

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

Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion  
zur Diagnose der feline infektiösen Peritonitis

von Stephanie Janine Dönges

aus Holzkirchen

München 2016

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

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

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

*Meinen Eltern und meinem Großvater*

*In Liebe und Dankbarkeit*

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT: DIAGNOSE DER FELINEN INFEKTIÖSEN PERITONITIS .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Direkter Erregernachweis.....</b>	<b>2</b>
1.1. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	2
1.1.1. Blut .....	2
1.1.1.1. Qualitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	3
1.1.1.2. Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	4
1.1.1.3. Messenger-RNA-Nachweis.....	6
1.1.2. Erguss .....	7
1.1.3. Liquor cerebrospinalis .....	9
1.1.4. Gewebe .....	9
1.1.5. Kot .....	10
1.2. Nachweis von Mutationen der felines Coronaviren .....	12
1.2.1. Mutationen im S-Gen .....	12
1.2.2. Mutationen im akzessorischen 7b-Gen.....	14
1.2.3. Mutationen im akzessorischen 3c-Gen .....	14
1.3. Immunologische Färbungen von intrazellulärem Antigen .....	15
1.3.1. Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	16
1.3.2. Immunfluoreszenz .....	17
1.4. Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen.....	18
<b>2. Indirekter Erregernachweis.....</b>	<b>19</b>
2.1. Antikörpernachweis im Blut.....	20
2.2. Antikörpernachweis im Erguss.....	21
2.3. Antikörpernachweis im Liquor cerebrospinalis.....	22
<b>III. STUDIE I: COMPARISON OF REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS, SERUM, AND BODY CAVITY EFFUSION FOR THE DIAGNOSIS OF FELINE INFECTIOUS PERITONITIS .....</b>	<b>24</b>

---

<b>IV. STUDIE II: DETECTION OF FELINE CORONAVIRUS IN CEREBROSPINAL FLUID FOR DIAGNOSIS OF FELINE INFECTIOUS PERITONITIS IN CATS WITH AND WITHOUT NEUROLOGIC SIGNS.....</b>	<b>48</b>
<b>V. DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>65</b>
<b>VII. SUMMARY.....</b>	<b>66</b>
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>IX. DANKSAGUNG.....</b>	<b>81</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Copy DNA (Komplementäre DNA)
Ct	Threshold cycle
DANN	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCoV	Felines Coronavirus
FECV	Felines enterales Coronavirus
FIP	Feline infektiöse Peritonitis
FIPV	Feline-infektiöse-Peritonitis-Virus
IF	Immunfluoreszenz
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
Ig	Immunglobulin
ICH	Immunhistochemie
IZ	Immunzytochemie
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Messenger-Ribonukleinsäure)
n. a.	nicht angegeben
ORF	Open reading frame (Offenes Leseraster)
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
p. i.	post infectionem
RIM	Rapid immunochromatographic test (Immunochromatographischer Schnelltest)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RT-nPCR	Nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (Nestet Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RT-qPCR	Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
SPF	spezifisch pathogenfrei
TGEV	Transmissibles Gastroenteritis-Virus
UTR	Untranslated region (Untranslatierte Region)
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

---

ZNS	Zentrales Nervensystem
-----	------------------------



## I. EINLEITUNG

Die feline infektiöse Peritonitis (FIP) ist eine weltweit verbreitete, immunmedierte Krankheit der Katze (HOLZWORTH, 1963). Sie wird durch das feline Coronavirus (FCoV), ein Virus mit positiv einzelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA), hervorgerufen (BRIAN & BARIC, 2005). Während der ubiquitär auftretende Biotyp des FCoV, das feline enterale Coronavirus (FECV), höchstens milde enterale Symptome hervorruft (ADDIE et al., 2009), führt der virulente Biotyp, das feline-infektiöse-Peritonitis-Virus (FIPV), zur systemischen, tödlichen Krankheit FIP (PEDERSEN, 1987). Die Biotypkonversion findet durch Mutation in einer infizierten Katze statt und ermöglicht dem Virus eine effiziente Replikation in Makrophagen im gesamten Organismus (VENNEMA et al., 1998; ROTTIER et al., 2005; CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013).

Die Diagnose der FIP stellt immer noch eine Herausforderung dar. Der Goldstandard zur Diagnose ist die histopathologische und immunhistochemische Untersuchung befallener Organe, die eine invasive Probenentnahme voraussetzt (SPARKES et al., 1991; TAMMER et al., 1995; GIORDANO et al., 2005). Eine weniger invasive sichere diagnostische Methode wäre aber gerade bei dieser Krankheit wichtig, da die Diagnose in der Regel zur Euthanasie führt (RITZ et al., 2007; FISCHER et al., 2011). Da auch gesunde Katzen virämisch sein können und die RNA von FCoV auch in Organen gesunder Katzen nachgewiesen wurde (MELI et al., 2004), müssen Methoden des direkten Erregernachweises kritisch validiert werden. Ziel dieser Arbeit war daher die Ermittlung des diagnostischen Nutzens einer real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in verschiedenen Körperflüssigkeiten der Katze. In einer ersten Studie wurde die Sensitivität und Spezifität der real-time RT-PCR in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), in Serum und Erguss untersucht. In einer zweiten Studie wurde die Sensitivität und Spezifität der gleichen real-time RT-PCR im Liquor bei Katzen mit und ohne neurologischen Symptomen untersucht.

