoV-RNA im Erguss mittels herkömmlicher RT-PCR nicht ausreicht, um die Diagnose FIP zu stellen.

5. „Indeterminate“. Eine Probe mit diesem Ergebnis enthält zwar FCoV-RNA in hoher Konzentration, die Bestimmung des Pathotyps ist aber nicht möglich, da das S-Gen unbekannte Sequenzvarianten enthält, die durch die verwendeten Primer nicht erkannt werden. Drei Ergussproben von Katzen mit FIP wurden als „indeterminate“ klassifiziert. Katzen mit FIP weisen höhere virale Konzentrationen auf als gesunde FECV-infizierte Katzen (KIPAR et al., 2006a; PORTER et al., 2014). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die drei Katzen tatsächlich an FIP erkrankt waren. Möglicherweise enthielten ihre FCoV andere Mutationen, welche zu FIP führten. Möglich wären beispielsweise Mutationen im 3c-Gen oder an anderen Stellen des S-Gens (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; LICITRA et al., 2013; BANK-WOLF et al., 2014; LEWIS et al., 2015). Da die verwendeten Primer spezifisch für FCoV vom Serotyp I sind, ist es zudem denkbar, dass auch FCoV vom Serotyp II als „indeterminate“ bewertet wurden. Sowohl FCoV vom Serotyp I als auch FCoV vom Serotyp II können FIP verursachen (HOHDATSU et al., 1992; BENETKA et al., 2004; KUMMROW et al., 2005; SHIBA et al., 2007; LIN et al., 2009b).

6. „Negativ“. Kein Nachweis von FCoV-RNA.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Aussage, dass Tests aus Erguss insgesamt bessere diagnostische Werte aufweisen als Tests aus Blut (HARTMANN et al., 2003). Besonders wichtig wäre daher die Entwicklung einer diagnostischen Testmethode für Katzen, die mit Verdacht auf FIP beim Tierarzt vorgestellt werden, und bei denen kein punktierbarer Körperhöhlenerguss vorhanden ist. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ist die Mutations-PCR bei Verwendung von Serum- oder Plasmaproben nicht zu empfehlen. Andere mögliche Materialien, die potenziell mittels Mutations-PCR untersucht werden könnten, sollten evaluiert und verglichen werden. Zu nennen sind hier insbesondere Liquor, verschiedene Gewebe oder auch Augenkammerwasser.

Eine zweite Möglichkeit des direkten Erregernachweises neben der RT-PCR ist die Immunfärbung von FCoV-Antigen in Makrophagen in Gewebe oder Körperflüssigkeiten. Es existieren mehrere Studien, die eine Immunfluoreszenzfärbung von FCoV-Antigen in Makrophagen in Körperhöhlenerguss evaluierten (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003; LITSTER et al., 2013). Immunzytochemisch wurde FCoV-Antigen bislang im Liquor (IVES et al., 2013; GRUENDL et al., 2016) und in FNA von Leber und Niere von Katzen mit Verdacht auf FIP nachgewiesen (GIORDANO et al., 2005). Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz werden bei der Immunzytochemie nicht-fluoreszierende Chromogene verwendet. Dies erlaubt einerseits die Beurteilung der Proben mittels herkömmlicher Lichtmikroskope und ermöglicht andererseits zusätzlich auch eine zytomorphologische Beurteilung der Zellen. Während die Immunfluoreszenzfärbung im Laufe der Zeit verblasst, bleibt die immunzytochemische Färbung lange Zeit erhalten und gestattet somit eine Re-Evaluation der Proben zu einem späteren Zeitpunkt und auch den Transport der Objektträger. Die Immunzytochemie ist so eine Methode, die gut auch für Tierärzte in der Praxis anwendbar ist.

Hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität der Immunfärbung von FCoV-Antigen in Makrophagen im Erguss existieren kontroverse Ergebnisse. Während die meisten publizierten Studien eine Spezifität von 100 % ermittelten (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003), ergab eine aktuellere Studie eine deutlich geringere Spezifität von nur 71 % (LITSTER et al., 2013).

Viele der älteren vorhandenen Studien waren jedoch retrospektiv, zudem erfolgte die Zuteilung der Katzen zur FIP- oder Kontroll-Gruppe teils nicht anhand einer histopathologischen Untersuchung.

Das Ziel der zweiten Studie der vorliegenden Arbeit war daher die Evaluation einer immunzytochemischen Nachweismethode für FCoV-Antigen in Erguss-Makrophagen. Hierbei wurde diese neue Färbart in einem bereits mehrfach verwendeten Probenmaterial (Erguss) etabliert. Die Immunzytochemie wurde in diesem Material bislang nicht untersucht, die Immunfluoreszenz ergab aber, wie beschrieben, zuvor kontroverse Ergebnisse. Das Ziel der dritten Studie der vorliegenden Arbeit war dann die Evaluation derselben immunzytochemischen Nachweismethode im Augenkammerwasser von Katzen mit Verdacht auf FIP mit oder ohne Uveitis. Bisher existieren keinerlei Daten zur diagnostischen Aussagekraft des direkten oder indirekten Erregernachweises aus Augenkammerwasser. Dies erscheint jedoch als geeignetes Material, da neurologische und/oder okuläre Symptome bei ungefähr 60 % der Katzen mit FIP auftreten, die keinen Erguss haben (PEDERSEN, 2009). Wie zuvor bereits ausgeführt, wurden ausschließlich Katzen in die Studien eingeschlossen, bei denen FIP eine wichtige Differentialdiagnose darstellte. Bei allen Katzen der FIP-Gruppen beider Studien wurde die Erkrankung mittels IHC bestätigt, was als Goldstandard für die Diagnose der FIP gilt (KIPAR et al., 1998a; ADDIE et al., 2004b; PEDERSEN, 2009; GIORI et al., 2011; KIPAR & MELI, 2014).

Bei insgesamt acht der 29 untersuchten Kontroll-Katzen wurde im Erguss ein falsch-positives Ergebnis der Immunzytochemie festgestellt. Die Spezifität betrug daher nur 72,4 %. Drei der falsch-positiv getesteten Katzen hatten ein Lymphom, zwei hatten ein Karzinom und drei Katzen litten an einer dekompensierten Herzerkrankung. Bei vier der Katzen wurde die Diagnose histopathologisch bestätigt. Bei den anderen vier Katzen erfolgte die Diagnosestellung *ante mortem* entweder zytologisch (eine Katze mit Lymphom, eine Katze mit Karzinom) oder echokardiographisch (eine Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie, eine Katze mit unklassifizierter Kardiomyopathie). Auch das Augenkammerwasser zweier von 12 Katzen wurde mittels Immunzytochemie falsch-positiv getestet; die Spezifität lag daher, ähnlich wie im Erguss, nur bei 81,8 %. Die Katzen mit falsch-positivem Ergebnis litten an einem Lymphom und einem pulmonären Adenokarzinom. Diese zwei Katzen waren Teil beider Studien. Interessanterweise

waren beide Katzen nicht nur im Augenkammerwasser, sondern auch im Erguss falsch-positiv. Dies spricht stark gegen einen methodischen Fehler der Immunzytochemie als Ursache für die falsch-positiven Ergebnisse.

Eine mögliche Erklärung ist, dass es sich bei dem falsch-positiv gefärbten Material in Erguss- und Augenkammerwasser-Makrophagen um FECV handelte. Anders als lange Zeit vermutet (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1984b), ist die Replikation von FECV nicht ausschließlich auf enterale Epithelien beschränkt. FECV-infizierte Katzen, die niemals an FIP erkrankten, entwickelten dennoch eine Virämie (HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998b; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006a; DESMARETS et al., 2016), was den Schluss nahelegt, dass FECV sich systemisch verbreiten (KIPAR et al., 2010) und möglicherweise im Zuge lokaler Entzündung zusammen mit anderen Blutbestandteilen auch in den Erguss (ADDIE et al., 2004b) oder das Augenkammerwasser übertreten können. Zwar hatte keine der beiden im Augenkammerwasser falsch-positiv getesteten Katzen klinische oder histopathologische Anzeichen einer Uveitis, und auch die Zytologie des Kammerwassers war weder typisch für noch kompatibel mit FIP. Allerdings wiesen beide Kammerwasserproben eine lympho-monozytäre Entzündung auf. Insgesamt war bei elf der 12 Kontroll-Katzen zytologisch eine Entzündung im Kammerwasser nachweisbar, obwohl bei allen keine Uveitis vorlag. Bei einer Katze mit Lymphom waren sogar neoplastische Zellen im Kammerwasser auffindbar, was zusammengenommen den Schluss nahelegt, dass es im Zuge systemischer Erkrankungen auch ohne lokale Entzündung zum Übertritt verschiedener Zellen über die Blut-Augen-Schranke kommen kann. So kann es auch bei den falsch-positiv getesteten Katzen in der vorliegenden Studie zum Übertritt FECV-infizierter Makrophagen in das Kammerwasser gekommen sein. Da FECV jedoch weniger Makrophagen infiziert als FIPV, in geringerem Maße in diesen repliziert und die Infektion nicht aufrecht erhalten kann (STODDART & SCOTT, 1989; DEWERCHIN et al., 2005; ROTTIER et al., 2005), wäre für FECV-infizierte Makrophagen nur ein geringes Signal der Immunfärbung zu erwarten. Dies war jedoch nicht der Fall. Es erscheint daher eher unwahrscheinlich, dass es sich bei dem falsch-positiv gefärbten Material um FECV handelte.

Der in der Studie verwendete Primär-Antikörper (FIPV 3-70) bindet im

Zytoplasma von Makrophagen an das Nukleokapsid der FCoV. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers an andere Strukturen innerhalb einer Zelle könnte zu falsch-positiver Immunfärbung führen. Werden diese unspezifisch gefärbten Zellen während des Mikroskopierens fälschlicherweise als positiv bewertet, so könnte dies zu einer Senkung der Spezifität der Immunzytochemie führen. Bislang existieren jedoch keine Berichte über die Bindung des verwendeten Antikörpers an endogene Strukturen. Zudem wurden unspezifische Bindungen des Sekundär-Antikörpers an endogene Immunglobuline mittels Zugabe von Normalserum während des Färbeprozesses blockiert. Auch Hintergrundfärbung, welche die korrekte Identifikation immunzytochemisch positiver Makrophagen erschwert haben könnte, wurde durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid während der Immunzytochemie weitestgehend reduziert. Die Replikation des FIPV erfolgt im Zytoplasma seiner Zielzellen, der Monozyten/Makrophagen (DEWERCHIN et al., 2005; ROTTIER et al., 2005). Es ist demgemäß entscheidend, ausschließlich eine Immunfärbung im Zytoplasma von Makrophagen, nicht aber im Zytoplasma anderer Zellen als positiv zu bewerten. Dies wurde selbstverständlich bei der Auswertung der Immunzytochemie in beiden Studien berücksichtigt. Eine Studie zur Immunfluoreszenzfärbung beschrieb zur sichereren Erkennung von Makrophagen deren Markierung mittels separater Immunfärbung (LITSTER et al., 2013), welche in den vorliegenden Studien nicht verwendet wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass es daher zur Fehlinterpretation unspezifischer Immunfärbung kam. Wie bereits dargelegt, bietet die Immunzytochemie gegenüber der Immunfluoreszenz jedoch den Vorteil, dass eine zytomorphologische Beurteilung der Zellen auf dem Objektträger erfolgen kann. Makrophagen sind zytologisch recht eindeutig von anderen Zellarten zu unterscheiden, sodass eine Verwechslung von Makrophagen mit anderen Zellen in den vorliegenden Studien eher unwahrscheinlich erscheint. Zudem ermöglicht die Immunzytochemie auch die Beurteilung der Qualität der Immunfärbung. In den vorliegenden Studien wurden ausschließlich Makrophagen mit intensiver und granulierter Färbung des Zytoplasmas als immunzytochemisch positiv bewertet (TAMMER et al., 1995). Eine Verwechslung von positiver Immunfärbung mit dem ebenfalls braunen Pigment Melanin im Augenkammerwasser und eine daraus resultierende Fehleinschätzung Melanin-positiver Proben ist denkbar. Bei beiden im Augenkammerwasser falsch-positiv getesteten Katzen wurde Melanin zytologisch

nachgewiesen. Normalerweise kann eine echte positive Immunfärbung dennoch anhand der gleichmäßigen Verteilung des Antigens im Zytoplasma eindeutig erkannt werden. Der wichtigste Hinweis darauf, dass es sich bei den falsch-positiven Ergebnissen im Augenkammerwasser nicht um einen methodischen Fehler handelte, ist die Tatsache, dass bei beiden Katzen nicht nur das Kammerwasser, sondern auch der Erguss ein falsch-positives Ergebnis ergab. Melanin spielt im Erguss naturgemäß keine Rolle. Es ist daher extrem unwahrscheinlich, dass die Untersuchung zweier verschiedener Materialien bei zwei unterschiedlichen Katzen nur aufgrund einer Fehlinterpretation oder eines methodischen Fehlers falsch-positiv verlief.

Am wahrscheinlichsten erscheint die Erklärung, dass die falsch-positiv getesteten Katzen zusätzlich zu ihrer jeweiligen Erkrankung auch an einer frühen Form der FIP litten. Keine der Kontroll-Katzen, bei denen eine histopathologische Untersuchung durchgeführt werden konnte, wies mit FIP zu vereinbarende Gewebeläsionen auf. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die falsch-positiv getesteten Kontroll-Katzen trotz unauffälliger Histopathologie an FIP erkrankt waren, jedoch in einem sehr frühen Stadium, in dem noch keine Veränderungen im untersuchten Gewebe nachzuweisen waren. Die Wahrscheinlichkeit für Mutationen steigt mit zunehmender Replikation der FCoV (POLAND et al., 1996). Alle Kontroll-Katzen beider Studien litten an schwerwiegenden systemischen Erkrankungen, welche mit Immunsuppression einhergehen und somit die Virusreplikation begünstigen (POLAND et al., 1996). Es ist daher gut denkbar, dass sich bei den falsch-positiv getesteten Katzen zusätzlich zur Grunderkrankung eine FIP entwickelte. Wie bereits dargelegt, könnte es dann im Zuge dessen zum Übertritt FIPV-infizierter Makrophagen in den Erguss oder, auch ohne vorliegende Uveitis, in das Augenkammerwasser gekommen sein. Dies ist eine recht wahrscheinliche Erklärung dafür, dass FCoV bei zwei Kontroll-Katzen sowohl im Erguss als auch im Kammerwasser nachgewiesen wurde.

Die Sensitivität der Immunzytochemie betrug im Erguss 85,2 %, im Augenkammerwasser 64,0 %. Während viele der bislang publizierten Studien über die Immunfluoreszenzfärbung im Erguss zu vergleichbaren Ergebnissen kamen oder teilweise sogar niedrigere Sensitivitäten von 57 % – 95 % ermittelten (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003), ergab eine neuere Studie

eine Sensitivität von 100 % (LITSTER et al., 2013). Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise durch Unterschiede in der Probengewinnung erklären. In der vorliegenden Studie und in einigen der bislang veröffentlichten Studien wurde der Erguss teilweise *ante mortem*, bei einigen Katzen aber auch *post mortem* entnommen. LITSTER und Mitarbeiter (2013) verwendeten jedoch nur *ante mortem* entnommenes Material. Es ist denkbar, dass die *post mortem* durchgeführte Probenentnahme die Sensitivität der Immunzytochemie in den vorliegenden Studien negativ beeinflusste. Tatsächlich wurden alle vier falsch-negativ getesteten Ergussproben und alle neun falsch-negativen Augenkammerwasserproben *post mortem* entnommen. Zudem war es nicht immer möglich, bei *post mortem* entnommenen Proben die Zeit zwischen dem Tod der Katze und der Probengewinnung zu dokumentieren, da viele Katzen von überweisenden Tierärzten bereits tot direkt zur Sektion geschickt wurden. Trotzdem wiesen alle Katzen mit falsch-negativer Immunzytochemie eine positive immunhistochemische Färbung in Gewebeläsionen auf.

Eine grundsätzlich zu niedrige Viruslast in den untersuchten Ergussproben ist sehr wahrscheinlich nicht verantwortlich für die falsch-negativen Ergebnisse der Immunzytochemie, da FIPV bei Katzen mit FIP in großen Mengen in der Ergussflüssigkeit vorliegt (PEDERSEN et al., 2015). Eine nachträgliche Reduktion der Virusmenge in den Proben durch die Lagerung der Objektträger bei -20 °C muss jedoch in Betracht gezogen werden, da FCoV-RNA außerhalb der Katze recht fragil ist (ADDIE & JARRETT, 2001). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Sensitivität der Immunfluoreszenzfärbung von FCoV-Antigen in Erguss-Makrophagen mit zunehmender Zeitspanne zwischen Probenentnahme und Probenbearbeitung abnimmt. Dies gilt jedoch insbesondere für die Lagerung bei Raumtemperatur (LITSTER et al., 2013). Informationen über die Zeit zwischen Probengewinnung und Immunfärbung existieren außerdem in der Studie von PARODI und Mitarbeitern (1993). Die Probenbearbeitung fand innerhalb von 15 Stunden statt, die Sensitivität der Immunfluoreszenz betrug 95,2 % (CAMMARATA PARODI et al., 1993). Studien zur Viruslast im Augenkammerwasser von Katzen mit FIP existieren bislang nicht. Es ist jedoch bekannt, dass nur Gewebe, welche in das Entzündungsgeschehen involviert sind, einen hohen Gehalt an FIPV aufweisen (PEDERSEN et al., 2015). Nur drei Katzen mit FIP hatten in der vorliegenden Studie klinische oder

histopathologische Anzeichen einer Uveitis, bei allen anderen Katzen waren die Augen nicht betroffen. Möglicherweise war bei diesen Katzen also die Viruslast im Augengewebe und damit auch der Übertritt von FCoV in das Kammerwasser nur gering. Die Tatsache, dass die Sensitivität der Immunzytochemie im Augenkammerwasser niedriger war als im Erguss, ließe sich dadurch gut erklären. Allerdings war die Immunzytochemie des Augenkammerwassers nur bei einer der drei Katzen mit Anzeichen einer Uveitis positiv; die Sensitivität war bei Vorliegen okulärer Symptome in dieser kleinen Katzenpopulation also nicht höher. Dies wiederum entspricht den Ergebnissen einer Studie zur Immunzytochemie im Liquor, bei der die Sensitivität bei Katzen ohne neurologische Symptome sogar besser war als bei Katzen mit zentralnervösen Symptomen (GRUENDL et al., 2016). Zudem wiesen zwei der neun Katzen mit falsch-negativer Immunzytochemie in der vorliegenden Studie Anzeichen einer pyogranulomatösen und damit für FIP typischen Entzündung (WIGGANS et al., 2014) im Augenkammerwasser auf. Bei drei der neun Katzen war die Zytologie des Kammerwassers zumindest kompatibel mit FIP. Dies kann für eine Beteiligung der Augen am Entzündungsprozess sprechen, auch wenn klinisch und histopathologisch keine Veränderungen vorlagen. Andererseits kann die entzündliche Zytologie des Kammerwassers auch durch den Übertritt von Entzündungszellen über die Blut-Augen-Schranke im Zuge der systemischen Entzündung entstanden sein. Eine niedrige lokale Viruslast als Erklärung für die niedrige Sensitivität wäre dann trotzdem möglich. Eine zu geringe Anzahl an Makrophagen kann die niedrige Sensitivität dagegen nicht hinreichend erklären, waren doch bei acht der neun falsch-negativ getesteten Katzen Makrophagen zytologisch im Kammerwasser nachweisbar und das Kammerwasser der Mehrzahl der Katzen (fünf von neun) wies eine mittlere Zellularität auf. Nur bei zwei Katzen war die Zellularität gering.