## **II. LITERATURÜBERSICHT: DIAGNOSE DER FELINEN INFEKTIOSEN PERITONITIS**

### **1. Direkter Erregernachweis**

Ein direkter Erregernachweis kann zum einen durch den Nachweis von Virus-RNA mittels RT-PCR erfolgen, zum anderen durch das Sichtbarmachen des Virusantigens mittels markierter Antikörper durch immunologische Färbemethoden. Darüber hinaus zählt der Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen zu den direkten Nachweisverfahren (HARTMANN, 2005). Im Vergleich zur Bestimmung von Antikörpern bieten direkte Nachweisverfahren den Vorteil, das Virus selbst zu erkennen anstatt lediglich den vorangegangenen Kontakt des Immunsystems mit FCoV nachzuweisen (HERREWEGH et al., 1995a).

#### **1.1. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die RT-PCR wird seit den neunziger Jahren zur Diagnose von FIP genutzt (LI & SCOTT, 1994). Dabei wird mittels des Enzyms reverse Transkriptase zunächst ein DNA-Template, die sogenannte copy DNA (cDNA), aus aufgereinigter Virus-RNA synthetisiert und als Ausgangsmaterial für die RT-PCR verwendet. Danach wird diese DNA mit Hilfe von spezifischen Primern, einer thermostabilen DNA-Polymerase, Nukleotiden und Puffern exponentiell vervielfältigt. Die Amplifikationsprodukte können mittels Gelelektrophorese im Agarosegel nach Größe aufgetrennt und identifiziert werden (TEMPLETON, 1992).

##### **1.1.1. Blut**

Häufig wird die RT-PCR zum Nachweis von FCoV in Blut durchgeführt. Eine oft verwendete Variante stellt die nested RT-PCR (RT-nPCR) dar. Außerdem kann die FCoV-Menge durch eine quantitative RT-PCR (RT-qPCR) bestimmt werden. Die RT-qPCR wird am häufigsten als real-time RT-PCR durchgeführt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, lediglich die Messenger-RNA (mRNA) und somit nur das sich replizierende Virus nachzuweisen (GAMBLE et al., 1997; MACKAY et al., 2002; SIMONS et al., 2005).

### 1.1.1.1. Qualitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Viele Studien, die FCoV qualitativ nachwiesen, nutzten eine RT-nPCR, eine Methode, die auch geringe RNA-Mengen nachweisen kann (GAMBLE et al., 1997). Hierbei werden nacheinander zwei RT-PCRs mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt, wobei die Nukleotidsequenz des zweiten Primerpaares innerhalb der Sequenz des ersten liegt. Somit wird nach der reversen Transkription von RNA zu cDNA zunächst ein längeres DNA-Segment amplifiziert, welches als Matrize für das zweite kürzere Segment dient. Dadurch werden einerseits Artefakte oder unspezifische Amplifikationsprodukte der ersten RT-PCR hinweg selektiert. Andererseits verbessert sich die Effizienz der zweiten PCR, da das verhältnismäßig kurze Segment der ersten Amplifikation im Vergleich zum vollständigen Genom schneller und vollständiger denaturiert werden kann. Die RT-nPCR gilt somit als sensitiver und spezifischer als die konventionelle RT-PCR (PORTER-JORDAN et al., 1990; HERREWEGH et al., 1995a; FEHR et al., 1996).

Schon in den neunziger Jahren stellte sich heraus, dass in der RT-PCR weder alle an FIP erkrankten Katzen positiv, noch alle nicht an FIP erkrankten Katzen negativ sind (Tabelle 1) (HERREWEGH et al., 1995a). So hatten von 18 Katzen mit in der Sektion nachgewiesener FIP nur zehn ein positives Ergebnis in Serum und/oder Plasma (Sensitivität: 56 %). Außerdem war eine von acht Katzen mit in der Sektion nachgewiesenen anderen Krankheiten im Serum mittels RT-PCR positiv (Spezifität: 88 %). Zusätzlich wurden in derselben Studie sieben gesunde Katzen einer Katzensucht untersucht, wobei bei zwei Katzen FCoV-RNA im Plasma gefunden wurde. Diese Studie arbeitete mit einer RT-nPCR, die sich auf die hochkonservierte 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) des FCoV-Genoms richtete, wodurch viele FCoV-Stämme erkannt wurden. Eine später veröffentlichte Studie nutzte die gleichen Nukleotidsequenzen zur Amplifikation und wies bei insgesamt 42 gesunden Katzen aus Katzensuchten im Plasma 16 Mal FCoV nach (Spezifität: 62 %) (HERREWEGH et al., 1997). Mit der gleichen RT-nPCR wiesen Egberink und Mitarbeiter (1995) bei 30 von 42 Katzen, die in der Sektion FIP-typische Läsionen aufwiesen, FCoV-RNA im Plasma nach (Sensitivität: 71 %). Zwei von 113 gesunden Katzen aus Katzensuchten, in denen FIP aufgetreten war, waren ebenfalls im Plasma FCoV-positiv. Darüber hinaus wurde bei drei von 28 Katzen, bei welchen histopathologisch eine andere