Körperhöhlenergüsse von Katzen mit FIP sind typischerweise proteinreich und damit viskös (SPARKES et al., 1991). LITSTER und Mitarbeiter (2013), welche eine Sensitivität von 100 % für die Immunfluoreszenz im Erguss ermittelten, verwendeten in ihrem Protokoll Hyaluronidase, um die Viskosität der Proben zu reduzieren und damit die Antigen-Erkennung zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit, in der die Sensitivität der Immunzytochemie sowohl im Erguss als auch im Augenkammerwasser deutlich niedriger war, wurde keine Hyaluronidase

verwendet. Möglicherweise kann dies die Diskrepanz zwischen den Studienergebnissen erklären. Allerdings ist Augenkammerwasser in der Regel deutlich weniger proteinreich als Erguss. Bei sieben der neun falsch-negativ getesteten Katzen war im Kammerwasser zytologisch kein Protein oder nur eine geringe Proteinkonzentration nachweisbar. Dennoch war die Sensitivität im Kammerwasser in der Studie dieser Arbeit deutlich niedriger als im Erguss. Zusätzlich war die Proteinkonzentration auch im Erguss aller vier falsch-negativ getesteten Katzen entweder gering oder es war kein deutlicher Proteingehalt vorhanden. Ein Zusammenhang zwischen niedriger Sensitivität der Immunzytochemie und der Viskosität oder der Proteinkonzentration der verwendeten Proben ist damit zwar nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich.

Schließlich ist eine mögliche Erklärung für die falsch-negativen Ergebnisse der Immunzytochemie in den vorliegenden Studien die kompetitive Bindung des FCoV-Antigens durch zirkulierende Antikörper, sodass es der Bindung durch den in der Immunfärbung verwendeten Primär-Antikörper nicht mehr zur Verfügung stand. Es ist zudem denkbar, dass die Verwendung eines polyklonalen Antikörper-Konjugats als Primär-Antikörper zu einer höheren Sensitivität der Immunzytochemie hätte führen können. Dennoch ermittelten frühere Studien bei Verwendung eines polyklonalen Antiserums, welches FIPV vom Serotyp I und FIPV vom Serotyp II sowie TGEV und CCV nachwies, teilweise sogar niedrigere Sensitivitäten (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HARTMANN et al., 2003).

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Mutations-PCR aus Erguss mit den Ergebnissen der Immunzytochemie, so scheint die Sensitivität der Mutations-PCR zunächst niedriger zu sein als die der Immunzytochemie im Erguss. Wie aber bereits dargelegt, wurde die Sensitivität der Mutations-PCR von 68,6 % für den Nachweis der verschiedenen FCoV-Pathotypen berechnet. Betrachtet man nur den Nachweis von FCoV-RNA, unabhängig vom jeweiligen Pathotyp, so ist die Sensitivität der real-time RT-PCR für alle FCoV mit 97,1 % für Erguss deutlich höher als die der Immunzytochemie im Erguss (85,2 %) oder im Kammerwasser (64,0 %). Falsch-positive Ergebnisse traten bei allen drei diagnostischen Methoden auf. Die Spezifität der Mutations-PCR war jedoch mit 95,8 % vergleichsweise höher als die der Immunzytochemie aus Kammerwasser (81,8 %) oder Erguss (72,4 %). Beide Katzen, die im Augenkammerwasser immunzytochemisch falsch-positiv getestet wurden, wiesen auch im Erguss

falsch-positive Ergebnisse auf.

Als Haupt-Limitation der Studien ist zu nennen, dass die Einteilung einiger Katzen in die Kontroll-Gruppe nicht anhand einer histopathologischen Diagnose erfolgte. So wurde die jeweilige Diagnose bei 14 von 25 Kontroll-Katzen in der PCR-Studie und bei 13 von 29 Kontroll-Katzen in der Immunzytochemie-Studie über Erguss *ante mortem* gestellt. Dies geschah entweder mittels Zytologie (bei Neoplasien), mittels Echokardiographie (bei dekompensierten Herzerkrankungen) oder mittels Zytologie und bakteriologischer Untersuchung (bei bakterieller Pleuritis oder Peritonitis). Somit kann nicht ganz sicher ausgeschlossen werden, dass einige Kontroll-Katzen statt oder zusätzlich zu ihrer diagnostizierten anderen Erkrankung FIP hatten, was Sensitivität und Spezifität der Methoden beeinflusst haben könnte.

Eine weitere Limitation der Studien sind die teilweise nicht sehr hohen Probenzahlen. Insbesondere bei der Untersuchung des Augenkammerwassers wäre eine größere Anzahl verfügbarer Proben wünschenswert gewesen. Zudem hatten von diesen mittels Immunzytochemie des Kammerwassers untersuchten Katzen nur drei klinische oder histopathologische Anzeichen einer Uveitis und alle diese Katzen hatten FIP. Die Evaluation der Methode an einer größeren Zahl von Katzen mit und ohne okuläre Symptome wäre sinnvoll. Dann sollte auch, anders als in der vorliegenden Studie, bei allen eingeschlossenen Katzen eine detaillierte ophthalmologische Untersuchung erfolgen. In der Praxis wird eine Parazentese normalerweise mit sehr dünnen Kanülen durchgeführt, um das Risiko eines Traumas am Auge weitestgehend zu minimieren (LINN-PEARL et al., 2015). In der vorliegenden Studie erfolgte die Entnahme des Kammerwassers jedoch ausschließlich *post mortem*, weshalb eine weitlumigere Kanüle verwendet werden konnte. Dies vereinfachte zum Einen die Probengewinnung und ermöglichte zum Anderen die Entnahme eines möglichst großen Probenvolumens. Gleichzeitig stellt dies aber eine Limitation der Studie dar, da *ante mortem* mit dünneren Kanülen möglicherweise weniger Zellen zu gewinnen wären oder es zu vermehrter Zerstörung von Zellen kommen könnte.

Schließlich ist als Limitation der vorliegenden Studien zu nennen, dass alle Augenkammerwasserproben und einige Ergussproben *post mortem* entnommen wurden. Zudem wurden die Proben für die Immunzytochemie und ein Teil der Erguss- und Plasmaproben für die Mutations-PCR über einige Zeit bei -20 °C

gelagert. Dies könnte die Sensitivität der Methoden negativ beeinflusst haben.

Zusammenfassend ist v. a. der Nachweis des mutierten Pathotyps FIPV im Erguss mittels Mutations-PCR sehr spezifisch für FIP. Dennoch wurde ein falsch-positives Ergebnis ermittelt. Serum/Plasma stellte sich aufgrund der zu geringen Viruslast als nicht geeignetes Probenmaterial dar. Die Tatsache, dass FCoV-RNA (ohne Bestimmung des Pathotyps) auch im Erguss von Kontroll-Katzen ohne FIP nachgewiesen wurde, verdeutlicht, dass eine normale RT-PCR allein nicht geeignet ist, um die Diagnose FIP zu stellen. Die Immunzytochemie im Erguss ergab ebenfalls falsch-positive Ergebnisse. Trotz akzeptabler Sensitivität ist der diagnostische Nutzen daher eingeschränkt, da die Spezifität bei einer tödlich verlaufenden Erkrankung wie FIP der wichtigste Parameter ist. Da die Immunzytochemie auch im Kammerwasser einiger Katzen falsch-positiv verlief und die Sensitivität in diesem Material gering war, ist das Kammerwasser kein geeignetes Probenmaterial zur Untersuchung mittels Immunzytochemie. Andere Materialien, die auch bei Katzen ohne Erguss zur Verfügung stehen, sollten evaluiert werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Das feline enterale Coronavirus (FECV) und das feline-infektiöse-Peritonitis-Virus (FIPV) sind zwei verschiedene Pathotypen des felinen Coronavirus (FCoV). Die derzeit meist vertretene Hypothese zur Pathogenese der felinen infektiösen Peritonitis (FIP) postuliert, dass FIPV durch eine oder mehrere Mutationen in einer infizierten Katze aus FECV hervorgeht. Im Gegensatz zum enteralen ist das FIP-verursachende Coronavirus in der Lage, effizient und dauerhaft in Makrophagen zu replizieren – eine Eigenschaft, die maßgeblich durch das Spike (S)-Protein der FCoV vermittelt wird. Mutationen im S-Gen spielen daher vermutlich eine zentrale Rolle in der Pathogenese der FIP.

FIP verläuft stets tödlich. Eine sichere Diagnosestellung *ante mortem* ist daher von entscheidender Bedeutung, um die Euthanasie von nicht an FIP erkrankten Katzen zu verhindern. Aufgrund der Existenz der beiden Pathotypen, zwischen denen bisher verfügbare diagnostische Tests nicht differenzieren können, ist dies jedoch nicht zuverlässig möglich. Ein idealer diagnostischer Test sollte zwischen mutiertem und nicht-mutiertem FCoV unterscheiden und *ante mortem* auch bei Katzen ohne Erguss durchgeführt werden können.