Krankheit diagnostiziert wurde, FCoV-RNA nachgewiesen (Spezifität: 89 %) (EGBERINK et al., 1995). Fehr und Mitarbeiter (1996) legten in einer Studie dar, dass auch Katzen mit Symptomen, wie einem umfangsvermehrten oder dolenten Abdomen, Meteorismus oder Durchfall, positiv in der RT-PCR sein können, aber für FIP untypisch lange überlebten. In dieser Studie lebten fünf von 13 FCoV-positiven Katzen noch 35 Monate oder länger nach Blutentnahme. Die übrigen acht Katzen verstarben früher; es wurde allerdings keine Sektion durchgeführt (FEHR et al., 1996). Gunn-Moore und Mitarbeiter (1998) verwendeten, teilweise nach Kokultivierung von FCoV in Embryozellen, eine RT-PCR, die einen Teil des C-Terminus des S-Gens nachwies. 30 von 33 Katzen, die an FIP erkrankt waren, waren FCoV-positiv in Vollblut, Serum oder Plasma (Sensitivität: 91 %). Aber auch bei 49 von 55 gesunden Katzen aus FCoV-endemischen Haushalten konnte FCoV nachgewiesen werden (Spezifität: 11 %) (GUNN-MOORE et al., 1998). Insgesamt schien Plasma für den Nachweis von FCoV sensitiver zu sein als Serum (HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998). Kennedy und Mitarbeiter (1998) nutzten eine RT-nPCR, die auf die offenen Leseraster 7a und 7b gerichtet war, da vermutet wurde, dass Deletionen im 7b-Gen mit dem Verlust der Virulenz des Virus einhergehen (HERREWEGH et al., 1995b; KENNEDY et al., 1998). Durch diese RT-nPCR wurden lediglich drei von sechs Katzen, von welchen Serum und/oder Plasma und/oder Vollblut untersucht wurde, mit histopathologisch nachgewiesener FIP richtig diagnostiziert (Sensitivität: 50 %). Die Blutproben aller fünf Katzen, bei denen histopathologisch keine FIP nachgewiesen wurde, waren negativ in der RT-PCR (Spezifität: 100 %) (KENNEDY et al., 1998). Eine spätere Diagnostikstudie, die für die RT-nPCR die 3'-UTR nutzte (HERREWEGH et al., 1995a), ermittelte bei 17 Katzen mit histopathologisch nachgewiesener FIP und acht Katzen mit einer anderen nachgewiesenen Krankheit im Serum eine Sensitivität von 53 % und eine Spezifität von 88 % (HARTMANN et al., 2003).

#### **1.1.1.2. Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

FCoV kann auch mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR) nachgewiesen werden. Dies gelingt z. B. mit einem externen Standard, wie den Haushaltsgenen  $\beta$ -Aktin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Mittels real-time RT-PCR lassen sich die Amplifikate in Echtzeit durch Fluoreszenzmessung quantifizieren. Darüber hinaus werden durch die real-time RT-PCR, die in einem einzigen

Reaktionsgefäß durchgeführt wird (one-tube real-time RT-PCR), Kontaminationen der Proben im Labor und somit falsch positive Ergebnisse vermieden (MACKAY et al., 2002; BASTIEN et al., 2008).

Meli und Mitarbeiter (2004) verwendeten eine one-tube real-time RT-PCR, die ein 102 Basenpaar-großes Segment des konservierten 7b-Gens amplifizierte (GUT et al., 1999), zum Nachweis von FCoV in Plasma, Vollblut und Monozyten bei 23 FCoV-infizierten Katzen (MELI et al., 2004). 15 Katzen waren experimentell mit verschiedenen Virusstämmen infiziert, acht Katzen hatten sich natürlich in einem FCoV-endemischen Katzenhaushalt infiziert. Nach Infektion konnte bei sieben von 15 experimentell infizierten Katzen und bei acht von acht natürlich infizierten Katzen FCoV im Blut nachgewiesen werden. Histopathologisch gab es bei keiner der Katzen FIP-typische Veränderungen (Spezifität: 35 %) (MELI et al., 2004). Kipar und Mitarbeiter (2010) wiesen mit der gleichen one-tube real-time RT-PCR bei 20 von 30 experimentell infizierten Katzen ab einer Woche post infectionem (p. i.) bis zur Euthanasie (Tag 14, 17, 28, 48, oder 80 p. i.) einmal oder mehrmals FCoV in Vollblut, Plasma oder Monozyten nach. Histopathologisch gab es auch hier bei keiner Katze Hinweise auf FIP (Spezifität: 33 %) (KIPAR et al., 2010). Vogel und Mitarbeiter (2010) wiederum konnten bei 22 experimentell infizierten Katzen meist kein Virus im Vollblut nachweisen, und wenn doch, waren die jeweiligen Katzen nur in einigen wenigen der aufeinanderfolgenden Untersuchungen positiv (VOGEL et al., 2010).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der 20 Katzen mit virulentem FCoV infiziert wurden, wurde weder in Vollblut, noch in Plasma, noch in Leukozyten virale RNA nachgewiesen. Bis auf eine Katze entwickelten in dieser Studie alle Katzen FIP (Sensitivität: 0 %). Die Autoren klassifizierten allerdings in ihrer Studie nur Proben mit einem Threshold Cycle (Ct) Wert  $\leq 37$  als positiv, da sie zuvor im Blut von Katzen, die vorher nie Kontakt mit FCoV hatten, Ct-Werte von 37 bis 40 gemessen hatten (PEDERSEN et al., 2015). In einer Studie von de Groot-Mijnes und Mitarbeitern (2005) entwickelte der überwiegende Teil (25 von 33) der experimentell FIPV-infizierten Katzen FIP (DE GROOT-MIJNES et al., 2005). Dort wurde virale RNA im Plasma und/oder in den Leukozyten aller Katzen, die an FIP starben (n = 25) nachgewiesen (Sensitivität: 100 %). Die Virusmenge sank zeitweise in Verbindung mit einer kurzfristigen Verbesserung klinischer Symptome (7. bis 8. Tag p. i.) unter die Nachweisgrenze und stieg v. a.

im Endstadium der Krankheit wieder an (DE GROOT-MIJNES et al., 2005).

### 1.1.1.3. Messenger-RNA-Nachweis

Die Fähigkeit des FCoV, effektiv in Makrophagen zu replizieren, gilt als das Schlüsselereignis in der Pathogenese der FIP und unterscheidet virulente und avirulente FCoV (HORNYAK et al., 2012; KIPAR & MELI, 2014). Ein Versuch, die Spezifität der RT-PCR zu erhöhen, gelang 2005 (SIMONS et al., 2005). Bei dieser RT-PCR wurde nur Messenger-RNA (mRNA) des M-Gens in Blutzellen amplifiziert. Mit dem Nachweis der mRNA wurde damit lediglich Virus nachgewiesen, das sich aktiv replizierte. Bei 81 Katzen mit pathologisch nachgewiesener FIP und 17 Katzen mit einer anderen nachgewiesenen Krankheit erwies sich diese RT-PCR mit einer Sensitivität von 93 % und einer Spezifität von 100 % verlässlich für die Diagnose von FIP. Allerdings waren auch 23 von 424 gesunden Katzen in der gleichen RT-PCR positiv (SIMONS et al., 2005). Der gleiche Ansatz wurde zwei Jahre später mit 25 gesunden und einer FIP-verdächtigen Katze wiederholt und war auch in der Folgestudie bei 13 der Proben der gesunden Katzen positiv (Spezifität: 48 %) (CAN-SAHNA et al., 2007).

Eine neuere Studie kombinierte diesen Ansatz mit einer real-time RT-PCR und wies FCoV-mRNA in Leukozyten bei fünf von 44 FIP-verdächtigen Katzen nach. Alle fünf Katzen starben an FIP (Sensitivität: 100 %) (HORNYAK et al., 2012).

**Tabelle 1: Sensitivität und Spezifität einzelner Studien zum Nachweis von feline Coronavirus im Blut, Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), nested Reverse-Transkriptase-PCR (RT-nPCR), Messenger-RNA (mRNA), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

Studie	Anzahl Katzen mit FIP	Anzahl Katzen Kontrolle	Art der RT-PCR	Probenart	Sensitivität	Spezifität
Egberink et al., 1995	42	28	RT-nPCR	Plasma	72 %	89 %
Herrewegh et al., 1995a	18	8	RT-nPCR	Serum/ Plasma	56 %	88 %
Herrewegh et al., 1997	0	42	RT-nPCR	Plasma	n. a.	62 %
Gunn-Moore et al., 1998	33	55	RT-PCR	Vollblut/ Serum/ Plasma/ Buffy coat	91 %	11 %
Kennedy et al., 1998	6	5	RT-nPCR	Vollblut/ Serum/ Plasma	50 %	100 %

Studie	Anzahl Katzen mit FIP	Anzahl Katzen Kontrolle	Art der RT-PCR	Probenart	Sensitivität	Spezifität
Hartmann et al., 2003	17	8	RT-nPCR	Serum	53 %	88 %
Meli et al., 2004	0	23	real-time RT-PCR	Vollblut/ Plasma/ Monozyten	n. a.	35 %
De Groot-Mijnes et al., 2005	25	0	real-time RT-PCR	Plasma/ Leukozyten	100 %	n. a.
Simons et al., 2005	81	17	mRNA RT-PCR	PBMC	95 %	100 %
Can-Sahna et al., 2007	0	25	mRNA RT-PCR	Leukozyten	n. a.	48 %
Kipar et al., 2010	0	30	real-time RT-PCR	Vollblut/ Plasma/ Monozyten	n. a.	33 %
Hornyak et al., 2012	5*	0	mRNA real-time RT-PCR	Leukozyten	100 %	n. a.
Pedersen et al., 2015	19	0	real-time RT-PCR	Vollblut/ Plasma/ Leukozyten	0 %	n. a.

\* Nicht bei allen Katzen FIP sicher nachgewiesen

### 1.1.2. Erguss

Der Nachweis von FCoV mittels RT-nPCR in Thoraxerguss oder Ascites zur Diagnose von FIP erwies sich sensitiver und spezifischer als in Blut; allerdings war die Anzahl der untersuchten Proben in den bisherigen Studien oft sehr gering (HERREWEGH et al., 1995a; HARTMANN et al., 2003). In einer Studie von Egberink und Mitarbeitern (1995) konnte mittels RT-nPCR, die spezifische Primer für die 3'-UTR nutzte, bei fünf von 42 Katzen mit in der Sektion nachgewiesener FIP im Ascites FCoV nachgewiesen werden, während FCoV im Plasma dieser fünf Katzen nicht gefunden wurde. Leider gab es keine Angaben dazu, ob es falsch positive Ergebnisse im Ascites der Katzen ohne FIP gab. Zwar waren drei von 28 Katzen mit in der Sektion nachgewiesenen anderen Erkrankungen in der RT-nPCR positiv; es wurde aber nicht angegeben, ob diese positiven Ergebnisse im Plasma oder im Ascites erzielt wurden (EGBERINK et al., 1995). Herrewegh und Mitarbeiter (1995a) wiesen bei fünf von fünf Katzen mit diagnostizierter FIP FCoV im Ascites nach (Sensitivität: 100 %). Eine Katze mit einer anderen Krankheit war im Ascites negativ (Spezifität: 100 %) (HERREWEGH et al., 1995a). Eine Studie von Gamble und Mitarbeitern (1997)