Das Ziel der ersten Studie der vorliegenden Arbeit war daher die Evaluation der Sensitivität und Spezifität einer real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis zweier kürzlich beschriebener und mit FIP assoziierter S-Gen-Mutationen („Mutations-PCR“). Als Probenmaterial wurden Erguss und/oder Serum/Plasma von Katzen mit histopathologisch und/oder immunhistochemisch bestätigter FIP und von Kontroll-Katzen, bei denen aufgrund klinischer und/oder labordiagnostischer Parameter der Verdacht einer FIP bestand, verwendet. Es wurde angenommen, dass dieser direkte Nachweis des mutierten FIPV eine sichere Diagnose der FIP *ante mortem* ermöglichen würde. Eine Kontroll-Katze wurde jedoch im Erguss falsch-positiv getestet, die Spezifität der Mutations-PCR betrug daher nur 95,8 %. Die Sensitivität der Mutations-PCR lag im Erguss bei 68,6 %; in Serum/Plasma betrug die Sensitivität 0 %. Aufgrund dieses niedrigen Wertes war die Berechnung der Spezifität in Serum/Plasma nicht sinnvoll.

Das Ziel der zweiten Studie war die Etablierung und Evaluation einer

immunzytochemischen Methode zum Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen im Erguss. Die Studienpopulation umfasste Katzen mit immunhistochemisch bestätigter FIP und Kontroll-Katzen mit ähnlichen Symptomen, aber definitiver Diagnose einer anderen Erkrankung. Auch diese diagnostische Methode ergab falsch-positive Ergebnisse; die Spezifität lag bei 72,4 %. Die Sensitivität der Immunzytochemie im Erguss war mit 85,2 % die höchste aller drei Studien.

Ziel der dritten Studie war die Untersuchung der Aussagekraft der im Erguss etablierten Immunzytochemie im Augenkammerwasser. Die Studie umfasste Katzen, bei denen klinisch und/oder labordiagnostisch der Verdacht auf FIP bestand. Bei einem Teil der Katzen wurde FIP mittels Immunhistochemie bestätigt. Bei Katzen der Kontroll-Gruppe wurde histopathologisch eine andere Erkrankung diagnostiziert, welche die Symptome erklärte. Da auch im Kammerwasser falsch-positive Ergebnisse auftraten, betrug die Spezifität nur 81,8 %. Die Sensitivität war mit 64,0 % die niedrigste der drei untersuchten Methoden.

In allen drei Studien traten falsch-positive Ergebnisse auf. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist, dass die untersuchten Kontroll-Katzen zusätzlich zu ihrer Erkrankung an einem frühen Stadium der FIP litten. Methodische Fehler sind unwahrscheinlich, insbesondere, da einige Katzen sowohl im Erguss als auch im Kammerwasser falsch-positiv getestet wurden. Mutations-PCR und Immunzytochemie ergaben bei Verwendung von Erguss akzeptable Sensitivitäten. Die Verwendung von Serum oder Plasma ist jedoch nicht zu empfehlen. Auch die Immunzytochemie aus Kammerwasser war nur wenig sensitiv. Eine mögliche Erklärung für die falsch-negativen Ergebnisse ist zum Einen eine niedrige Viruslast, dies ist insbesondere für Serum/Plasma und Augenkammerwasser bei Katzen ohne Uveitis denkbar. Da Katzen mit FIP meist hohe Virusmengen im Erguss aufweisen, kann eine zu niedrige Viruslast die falsch-negativen Ergebnisse der untersuchten Methoden im Erguss eher nicht erklären. Dagegen sind der Abbau von FCoV oder Makrophagen nach der Probenentnahme und die Lagerung der Proben mögliche Erklärungen der falsch-negativen Ergebnisse auch im Erguss. Zukünftige Studien sollten die mögliche Herkunft falsch-positiver Ergebnisse weiter untersuchen und diagnostische Methoden in Materialien evaluieren, welche auch bei Katzen ohne Erguss zur Verfügung stehen.

VIII. SUMMARY

Feline enteric coronavirus (FECV) and feline infectious peritonitis virus (FIPV) are two different pathotypes of feline coronavirus (FCoV). The two pathotypes differ fundamentally in their virulence but are undistinguishable morphologically and antigenetically. Currently, it is the widely accepted belief that the FIPV pathotype arises from the FECV pathotype by one or several mutations within an infected cat. Unlike the FECV pathotype, the FIPV pathotype has the ability to efficiently replicate and to sustain replication within macrophages. This tropism is mainly mediated by the FCoV spike protein. Therefore, mutations within the spike gene presumably play a major role in feline infectious peritonitis (FIP) pathogenesis.

FIP is one of the leading infectious causes of death within the cat population worldwide. The disease is always fatal and once clinical signs have developed, a diseased cat is usually euthanized within a few days. Hence, a definitive diagnosis *ante mortem* is crucial in order to prevent misdiagnosis and euthanasia of cats suffering from potentially treatable diseases. Nevertheless, establishing a reliable diagnosis is still challenging owing to the existence of the two pathotypes, which available diagnostic tests cannot differentiate. An ideal diagnostic test should be able to distinguish between mutated and non-mutated FCoV and should allow *ante mortem* sample examination even in the absence of effusions.

Therefore, the aim of the first study was to evaluate sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detecting previously described spike gene mutations (“discriminative PCR”). Effusion and/or serum/ plasma from cats with confirmed FIP and from control cats with signs consistent with FIP but definitive diagnosis of a disease other than FIP were examined. It was hypothesized that this method would allow a definitive *ante mortem* diagnosis of FIP by directly detecting the mutated FIPV pathotype. One control cat out of a group of 25 cats was tested false positive in effusion; specificity therefore was 95.8%. Sensitivity of the discriminative PCR was 68.6% in effusion; sensitivity in serum/plasma was 0%. Due to this very low value, a calculation of the specificity of serum/plasma was not possible.

The objective of the second study was to establish and investigate the diagnostic

utility of a new immunocytochemical assay detecting FCoV antigen within macrophages in effusion. The study population consisted of cats with immunohistochemically confirmed FIP and of controls with similar clinical and/or laboratory signs that were diagnosed with a disease other than FIP. Again, false positive results were detected and thus, specificity was 72.4%. Sensitivity of the immunocytochemical assay in effusion was 85.2%.

The aim of the third study was to evaluate sensitivity and specificity of this newly established immunocytochemical assay in aqueous humor. The study included cats suspected of having FIP due to clinical and/or laboratory findings. FIP was confirmed by immunohistochemistry in cats of the FIP group. The control cats were histopathologically diagnosed with a disease other than FIP which explained the clinical signs. As false positive results also occurred using aqueous humor, specificity of the immunocytochemical assay was only 81.8%. Sensitivity was 64.0%, which was the lowest of all three studies.

False positive results occurred in all of the three studies. The most likely explanation for this is that the control cats which tested positive suffered from early-stage FIP in addition to their diagnosed diseases. Methodological errors are very unlikely, especially considering that some of the cats were tested false positive in both effusion and aqueous humor. Using effusion, sensitivities of discriminative PCR and immunocytochemistry were reasonable. The use of serum/plasma, however, is not recommended, and also sensitivity of the immunocytochemistry using aqueous humor was rather low. A low virus load could possibly explain the existence of false negative results, especially in serum/plasma and in the aqueous humor of cats without ocular signs. On the other hand, this is an unlikely explanation for the false negative results in effusion, as cats with FIP are known to exhibit high viral loads in their effusions. Viral or macrophage degradation as a consequence of *post mortem* sampling and sample storage, however, are potential causes for the false negative results, even in effusion. Further studies evaluating different sample material which is also available in cats lacking effusions are warranted. Additionally, the possible origin of false positive results should be further investigated.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Acar DD, Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Roukaerts ID, Baetens W, Van Bockstael S, De Gryse GM, Desmarests LM, Nauwynck HJ. Upregulation of endothelial cell adhesion molecules characterizes veins close to granulomatous infiltrates in the renal cortex of cats with feline infectious peritonitis and is indirectly triggered by feline infectious peritonitis virus-infected monocytes in vitro. *J Gen Virol* 2016; 97: 2633-42.

Addie D, Jarrett O. Isolation of immune complexes in feline infectious peritonitis. IXth International Congress of Virology Abstracts, Glasgow, UK 1993: 60.

Addie D, Jarrett O. Control of feline coronavirus infections in breeding catteries by serotesting, isolation, and early weaning. *Feline Pract* 1995; 23: 92-5.

Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 594-604.

Addie DD, Jarrett O. Control of feline coronavirus infection in kittens. *Vet Rec* 1990; 126: 164.

Addie DD, Jarrett O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec* 1992a; 130: 133-7.

Addie DD, Jarrett O. Feline coronavirus antibodies in cats. *Vet Rec* 1992b; 131: 202-3.

Addie DD, Toth S, Murray GD, Jarrett O. Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. *Am J Vet Res* 1995; 56: 429-34.

Addie DD, Toth S, Herrewegh AA, Jarrett O. Feline coronavirus in the intestinal contents of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Rec* 1996; 139: 522-3.

Addie DD. Clustering of feline coronaviruses in multicat households. *Vet J* 2000; 159: 8-9.

Addie DD, Dennis JM, Toth S, Callanan JJ, Reid S, Jarrett O. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. *Vet Rec* 2000; 146: 419-24.

Addie DD, Jarrett O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec* 2001; 148: 649-53.

Addie DD, Schaap IA, Nicolson L, Jarrett O. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J Gen Virol* 2003; 84: 2735-44.

Addie DD, McLachlan SA, Golder M, Ramsey I, Jarrett O. Evaluation of an in-practice test for feline coronavirus antibodies. *J Feline Med Surg* 2004a; 6: 63-7.

Addie DD, Paltrinieri S, Pedersen NC. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J Feline Med Surg* 2004b; 6: 125-30.

Addie DD, le Poder S, Burr P, Decaro N, Graham E, Hofmann-Lehmann R, Jarrett O, McDonald M, Meli ML. Utility of feline coronavirus antibody tests. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 152-62.

Anishchenko M, Bowen RA, Paessler S, Austgen L, Greene IP, Weaver SC. Venezuelan encephalitis emergence mediated by a phylogenetically predicted viral mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 4994-9.

Balint A, Farsang A, Zadori Z, Hornyak A, Dencso L, Almazan F, Enjuanes L, Belak S. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol* 2012; 86:

6258-67.

Balint A, Farsang A, Zadori Z, Belak S. Comparative in vivo analysis of recombinant type II feline coronaviruses with truncated and completed ORF3 region. *PLoS One* 2014; 9: e88758.

Bank-Wolf BR, Stallkamp I, Wiese S, Moritz A, Tekes G, Thiel HJ. Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2014; 173: 177-88.

Barker EN, Tasker S, Gruffydd-Jones TJ, Tuplin CK, Burton K, Porter E, Day MJ, Harley R, Fewes D, Helps CR, Siddell SG. Phylogenetic analysis of feline coronavirus strains in an epizootic outbreak of feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2013; 27: 445-50.

Barlough JE, Stoddart CA. Cats and coronaviruses. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193: 796-800.

Bauer BS, Kerr ME, Sandmeyer LS, Grahn BH. Positive immunostaining for feline infectious peritonitis (FIP) in a Sphinx cat with cutaneous lesions and bilateral panuveitis. *Vet Ophthalmol* 2013; 16 Suppl 1: 160-3.

Benetka V, Kubber-Heiss A, Kolodziejek J, Nowotny N, Hofmann-Parisot M, Mostl K. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2004; 99: 31-42.

Berg AL, Ekman K, Belak S, Berg M. Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Microbiol* 2005; 111: 15-23.

Boettcher IC, Steinberg T, Matiasek K, Greene CE, Hartmann K, Fischer A. Use of anti-coronavirus antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of feline

infectious peritonitis involving the central nervous system in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 199-205.

Borschensky CM, Reinacher M. Mutations in the 3c and 7b genes of feline coronavirus in spontaneously affected FIP cats. *Res Vet Sci* 2014; 97: 333-40.

Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* 2003; 77: 8801-11.

Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1445-52.

Cammarata Parodi M, Cammarata G, Paltrinieri S, Lavazza A, Ape F. Using direct immunofluorescence to detect coronaviruses in peritoneal and pleural effusions. *J Small Anim Pract* 1993; 34: 609-13.

Can-Sahna K, Soydal Ataseven V, Pinar D, Oguzoglu TC. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 369-72.

Casais R, Dove B, Cavanagh D, Britton P. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J Virol* 2003; 77: 9084-9.

Cave TA, Golder MC, Simpson J, Addie DD. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 53-8.

Ceron JJ, Eckersall PD, Martynez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 85-99.

Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJ. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol* 2010; 91: 415-20.

Chang HW, Egberink HF, Rottier PJ. Sequence analysis of feline coronaviruses and the circulating virulent/avirulent theory. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 744-6.

Chang HW, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ, Rottier PJ. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1089-95.

Cornelissen E, Dewerchin HL, Van Hamme E, Nauwynck HJ. Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells isolated from cats with FIP. *Vet Microbiol* 2007; 121: 131-7.

Cornelissen E, Dewerchin HL, Van Hamme E, Nauwynck HJ. Absence of antibody-dependent, complement-mediated lysis of feline infectious peritonitis virus-infected cells. *Virus Res* 2009; 144: 285-9.

De Groot-Mijnes JD, van Dun JM, van der Most RG, de Groot RJ. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *J Virol* 2005; 79: 1036-44.

De Haan CA, Haijema BJ, Schellen P, Wichgers Schreur P, te Lintelo E, Vennema H, Rottier PJ. Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: how furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. *J Virol* 2008; 82: 6078-83.

Dean GA, Olivry T, Stanton C, Pedersen NC. In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Vet Microbiol* 2003; 97: 1-12.

Declercq J, De Bosschere H, Schwarzkopf I, Declercq L. Papular cutaneous lesions in a cat associated with feline infectious peritonitis. *Vet Dermatol* 2008;

19: 255-8.

Dedeurwaerder A, Desmarets LM, Olyslaegers DA, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet Microbiol* 2013; 162: 447-55.

Dedeurwaerder A, Olyslaegers DA, Desmarets LM, Roukaerts ID, Theuns S, Nauwynck HJ. ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN-alpha-induced antiviral response. *J Gen Virol* 2014; 95: 393-402.

Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 2011; 8: 270-9.

Desmarets LM, Vermeulen BL, Theuns S, Conceicao-Neto N, Zeller M, Roukaerts ID, Acar DD, Olyslaegers DA, Van Ranst M, Matthijnsens J, Nauwynck HJ. Experimental feline enteric coronavirus infection reveals an aberrant infection pattern and shedding of mutants with impaired infectivity in enterocyte cultures. *Sci Rep* 2016; 6: 20022.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol* 2005; 150: 2483-500.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition. *J Gen Virol* 2006; 87: 1685-90.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Van Hamme E, Smits K, Verhasselt B, Nauwynck HJ. Surface-expressed viral proteins in feline infectious peritonitis virus-infected monocytes are internalized through a clathrin- and caveolae-independent pathway. *J Gen Virol* 2008; 89: 2731-40.

Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, Fux R, Fischer A, Matiasek LA, Matiasek K, Hartmann K. Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *J Feline Med Surg* 2016; 18: 104-9.

Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, Fux R, Hartmann K. Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 344-50.

Duthie S, Eckersall PD, Addie DD, Lawrence CE, Jarrett O. Value of alpha 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Rec* 1997; 141: 299-303.

Dye C, Siddell SG. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 202-13.

Egberink HF, Herrewegh AP, Schuurman NM, van der Linde-Sipman JS, Horzinek MC, de Groot RJ. FIP, easy to diagnose? *Vet Q* 1995; 17 Suppl 1: 24-5.

Fehr D, Bolla S, Herrewegh AA, Horzinek MC, Lutz H. Detection of feline coronavirus using RT PCR: basis for the study of the pathogenesis of feline infectious peritonitis (FIP). *Schweiz Arch Tierheilkd* 1996; 138: 74-9.

Fischer Y, Ritz S, Weber K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Randomized, placebo controlled study of the effect of propentofylline on survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1270-6.

Fischer Y, Sauter-Louis C, Hartmann K. Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol* 2012; 41: 558-67.

Fish EJ, Diniz PPV, Juan YC, Bossong F, Collisson EW, Drechsler Y, Kaltenboeck B. A cross-sectional quantitative RT-PCR study of feline

coronavirus viremia and replication in peripheral blood of healthy shelter cats in Southern California. *J Feline Med Surg* 2017; Epub ahead of print: doi: 10.1177/1098612x17705227.

Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *J Am Vet Med Assoc* 1997a; 210: 1307-12.

Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc* 1997b; 210: 1313-8.

Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, Poland A, Pedersen NC. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 415-23.

Foley JE, Rand C, Leutenegger C. Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2003; 5: 313-22.

Gamble DA, Lobbiani A, Gramegna M, Moore LE, Colucci G. Development of a nested PCR assay for detection of feline infectious peritonitis virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 673-5.

Gelain ME, Meli M, Paltrinieri S. Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. *J Feline Med Surg* 2006; 8: 389-99.

Gerber JD, Ingersoll JD, Gast AM, Christianson KK, Selzer NL, Landon RM, Pfeiffer NE, Sharpee RL, Beckenhauer WH. Protection against feline infectious peritonitis by intranasal inoculation of a temperature-sensitive FIPV vaccine. *Vaccine* 1990; 8: 536-42.

Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, Paltrinieri S. Changes in some acute phase

protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J* 2004; 167: 38-44.

Giordano A, Paltrinieri S, Bertazzolo W, Milesi E, Parodi M. Sensitivity of Tru-cut and fine needle aspiration biopsies of liver and kidney for diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 368-74.

Giordano A, Paltrinieri S. Interferon-gamma in the serum and effusions of cats with feline coronavirus infection. *Vet J* 2009; 180: 396-8.

Giordano A, Stranieri A, Rossi G, Paltrinieri S. High diagnostic accuracy of the Sysmex XT-2000iV delta total nucleated cells on effusions for feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol* 2015; 44: 295-302.

Giori L, Giordano A, Giudice C, Grieco V, Paltrinieri S. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *J Small Anim Pract* 2011; 52: 152-7.

Goitsuka R, Ohashi T, Ono K, Yasukawa K, Koishibara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Hasegawa A. IL-6 activity in feline infectious peritonitis. *J Immunol* 1990; 144: 2599-603.

Gruendl S, Matiasek K, Matiasek L, Fischer A, Felten S, Jurina K, Hartmann K. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the central nervous system. *J Feline Med Surg* 2016; 19: 576-85.

Gunn-Moore DA, Caney SM, Gruffydd-Jones TJ, Helps CR, Harbour DA. Antibody and cytokine responses in kittens during the development of feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Immunol Immunopathol* 1998a; 65: 221-42.

Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of

blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 1998b; 62: 193-205.

Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J Virol* 1996; 70: 8977-83.

Haijema BJ, Volders H, Rottier PJ. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J Virol* 2003; 77: 4528-38.

Haijema BJ, Volders H, Rottier PJ. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol* 2004; 78: 3863-71.