wies bei elf von zwölf Katzen mit nachgewiesener FIP FCoV-RNA im Erguss nach (Sensitivität: 92 %), bei einer von elf Katzen mit anderen Krankheiten wurde ebenfalls FCoV im Erguss gefunden (Spezifität: 91 %) (GAMBLE et al., 1997). In einer Studie von Hartmann und Mitarbeitern (2003) wurde der Erguss von fünf Katzen mit FIP und einer Katze mit malignem Lymphom untersucht. Alle fünf Katzen mit FIP waren positiv, die Katze mit Tumorerkrankung negativ für FCoV (Sensitivität: 100 %, Spezifität: 100 %) (HARTMANN et al., 2003). In einer Studie von Tsai und Mitarbeitern (2011) konnte FCoV bei 26 von 27 Ergüssen von Katzen mit histopathologisch nachgewiesener FIP gefunden werden (Sensitivität: 96 %) (TSAI et al., 2011). Sharif und Mitarbeiter (2010) wiesen anhand von Gewebe- und/oder Ergussproben bei 25 von 28 Katzen mit FIP-Verdacht FCoV nach; allerdings liegen keine Angaben zur Diagnose der Katzen vor. In einer späteren Studie war die RT-PCR bei 377 der abdominalen Ergüsse von insgesamt 854 Katzen mit Verdacht auf FIP positiv (Sensitivität: 44 %). Da die beiden letztgenannten Studien allerdings keine definitiv diagnostizierte Population untersuchten, müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden (SHARIF et al., 2010; SOMA et al., 2013).

Auch mittels RT-qPCR kann FCoV im Erguss nachgewiesen werden. Hornyak und Mitarbeiter (2012) erkannten mit einer real-time RT-PCR, die subgenomische mRNA nachwies, bei vier von fünf Katzen FCoV im Ascites (Sensitivität: 80 %) (HORNYAK et al., 2012). Die Diagnose FIP wurde mittels pathologischer, histopathologischer und immunhistochemischer Untersuchung sowie konventioneller RT-PCR (KISS et al., 2000) gestellt (HORNYAK et al., 2012). In einer Studie, die den Zusammenhang zwischen Antikörpernachweis und Virusmenge in Blut und Erguss untersuchte, waren neun von 13 Ergussproben von Katzen mit FIP in der real-time RT-PCR positiv (Sensitivität: 69 %), allerdings wurde auch hier nur bei fünf Katzen FIP histopathologisch nachgewiesen, die Diagnose der verbleibenden Katzen wurde aufgrund klinischer Parameter gestellt (MELI et al., 2013). Hohe Virusmengen wurden auch im Ascites von Katzen, die experimentell mit virulentem FCoV infiziert wurden, nachgewiesen. Bei diesen Katzen konnte aber kein Virus im Vollblut, Plasma oder in Leukozyten gefunden werden (PEDERSEN et al., 2015). Die Virusmenge in zellhaltigen Ergussproben war 10- bis 100-fach höher als im Überstand (PEDERSEN et al., 2015).



**Tabelle 2: Sensitivität und Spezifität einzelner Studien zum Nachweis von feline Coronavirus im Erguss, Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), nested Reverse-Transkriptase-PCR (RT-nPCR), Messenger-RNA (mRNA)**

Studie	Anzahl Katzen FIP	Anzahl Katzen Kontrolle	Art der RT-PCR	Sensitivität	Spezifität
Herrewegh et al., 1995a	5	1	RT-nPCR	100 %	100 %
Gamble et al., 1997	12	11	RT-nPCR	92 %	91 %
Hartmann et al., 2003	5	1	RT-nPCR	100 %	100 %
Tsai et al., 2011	27	0	RT-nPCR	96 %	n. a.
Hornyak et al., 2012	5*	0	mRNA real-time RT-PCR	80 %	n. a.
Meli et al., 2013	13*	0	real-time RT-PCR	69 %	n. a.

\* Nicht bei allen Katzen FIP sicher nachgewiesen

### 1.1.3. Liquor cerebrospinalis

Der Nachweis von FCoV im Liquor cerebrospinalis durch RT-PCR wurde bisher wenig untersucht. Die bisher einzige Studie wies mittels RT-PCR, die die 5'-Region des 7b-Gens amplifizierte, bei fünf von 16 Katzen mit neurologischer FIP Virus-RNA im Liquor nach (Sensitivität: 31 %) (FOLEY et al., 1998). In zwei der fünf positiven Proben war die Zellzahl im Liquor erhöht. Die Autoren erklärten die niedrige Sensitivität von 31 % mit der insgesamt geringen Zellzahl im Liquor. Bei drei Katzen mit neurologischen Symptomen, die durch andere Krankheiten als FIP verursacht wurden, konnte kein Virus in der RT-PCR nachgewiesen werden. Somit gab es kein falsch positives Ergebnis (Spezifität: 100 %). Allerdings war die Patientenzahl mit drei Katzen sehr gering (FOLEY et al., 1998).

### 1.1.4. Gewebe

Der Nachweis von FCoV in verschiedenen Organen kann sowohl in frischem als auch in fixiertem Gewebe durchgeführt werden, wobei der RNA-Gehalt in frischem Gewebe höher ist als in fixiertem Gewebe (LI & SCOTT, 1994; HERREWEGH et al., 1995a). So kann fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe im Vergleich zu frischem Gewebe fälschlicherweise negative Ergebnisse liefern (BENETKA et al., 2004). Die Wahrscheinlichkeit, FCoV zu erkennen, variiert in den verschiedenen Organen (LI & SCOTT, 1994; HORNYAK et al., 2012; PEDERSEN et al., 2015). Während Li und Scott (1994) in Leber (48,6 %) und Milz (42,3 %) eher FCoV nachweisen konnten als in der Niere (21,1 %) (LI

& SCOTT, 1994), fanden Hornyak und Mitarbeiter (2012) mit einer real-time RT-PCR hohe Mengen an FCoV-mRNA in den stärker vaskularisierten Organen, wie Mesenteriallymphknoten, Milz, Lunge und Leber (HORNYAK et al., 2012). Dean und Mitarbeiter (2003) fanden in 75 % der untersuchten Gewebe von insgesamt zwölf Katzen mit FIP FCoV-RNA in den zentralen Lymphgeweben, wie Mesenterial- und Mediastinallymphknoten, Milz und Thymus. In den peripheren Lymphgeweben, wie Popliteallymphknoten, Zervikallymphknoten und Knochenmark waren nur 27 % der Proben FCoV-positiv (DEAN et al., 2003). In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Pedersen und Mitarbeitern (2015) wurden hohe Virusmengen in Netz, Mesenteriallymphknoten und Milz gefunden, und es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Virusmenge und pathologischen und histopathologischen Veränderungen der Organe. So wurde in nicht veränderten Organen kein oder wenig Virus nachgewiesen. Die veränderten Organe enthielten in der Regel hohe RNA-Mengen (PEDERSEN et al., 2015).

Während in den beiden zuletzt genannten Studien FCoV nur in Geweben von Katzen mit nachgewiesener FIP und nicht bei gesunden Katzen gefunden wurde, konnte FCoV in anderen Studien auch in Geweben, wie Mesenteriallymphknoten, Milz, Leber und Knochenmark, von experimentell mit FCoV infizierten Katzen, die nicht an FIP erkrankt waren, nachgewiesen werden (MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010). Jedoch waren die Virusmengen bei Katzen mit FIP signifikant höher als bei nicht erkrankten Katzen (KIPAR et al., 2006).

#### **1.1.5. Kot**

FCoV ist das häufigste Enteropathogen bei gesunden Katzen und Katzen mit Durchfall. Eine Infektion ist in der Regel asymptomatisch oder führt für eine kurze Zeit zu milden intestinalen Symptomen (PEDERSEN et al., 2008; SABSHIN et al., 2012). Nach Infektion mit FCoV scheiden Katzen meist Wochen bis Monate hohe Virusmengen aus, die mittels RT-PCR nachgewiesen werden (HERREWEGH et al., 1997; MELI et al., 2004; PEDERSEN et al., 2008; KIPAR et al., 2010). Die Ausscheidung ist oft transient, ein gewisser Prozentsatz der Katzen scheiden aber auch persistierend oder intermittierend FCoV aus, v. a. dann, wenn sie sich mit dem gleichen oder verschiedenen Virusstämmen reinfizieren (ADDIE & JARRETT, 2001; ADDIE et al., 2003). Dabei persistiert FCoV vorwiegend im Kolon (HERREWEGH et al., 1997; VOGEL et al., 2010). Fast alle gesunden Katzen in Mehrkatzenhaushalten infizieren sich zwischen der

fünftens und sechstens Lebenswoche oder auch früher mit FCoV (ADDIE et al., 2009). Nur etwa 5 – 10 % der infizierten Katzen in einem Mehrkatzenhaushalt erkranken an FIP (ADDIE & JARRETT, 1992; HARTMANN et al., 2003). Somit ist der Nachweis von FCoV im Kot nicht für die Diagnose von FIP geeignet (PEDERSEN, 2014b).

Lediglich die Höhe des Anteils der Katzen aus einer Virus-ausscheidenden Population und die ausgeschiedene Virusmenge korrelieren positiv mit dem Ausbruch von FIP in der jeweiligen Population. Somit bricht FIP umso häufiger aus, je mehr Katzen infiziert sind und je höher die ausgeschiedene Virusmenge ist (FOLEY et al., 1997). Der Nachweis von FCoV mittels RT-PCR im Kot ist daher für die Identifizierung von FCoV-Ausscheidern und damit für die Elimination von FCoV aus Katzensuchten relevant. Die praktische Umsetzung von Eliminationsprogrammen ist jedoch vor allem in großen Katzensuchten schwierig und der Nutzen aufgrund des ubiquitären Vorkommens von FCoV fraglich (PEDERSEN, 2014b). Anders als in Mehrkatzenhaushalten scheiden in Haushalten mit einer niedrigeren Anzahl von Katzen prozentual weniger Katzen FCoV aus. Eine Studie von Kiss und Mitarbeitern (2000) untersuchte mittels RT-nPCR 113 gesunde Katzen, von welchen 88 aus Einzelkatzenhaushalten stammten. 60 % der Katzen waren Freigänger, 40 % wurden im Haus gehalten. In dieser Studie waren 36 von 113 Proben positiv (KISS et al., 2000).

Die Ausscheidungsmenge kann durch real-time RT-PCR quantifiziert werden (GUT et al., 1999; DYE et al., 2008). Allerdings können Fäkalinhibitoren, die mit der reversen Transkriptase und der DNA-Polymerase interferieren, die Messung der Virusmenge stark beeinflussen (DYE et al., 2008).