Hardy WD, Jr., Hurvitz AI. Feline infectious peritonitis: experimental studies. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158: 994-1002.

Harpold LM, Legendre AM, Kennedy MA, Plummer PJ, Millsaps K, Rohrbach B. Fecal shedding of feline coronavirus in adult cats and kittens in an Abyssinian cattery. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215: 948-51.

Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, Cole D, Reinacher M, Schroo S, Frost J, Egberink H, Lutz H, Hermanns W. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 781-90.

Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35: 39-79.

Hartmann K, Ritz S. Treatment of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123: 172-5.

Hayashi T, Goto N, Takahashi R, Fujiwara K. Systemic vascular lesions in feline infectious peritonitis. *Nihon Juigaku Zasshi* 1977; 39: 365-77.

Hayashi T, Utsumi F, Takahashi R, Fujiwara K. Pathology of non-effusive type feline infectious peritonitis and experimental transmission. *Nihon Juigaku Zasshi* 1980; 42: 197-210.

Hazuchova K, Held S, Neiger R. Usefulness of acute phase proteins in differentiating between feline infectious peritonitis and other diseases in cats with body cavity effusions. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 809-16.

Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses* 2012; 4: 557-80.

Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1995a; 33: 684-9.

Herrewegh AA, Vennema H, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology* 1995b; 212: 622-31.

Herrewegh AA, Mahler M, Hedrich HJ, Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology* 1997; 234: 349-63.

Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol* 1998; 72: 4508-14.

Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, Frost J, Lutz H, Kraft W. Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis. *Tierarztl Prax* 1995; 23: 92-9.

Hohdatsu T, Okada S, Ishizuka Y, Yamada H, Koyama H. The prevalence of

types I and II feline coronavirus infections in cats. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 557-62.

Hohdatsu T, Izumiya Y, Yokoyama Y, Kida K, Koyama H. Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch Virol* 1998a; 143: 839-50.

Hohdatsu T, Yamada M, Tominaga R, Makino K, Kida K, Koyama H. Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus. *J Vet Med Sci* 1998b; 60: 49-55.

Hok K. Demonstration of feline infectious peritonitis virus in conjunctival epithelial cells from cats. A simple and reliable method for clinical veterinary virology screening. *APMIS* 1989; 97: 820-4.

Hok K. Demonstration of feline corona virus (FCV) antigen in organs of cats suspected of feline infectious peritonitis (FIP) disease. *APMIS* 1990; 98: 659-64.

Hok K. A comparison between immunofluorescence staining on smears from Membrana nictitans (M3 test), immunohistopathology and routine pathology in cats with suspected feline infectious peritonitis (FIP). *Acta Vet Scand* 1991; 32: 171-6.

Hora AS, Asano KM, Guerra JM, Mesquita RG, Maiorka P, Richtzenhain LJ, Brandao PE. Intra-host diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses? *Scientific World Journal* 2013; 2013: 572325.

Hora AS, Tonietti PO, Taniwaki SA, Asano KM, Maiorka P, Richtzenhain LJ, Brandao PE. Feline coronavirus 3c protein: a candidate for a virulence marker? *Biomed Res Int* 2016; 2016: 8560691.

Hornyak A, Balint A, Farsang A, Balka G, Hakhverdyan M, Rasmussen TB, Blomberg J, Belak S. Detection of subgenomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer-probe energy transfer (P-sg-QPCR). *J Virol Methods* 2012; 181: 155-63.

Horzinek M, Osterhaus A. Feline infectious peritonitis: a coronavirus disease of cats. *Small Anim Pract* 1978; 19: 623-30.

Horzinek MC, Osterhaus AD. The virology and pathogenesis of feline infectious peritonitis. Brief review. *Arch Virol* 1979a; 59: 1-15.

Horzinek MC, Osterhaus AD. Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey. *Am J Vet Res* 1979b; 40: 1487-92.

Horzinek MC, Ederveen J, Egberink H, Jacobse-Geels HE, Niewold T, Prins J. Virion polypeptide specificity of immune complexes and antibodies in cats inoculated with feline infectious peritonitis virus. *Am J Vet Res* 1986; 47: 754-61.

Hoskins JD. Coronavirus infection in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1993; 23: 1-16.

Hsieh LE, Huang WP, Tang DJ, Wang YT, Chen CT, Chueh LL. 3C protein of feline coronavirus inhibits viral replication independently of the autophagy pathway. *Res Vet Sci* 2013; 95: 1241-7.

IDEXX Reference laboratories. IDEXX Reference Laboratories now offers the Feline Infectious Peritonitis (FIP) Virus RealPCR™ Test to aid in the diagnosis of this devastating feline disease. Diagnostic Update 2015: <https://www.idexx.com/files/small-animal-health/products-and-services/reference-laboratories/feline-infectious-peritonitis-virus.pdf>. August 25, 2017.

Ives EJ, Vanhaesebrouck AE, Cian F. Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *J Feline*

Med Surg 2013; 15: 1149-53.

Jacobse-Geels HE, Daha MR, Horzinek MC. Isolation and characterization of feline C3 and evidence for the immune complex pathogenesis of feline infectious peritonitis. *J Immunol* 1980; 125: 1606-10.

Jacobse-Geels HE, Daha MR, Horzinek MC. Antibody, immune complexes, and complement activity fluctuations in kittens with experimentally induced feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1982; 43: 666-70.

Jacobse-Geels HE, Horzinek MC. Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. *J Gen Virol* 1983; 64: 1859-66.

Jinks MR, English RV, Gilger BC. Causes of endogenous uveitis in cats presented to referral clinics in North Carolina. *Vet Ophthalmol* 2016; 19 Suppl 1: 30-7.

Kennedy M, Boedeker N, Gibbs P, Kania S. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2001; 81: 227-34.

Kennedy MA, Brenneman K, Millsaps RK, Black J, Potgieter LN. Correlation of genomic detection of feline coronavirus with various diagnostic assays for feline infectious peritonitis. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 93-7.

Kennedy MA, Abd-Eldaim M, Zika SE, Mankin JM, Kania SA. Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats. *Am J Vet Res* 2008; 69: 1179-82.

Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, Kohler K, Reinacher M. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998a; 65: 243-57.

Kipar A, Kremendahl J, Addie DD, Leukert W, Grant CK, Reinacher M. Fatal enteritis associated with coronavirus infection in cats. *J Comp Pathol* 1998b; 119: 1-14.

Kipar A, Bellmann S, Gunn-Moore DA, Leukert W, Kohler K, Menger S, Reinacher M. Histopathological alterations of lymphatic tissues in cats without feline infectious peritonitis after long-term exposure to FIP virus. *Vet Microbiol* 1999; 69: 131-7.

Kipar A, Kohler K, Leukert W, Reinacher M. A comparison of lymphatic tissues from cats with spontaneous feline infectious peritonitis (FIP), cats with FIP virus infection but no FIP, and cats with no infection. *J Comp Pathol* 2001; 125: 182-91.

Kipar A, May H, Menger S, Weber M, Leukert W, Reinacher M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol* 2005; 42: 321-30.

Kipar A, Baptiste K, Barth A, Reinacher M. Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *J Feline Med Surg* 2006a; 8: 69-72.

Kipar A, Meli ML, Failing K, Euler T, Gomes-Keller MA, Schwartz D, Lutz H, Reinacher M. Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2006b; 112: 141-55.

Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ, Lutz H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol* 2010; 91: 1698-707.

Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol* 2014; 51: 505-26.

Kiss I, Kecskemeti S, Tanyi J, Klingeborn B, Belak S. Preliminary studies on feline coronavirus distribution in naturally and experimentally infected cats. *Res Vet Sci* 2000; 68: 237-42.

Kiss I, Poland AM, Pedersen NC. Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 89-97.

Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 717-26.

Kummrow M, Meli ML, Haessig M, Goenczi E, Poland A, Pedersen NC, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1209-15.

Kuo L, Godeke GJ, Raamsman MJ, Masters PS, Rottier PJ. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* 2000; 74: 1393-406.

Lewis CS, Porter E, Matthews D, Kipar A, Tasker S, Helps CR, Siddell SG. Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. *J Gen Virol* 2015; 96: 1358-68.

Li X, Scott FW. Detection of feline coronaviruses in cell cultures and in fresh and fixed feline tissues using polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994; 42: 65-77.

Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE, Whittaker GR. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1066-73.

Lin CN, Su BL, Huang HP, Lee JJ, Hsieh MW, Chueh LL. Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2009a; 11: 413-9.

Lin CN, Su BL, Wang CH, Hsieh MW, Chueh TJ, Chueh LL. Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: a 5-year study in Taiwan. *Vet Microbiol* 2009b; 136: 233-9.

Linn-Pearl RN, Powell RM, Newman HA, Gould DJ. Validity of aqueocentesis as a component of anterior uveitis investigation in dogs and cats. *Vet Ophthalmol* 2015; 18: 326-34.

Litster AL, Pogranichniy R, Lin TL. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *Vet J* 2013; 198: 362-6.

Longstaff L, Porter E, Crossley VJ, Hayhow SE, Helps CR, Tasker S. Feline coronavirus quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction on effusion samples in cats with and without feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 240-5.

Madewell BR, Crow SE, Nickerson TR. Infectious peritonitis in a cat that subsequently developed a myeloproliferative disorder. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 172: 169-72.

Meli M, Kipar A, Muller C, Jenal K, Gonczi E, Borel N, Gunn-Moore D, Chalmers S, Lin F, Reinacher M, Lutz H. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 69-81.

Meli ML, Burr P, Decaro N, Graham E, Jarrett O, Lutz H, McDonald M, Addie DD. Samples with high virus load cause a trend toward lower signal in feline coronavirus antibody tests. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 295-9.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenichitsomanus PT, McMichael A, Malasit P, Screaton G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003; 9: 921-7.