Katzen, die an FIP erkrankt sind, scheiden zwar häufig Virus aus, die ausgeschiedene Virusmenge ist aber niedriger als bei gesunden FCoV-infizierten Katzen (PEDERSEN, 2014b). Hornyak und Mitarbeiter (2012) konnten mit einer real-time RT-PCR, die mRNA nachwies, wesentlich mehr Virus im Erguss und in Organen von an FIP erkrankten Katzen als im Kot gesunder Katzen finden. So wurden im Kot bis zu  $5 \times 10^2$  mRNA-Kopien je 100 µl Kotprobe, in den Organen hingegen bis zu  $6 \times 10^5$  mRNA-Kopien je 100 µl Gewebeprobe gefunden (HORNYAK et al., 2012). Auch Lewis und Mitarbeiter (2015) wiesen bei drei Kotproben gesunder Katzen höhere Ct-Werte (20,9; 16,9; 29,0) als bei drei Organproben von Katzen mit FIP (14,0; 21,5; 15,0) und damit eine geringere

Virusmenge im Kot nach (LEWIS et al., 2015). Dies kann entweder durch die Immunantwort gesunder Katzen erklärt werden, die die Replikation des Virus niedrig hält, oder durch die geringe Nachweissensitivität von FCoV im Kot aufgrund von Fäkalinhibitoren (DYE et al., 2008; HORNYAK et al., 2012).

## **1.2. Nachweis von Mutationen der feline Coronaviren**

Durch Mutationen wird der Zelltropismus von FCoV von Enterozyten zu Monozyten und Makrophagen geändert, und das Virus erlangt die Fähigkeit sich in Makrophagen zu replizieren (VENNEMA et al., 1998; ROTTIER et al., 2005; PEDERSEN et al., 2009). Um zwischen virulentem und avirulentem FCoV unterscheiden zu können, versuchte man, die Mutationen nachzuweisen, die die beiden Biotypen unterscheiden. In der Literatur werden, gerade in den letzten Jahren, verschiedene Mutationen in verschiedenen Segmenten des Genoms von FCoV als verantwortlich für die Entstehung von FIP diskutiert. Während Mutationen im N- und im M-Gen keine Biotypkonversion zugeordnet werden konnte (BATTILANI et al., 2010; CHANG et al., 2011; BANK-WOLF et al., 2014), werden vor allem drei Gene diskutiert, die virulentes von avirulentem FCoV unterscheiden können.

### **1.2.1. Mutationen im S-Gen**

Den bisher entscheidendsten Unterschied im Genom von FCoV von Katzen mit und ohne FIP stellten Chang und Mitarbeiter (2012) fest. Die Autoren sequenzierten zunächst das vollständige Genom von elf FCoV aus Erguss oder Organen von Katzen mit FIP und von elf FCoV aus Kot von gesunden Katzen. Anschließend wurde eine RT-nPCR durchgeführt, die im ersten Schritt den Bereich mit den Nukleotiden 23442 – 24040 und im zweiten Schritt die Nukleotide 23451 – 23593 des S-Gens amplifizierte. Bei der Amplifikation und anschließenden Sequenzierung aus 183 Kotproben von gesunden Katzen und 118 Erguss- oder Gewebeproben veränderter Organe von Katzen mit in der Sektion nachgewiesener FIP konnten an den Positionen 23531 und 23537 im S-Gen Punktmutationen gefunden werden, die jeweils einen Aminosäureaustausch im putativen Fusionspeptid des Spike-Proteins zur Folge hatten. Bei 108 von 118 FCoV (92 %) lag eine Punktmutation an Position 23531 des S-Gens vor, welche einen Tausch von Methionin zu Leucin an Position 1058 des S-Proteins bewirkte. Bei fünf von 118 FCoV (4 %) führte eine Mutation an Position 23537

des S-Gens einen Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin an Position 1060 des S-Proteins. Diese beiden Mutationen korrelierten in > 95 % der Fälle mit dem Phänotyp FIP (CHANG et al., 2012). Da das Fusionspeptid des S-Proteins maßgeblich am Eintritt in die Wirtszelle beteiligt ist (BOSCH et al., 2003), erklärt ein Aminosäureaustausch in gerade diesem Protein die Biotypkonversion. Allerdings hielten die Autoren die alleinige Verantwortlichkeit dieser Mutationen für das Entstehen von FIP aufgrund der hohen Mutationsrate der RNA-Viren und des auf der anderen Seite spärlichen Auftretens von FIP für fraglich (CHANG et al., 2012), sodass postuliert wird, dass potentiell eine zweite Mutation für die Entstehung von FIP nötig sei. Der Aminosäureaustausch von Methionin zu Leucin an Position 1058 des S-Proteins wurde zwei Jahre später von Bank-Wolf und Mitarbeitern (2014) bestätigt. In dieser Studie fand sich bei neun von zehn FCoV von gesunden Katzen Methionin an Position 1058, wobei bei zwölf von 13 FCoV von Katzen mit FIP ein Aminosäureaustausch von Methionin zu Leucin stattgefunden hatte (BANK-WOLF et al., 2014).

Eine andere Studie fand allerdings die Mutation an Position 23531 im S-Gen und den Tausch von Methionin zu Leucin an Position 1058 des S-Proteins in 89 % der Gewebeproben von Katzen mit histopathologisch nachgewiesenen anderen Krankheiten als FIP (PORTER et al., 2014). Die Autoren postulierten, dass die Mutation mehr ein Indiz für die systemische Verbreitung des Virus außerhalb des Intestinaltrakts und nicht beweisend für FIP sei (PORTER et al., 2014). Die Relevanz dieser Mutationen für die Entstehung von FIP ist daher bislang nicht sicher geklärt (PEDERSEN, 2014a). In kommerziellen Labors wird aber die RT-PCR mit Primern von Chang und Mitarbeitern (2012) oder eine Sequenzierung im Bereich der Mutationen nach erfolgter RT-nPCR angeboten (CHANG et al., 2012).