Montali RJ, Strandberg JD. Extraperitoneal lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol* 1972; 9: 109-21.

Motokawa K, Hohdatsu T, Hashimoto H, Koyama H. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline, canine and porcine coronaviruses. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 425-33.

Mwase M, Shimada K, Mumba C, Yabe J, Squarre D, Madarame H. Positive immunolabelling for feline infectious peritonitis in an African lion (*Panthera leo*) with bilateral panuveitis. *J Comp Pathol* 2015; 152: 265-8.

Neu H, Pfeiffer E. FIP (Feline Infektiöse Peritonitis): Klinische Frühsymptome und vorausgegangene Belastungen. *Kleintierpraxis* 1985; 30: 277-332.

Oldstone MB, Lampert PW. Antibody mediated complement dependent lysis of virus infected cells. *Springer Semin Immunopathol* 1979; 2: 261-83.

Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Desmarests LM, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Altered expression of adhesion molecules on peripheral blood leukocytes in feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2013; 166: 438-49.

Osterhaus AD, Horzinek MC, Reynolds DJ. Seroepidemiology of feline infectious peritonitis virus infections using transmissible gastroenteritis virus as antigen. *Zentralbl Veterinarmed B* 1977; 24: 835-41.

Paltrinieri S, Cammarata Parodi M, Cammarata G, Comazzi S. Some aspects of

humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998a; 65: 205-20.

Paltrinieri S, Cammarata Parodi M, Cammarata G, Mambretti M. Type IV hypersensitivity in the pathogenesis of FIPV-induced lesions. *Zentralbl Veterinarmed B* 1998b; 45: 151-9.

Paltrinieri S, Cammarata Parodi M, Cammarata G. In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology, and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 358-61.

Paltrinieri S, Grieco V, Comazzi S, Cammarata Parodi M. Laboratory profiles in cats with different pathological and immunohistochemical findings due to feline infectious peritonitis (FIP). *J Feline Med Surg* 2001; 3: 149-59.

Paltrinieri S, Comazzi S, Spagnolo V, Giordano A. Laboratory changes consistent with feline infectious peritonitis in cats from multicat environments. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49: 503-10.

Paltrinieri S, Ponti W, Comazzi S, Giordano A, Poli G. Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96: 141-8.

Paltrinieri S, Giordano A, Tranquillo V, Guazzetti S. Critical assessment of the diagnostic value of feline alpha1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios approach. *J Vet Diagn Invest* 2007a; 19: 266-72.

Paltrinieri S, Metzger C, Battilani M, Pocacqua V, Gelain ME, Giordano A. Serum alpha1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *J Feline Med Surg* 2007b; 9: 271-7.

Paltrinieri S, Marchini I, Gelain ME. Flow cytometric detection of alpha-1-acid

glycoprotein on feline circulating leucocytes. *Aust Vet J* 2012; 90: 291-6.

Pastoret PP, Henroteaux M. Epigenetic transmission of feline infectious peritonitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1978; 1: 67-70.

Pedersen NC. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1976a; 37: 1449-53.

Pedersen NC. Morphologic and physical characteristics of feline infectious peritonitis virus and its growth in autochthonous peritoneal cell cultures. *Am J Vet Res* 1976b; 37: 567-72.

Pedersen NC, Boyle JF. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1980; 41: 868-76.

Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am J Vet Res* 1981a; 42: 363-7.

Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K, Fudge A, Barker J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1981b; 42: 368-77.

Pedersen NC, Black JW. Attempted immunization of cats against feline infectious peritonitis, using avirulent live virus or sublethal amounts of virulent virus. *Am J Vet Res* 1983; 44: 229-34.

Pedersen NC, Black JW, Boyle JF, Evermann JF, McKeirnan AJ, Ott RL. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv Exp Med Biol* 1984a; 173: 365-80.

Pedersen NC, Evermann JF, McKeirnan AJ, Ott RL. Pathogenicity studies of feline coronavirus isolates 79-1146 and 79-1683. *Am J Vet Res* 1984b; 45: 2580-

5.

Pedersen NC. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv Exp Med Biol* 1987a; 218: 529-50.

Pedersen NC. Coronavirus diseases (coronavirus enteritis, feline infectious peritonitis). In: *Diseases of the Cat, Medicine and Surgery*. Holzworth J, ed. Philadelphia: Saunders 1987b: 193-214.

Pedersen NC. The history and interpretation of feline coronavirus serology. *Feline Pract* 1995; 23: 46-51.

Pedersen NC, Sato R, Foley JE, Poland AM. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 83-8.

Pedersen NC, Allen CE, Lyons LA. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 529-41.

Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 225-58.

Pedersen NC, Liu H, Dodd KA, Pesavento PA. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses* 2009; 1: 166-84.

Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H, Kamal FM. Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res* 2012; 165: 17-28.

Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H, Leutenegger C, Murphy B. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of

lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Vet Microbiol* 2015; 175: 157-66.

Pfeiffer N. Prospects and problems of coronaviral serology. *Proceedings Symposium New Perspectives on Prevention of Feline Infectious Peritonitis, Florida, USA 1991*: 30-4.

Poland AM, Vennema H, Foley JE, Pedersen NC. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3180-4.

Porter E, Tasker S, Day MJ, Harley R, Kipar A, Siddell SG, Helps CR. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Vet Res* 2014; 45: 49-59.

Pratelli A. Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 45-50.

Regan AD, Cohen RD, Whittaker GR. Activation of p38 MAPK by feline infectious peritonitis virus regulates pro-inflammatory cytokine production in primary blood-derived feline mononuclear cells. *Virology* 2009; 384: 135-43.

Riemer F, Kuehner KA, Ritz S, Sauter-Louis C, Hartmann K. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis - a retrospective study of 231 confirmed cases (2000-2010). *J Feline Med Surg* 2016; 18: 348-56.

Ritz S, Egberink H, Hartmann K. Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1193-7.

Rohrer C, Suter PF, Lutz H. Die Diagnostik der feline infektiösen Peritonitis (FIP): retrospektive und prospektive Untersuchungen. *Kleintierpraxis* 1993; 38:

379-89.

Rota A, Paltrinieri S, Jussich S, Ubertalli G, Appino S. Priapism in a castrated cat associated with feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 181-4.

Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol* 2005; 79: 14122-30.

Satoh R, Kaku A, Satomura M, Kohori M, Noura K, Furukawa T, Kotake M, Takano T, Hohdatsu T. Development of monoclonal antibodies (MAbs) to feline interferon (fIFN)-gamma as tools to evaluate cellular immune responses to feline infectious peritonitis virus (FIPV). *J Feline Med Surg* 2011; 13: 427-35.

Schroo S. Kompetitiver ELISA zum Nachweis von löslichen Immunkomplexen in Serum und Exsudaten FIP-verdächtiger Katzen. Diss med vet, Justus-Liebig-Universität Giessen, 1994.

Scott FW. FIP antibody test-interpretation and recommendations. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 175: 1164-8.

Scott FW. Update on FIP. Proceedings of the 12th Annual Kal Kan Symposium for the Treatment of Small Animal Disease, Ohio, USA 1988: 43-7.

Selting KA, Ogilvie GK, Lana SE, Fettman MJ, Mitchener KL, Hansen RA, Richardson KL, Walton JA, Scherk MA. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 503-6.

Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA, Alazawy A. Diagnostic methods for feline coronavirus: a review. *Vet Med Int* 2010: 809480.

Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar A-R, Zeenathul NA, Rahman N-A, Alazawy A. Evaluation of feline coronavirus viraemia in clinically healthy and ill cats with feline infectious peritonitis. *J Anim Vet Adv* 2011; 10: 18-22.

Shiba N, Maeda K, Kato H, Mochizuki M, Iwata H. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Vet Microbiol* 2007; 124: 348-52.

Simons FA, Vennema H, Rofina JE, Pol JM, Horzinek MC, Rottier PJ, Egberink HF. A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Virol Methods* 2005; 124: 111-6.

Sissons JG, Oldstone MB. Antibody-mediated destruction of virus-infected cells. *Adv Immunol* 1980; 29: 209-60.

Soma T, Ishii H. Detection of feline coronavirus antibody, feline immunodeficiency virus antibody, and feline leukemia virus antigen in ascites from cats with effusive feline infectious peritonitis. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 89-90.

Soma T, Wada M, Taharaguchi S, Tajima T. Detection of ascitic feline coronavirus RNA from cats with clinically suspected feline infectious peritonitis. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 1389-92.

Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Feline infectious peritonitis: a review of clinicopathological changes in 65 cases, and a critical assessment of their diagnostic value. *Vet Rec* 1991; 129: 209-12.

Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Howard PE, Harbour DA. Coronavirus serology in healthy pedigree cats. *Vet Rec* 1992; 131: 35-6.

Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. An appraisal of the value of laboratory tests in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Am Anim Hosp*

Assoc 1994; 30: 345-50.

Steinberg TA, Boettcher IC, Matiasek K, Hirschvogel K, Hartmann K, Kunz A, Fischer A. Use of albumin quotient and IgG index to differentiate blood- vs brain-derived proteins in the cerebrospinal fluid of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol* 2008; 37: 207-16.

Stephenson N, Swift P, Moeller RB, Worth SJ, Foley J. Feline infectious peritonitis in a mountain lion (*Puma concolor*), California, USA. *J Wildl Dis* 2013; 49: 408-12.

Stoddart CA, Scott FW. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol* 1989; 63: 436-40.

Stoddart ME, Gaskell RM, Harbour DA, Gaskell CJ. Virus shedding and immune responses in cats inoculated with cell culture-adapted feline infectious peritonitis virus. *Vet Microbiol* 1988a; 16: 145-58.

Stoddart ME, Whicher JT, Harbour DA. Cats inoculated with feline infectious peritonitis virus exhibit a biphasic acute phase plasma protein response. *Vet Rec* 1988b; 123: 622-4.

Stranieri A, Lauzi S, Giordano A, Paltrinieri S. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus. *J Virol Methods* 2017a; 243: 105-8.

Stranieri A, Paltrinieri S, Giordano A. Diagnosing feline infectious peritonitis using the Sysmex XT-2000iV based on frozen supernatants from cavitory effusions. *J Vet Diagn Invest* 2017b; 29: 321-4.

Takano T, Hohdatsu T, Hashida Y, Kaneko Y, Tanabe M, Koyama H. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2007a; 119:

121-31.

Takano T, Hohdatsu T, Toda A, Tanabe M, Koyama H. TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology* 2007b; 364: 64-72.

Takano T, Kawakami C, Yamada S, Satoh R, Hohdatsu T. Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus in feline infectious peritonitis virus infection. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 1315-21.

Takano T, Azuma N, Hashida Y, Satoh R, Hohdatsu T. B-cell activation in cats with feline infectious peritonitis (FIP) by FIP-virus-induced B-cell differentiation/survival factors. *Arch Virol* 2009a; 154: 27-35.

Takano T, Azuma N, Satoh M, Toda A, Hashida Y, Satoh R, Hohdatsu T. Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Arch Virol* 2009b; 154: 775-81.

Takano T, Ohyama T, Kokumoto A, Satoh R, Hohdatsu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP. *Virus Res* 2011a; 158: 161-8.

Takano T, Tomiyama Y, Katoh Y, Nakamura M, Satoh R, Hohdatsu T. Mutation of neutralizing/antibody-dependent enhancing epitope on spike protein and 7b gene of feline infectious peritonitis virus: influences of viral replication in monocytes/macrophages and virulence in cats. *Virus Res* 2011b; 156: 72-80.

Tammer R, Evensen O, Lutz H, Reinacher M. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 49: 177-82.

Tekes G, Hofmann-Lehmann R, Bank-Wolf B, Maier R, Thiel HJ, Thiel V. Chimeric feline coronaviruses that encode type II spike protein on type I genetic background display accelerated viral growth and altered receptor usage. *J Virol* 2010; 84: 1326-33.

Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 753-66.

Torten M, Franchini M, Barlough JE, George JW, Mozes E, Lutz H, Pedersen NC. Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1991; 65: 2225-30.

Tresnan DB, Levis R, Holmes KV. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol* 1996; 70: 8669-74.

Tsai HY, Chueh LL, Lin CN, Su BL. Clinicopathological findings and disease staging of feline infectious peritonitis: 51 cases from 2003 to 2009 in Taiwan. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 74-80.

Van Hamme E, Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Attachment and internalization of feline infectious peritonitis virus in feline blood monocytes and Crandell feline kidney cells. *J Gen Virol* 2007; 88: 2527-32.

Vennema H, de Groot RJ, Harbour DA, Dalderup M, Gruffydd-Jones T, Horzinek MC, Spaan WJ. Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. *J Virol* 1990; 64: 1407-9.

Vennema H, Rossen JW, Wesseling J, Horzinek MC, Rottier PJ. Genomic organization and expression of the 3' end of the canine and feline enteric coronaviruses. *Virology* 1992; 191: 134-40.

Vennema H, Poland A, Hawkins K, Pedersen N. A comparison of the genomes of

FECVs and FIPVs and what they tell us about the relationships between feline coronaviruses and their evolution. *Feline Pract* 1995; 23: 40-4.

Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 1998; 243: 150-7.

Vennema H. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Vet Microbiol* 1999; 69: 139-41.

Vermeulen BL, Devriendt B, Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Desmarests LM, Favoreel HW, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Suppression of NK cells and regulatory T lymphocytes in cats naturally infected with feline infectious peritonitis virus. *Vet Microbiol* 2013; 164: 46-59.

Vogel L, Van der Lubben M, te Lintelo EG, Bekker CP, Geerts T, Schuijff LS, Grinwis GC, Egberink HF, Rottier PJ. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Vet Res* 2010; 41: 71-82.

Wagner N. Vaskulitis-Klassifikation und Immunpathogenese. *Monatsschr Kinderheilkd* 2006; 154: 859-64.

Walter J, Dohse K, Rudolph R. Eine Modifikation der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) für den Nachweis von viralen Antigenen bei der Infektion der Katze durch ein Coronavirus (FIP) und der Infektion des Hundes durch das Parvovirus-Typ 2. *Zentralbl Veterinarmed B* 1989; 36: 321-32.

Wasmoen TL, Kadakia NP, Unfer RC, Fickbohm BL, Cook CP, Chu HJ, Acree WM. Protection of cats from infectious peritonitis by vaccination with a recombinant raccoon poxvirus expressing the nucleocapsid gene of feline infectious peritonitis virus. *Adv Exp Med Biol* 1995; 380: 221-8.

Webb AA, Muir GD. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J Vet*

Intern Med 2000; 14: 399-411.

Weiss RC, Dodds WJ, Scott FW. Disseminated intravascular coagulation in experimentally induced feline infectious peritonitis. Am J Vet Res 1980; 41: 663-71.

Weiss RC, Scott FW. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: nature and development of viremia. Am J Vet Res 1981a; 42: 382-90.

Weiss RC, Scott FW. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: pathologic changes and immunofluorescence. Am J Vet Res 1981b; 42: 2036-48.

Weiss RC, Scott FW. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1981c; 4: 175-89.

Weiss RC. The diagnosis and clinical management of feline infectious peritonitis. Vet Med 1991; 86: 308-19.

Wiggans KT, Vernau W, Lappin MR, Thomasy SM, Maggs DJ. Diagnostic utility of aqueocentesis and aqueous humor analysis in dogs and cats with anterior uveitis. Vet Ophthalmol 2014; 17: 212-20.

Wolfe LG, Griesemer RA. Feline infectious peritonitis: review of gross and histopathologic lesions. J Am Vet Med Assoc 1971; 158: Suppl 2: 987-93.

X. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, die mir die Anfertigung dieser Doktorarbeit an der Medizinischen Kleintierklinik ermöglichte. Vielen herzlichen Dank für die stetige Unterstützung, die unermüdlichen Korrekturen zu jeder Tages- und Nachtzeit und ihren Glauben an mich und unsere Studien. Durch ihre immer neue Inspiration, Motivation und ihren Enthusiasmus hat sie die Entwicklung dieser Arbeit wesentlich vorangetrieben. Ohne ihre Förderung wäre ich heute nicht da, wo ich bin. Danke!

Ganz herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Kaspar Matiasek für seine Betreuung und sehr gute fachliche Unterstützung. Vielen Dank für die zahlreichen Korrekturen, Denkanstöße und hilfreichen Diskussionen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Klee, der mir mit seinen sprachlichen Korrekturen und hilfreichen Kommentaren zu dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Ich bedanke mich besonders auch bei Herrn Dr. Christian Leutenegger, Herrn Dr. Nikola Pantchev und Herrn Dr. Hans-Jörg-Balzer, die eine spannende Zusammenarbeit ermöglichten und die PCR-Untersuchung meiner Proben durchführten. Vielen Dank auch für die fachliche Beratung beim Schreiben des Artikels.

Herzlichen Dank an Karin Stingl vom Institut für Tierpathologie für ihre Hilfestellung in allen Laborangelegenheiten. Sie hatte für alle Sorgen und Probleme immer ein offenes Ohr und stets einen Lösungsvorschlag zur Hand.

Vielen lieben Dank an meine beiden „FIP-Weggefährtinnen“ Stefanie Gründl und

Laura Sangl. Danke für die gemeinsamen Stunden beim Sammeln, Verschicken oder Färben der Proben und für all die hilfreichen Diskussionen über unsere Studien. Ein großes Dankeschön auch an Stephanie Dönges, die mir einiges Probenmaterial aus ihrer Studie zur Verfügung gestellt hat.

Danke an all die lieben Kollegen und Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik und des Instituts für Tierpathologie, die an meine Studie gedacht und mir so beim Sammeln meiner Proben geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt all meinen lieben ehemaligen Kollegen aus dem internistischen Team der Medizinischen Kleintierklinik, die mir sehr gute Freundinnen geworden sind. Vielen Dank für zwei tolle Jahre, in denen ich wahnsinnig viel lernen durfte und ganz wunderbare Menschen kennengelernt habe. Vielen Dank, dass wir so ein gutes Team waren und alle Höhen und Tiefen in und außerhalb der Klinik gemeinsam gemeistert haben. Ich bin mir sicher, dass wir auch in Zukunft weiterhin viel Spaß zusammen haben werden!

Vielen herzlichen Dank meinen Freunden, die auch in arbeitsreichen Phasen immer verständnisvoll waren und es geschafft haben, mich in die Realität zurückzuholen und für Abwechslung abseits von Coronavirus, Klinik und Laptop zu sorgen. Danke, dass Ihr immer da seid.

Zuletzt, aber von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und Hannes. Danke für all eure Liebe und Unterstützung während dieser Doktorarbeit und dafür, dass Ihr alle Hochs und Tiefs mitgemacht und stets an mich geglaubt habt. Danke an meine Mama für einfach Alles und nicht zuletzt für das Korrekturlesen. Danke an meinen Papa, dem ich dies gerne selbst gesagt hätte. Danke Hannes, dafür dass Du alle meine Launen und Erzählungen mit wirren lateinischen Begriffen ertragen hast und vor allem dafür, dass Du immer an meiner Seite bist, egal was kommt.