Eine weitere Studie, die gezielt eine Furinspaltstelle in der Region zwischen Rezeptorbindestelle (S1) und Fusionsbereich (S2) des S-Proteins untersuchte, fand bei allen FCoV aus Organproben von Katzen mit FIP zumindest eine Punktmutation im S-Gen in der Nähe der S1/S2-Spaltstelle (LICITRA et al., 2013). Im Gegensatz dazu war die Sequenz bei FCoV aus Kotproben von gesunden Katzen konserviert. Die Mutationen waren je nach Virusstamm unterschiedlich und beeinflussten die Effizienz der Spaltung des S-Proteins durch Furin. Dies ist Voraussetzung für die Fusion mit der Wirtszelle. Je nach Anzahl

der Mutationen und damit bedingten Aminosäureänderungen wurde die Spaltungseffizienz positiv, negativ oder gar nicht beeinflusst. Allerdings hatten nur zwei Drittel der Katzen mit FIP Mutationen an der S1/S2-Spaltstelle (LICITRA et al., 2013).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie, die das komplette Genom von drei FCoV aus Kot gesunder Katzen und drei FCoV aus Organen von Katzen mit FIP sequenzierte, fand neben verschiedenen anderen Mutationen in allen Gewebeproben von an FIP erkrankten Katzen zwei Mutationen in der S2-Region des S-Gen, die zum Aminosäureaustausch im S-Protein führten (LEWIS et al., 2015). Eine dieser beiden Mutationen verursachte die Methionin-zu-Leucin-Substitution, die bereits Chang und Mitarbeiter (2012) beschrieben hatten (CHANG et al., 2012).

### **1.2.2. Mutationen im akzessorischen 7b-Gen**

Lange Zeit wurde vermutet, dass ein intaktes akzessorisches 7b-Gen für die Replikationsfähigkeit von FCoV in Makrophagen notwendig sei, sodass Mutationen, die größere oder kleinere Bereiche des 7b-Gen betreffen, mit dem Verlust der Virulenz einhergehen (HERREWEGH et al., 1995b; VENNEMA et al., 1998; TAKANO et al., 2011; PEDERSEN, 2014a). Es konnte aber in einer Studie mit 20 gesunden, FCoV infizierten Katzen und 20 an FIP erkrankten Katzen gezeigt werden, dass nicht nur gesunde Katzen, sondern auch Katzen mit FIP Mutationen im 7b-Gen aufweisen (LIN et al., 2009). In dieser Studie wurden Deletionen von drei bis zwölf Nukleotiden im 7b-Gen bei drei Katzen mit FIP und fünf gesunden Katzen gefunden (LIN et al., 2009). Die Replikationsfähigkeit von intaktem FCoV und FCoV mit Deletionen im 7b-Gen wurde in Monozyten-Zellkulturen untersucht (DEDEURWAERDER et al., 2013). Alle Viren mit Deletionen im 7b-Gen konnten nicht mehr effektiv in Monozyten replizieren (DEDEURWAERDER et al., 2013). Auch wenn das intakte 7b-Gen essentiell für die effektive Vermehrung in Monozyten zu sein scheint, so sind Mutationen im Gen nicht für die Unterscheidung zwischen virulentem und avirulentem FCoV geeignet. Denn auch das 7b-Gen von Feldstämmen nicht virulenter FCoV ist meist intakt (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010).

### **1.2.3. Mutationen im akzessorischen 3c-Gen**

Mutationen können sich bei Katzen mit FIP auch im 3c-Gen, das für das

akzessorische 3c-Protein kodiert, finden (VENNEMA et al., 1998; PEDERSEN et al., 2012). Diese Mutationen kommen bei mindestens zwei Drittel der FCoV von Katzen mit FIP und selten bei FCoV gesunder Katzen vor (CHANG et al., 2010; HSIEH et al., 2013; BANK-WOLF et al., 2014). Es handelt sich hierbei vorwiegend um Deletionen oder Punktmutationen im Gen, die zu einem verkürzten Protein führen (PEDERSEN et al., 2009; HSIEH et al., 2013; BANK-WOLF et al., 2014). Auch wenn die tatsächliche Funktion des 3c-Proteins nicht bekannt ist, scheint ein intaktes 3c-Protein ausschlaggebend für die Vermehrung von FCoV im Intestinaltrakt zu sein (CHANG et al., 2010; LE PODER, 2011; PEDERSEN et al., 2012). Denn während FCoV mit intaktem 3c-Gen nach oronasaler Infektion mit dem Kot ausgeschieden wurden, wurde kein FCoV mit mutiertem 3c-Gen ausgeschieden (PEDERSEN et al., 2012). Da es aber auch FIP auslösende Viren mit einem intaktem 3c-Gen gibt, sind Mutationen des 3c-Gens offenbar keine Voraussetzung für die Virulenz des Virus (CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012). Inwieweit aber die funktionellen Mutationen die Überlebens- und Replikationsfähigkeit des Virus in den Makrophagen im Körper verbessern oder sogar zur Verhinderung der Apoptose infizierter Makrophagen beitragen kann, bleibt fraglich (BALINT et al., 2012; CHANG et al., 2012; PEDERSEN, 2014a). Da in einer Studie von Bank-Wolf und Mitarbeitern (2014) Mutationen im 3c-Gen oft von Mutationen in der S2-Region des S-Gens begleitet wurden, könnte möglicherweise eine Wechselwirkung zwischen 3c- und S-Protein bestehen (BANK-WOLF et al., 2014).

### **1.3. Immunologische Färbungen von intrazellulärem Antigen**

Zu den immunologischen Färbungen zählen die Immunhistochemie (IH) von Geweben und die Immunzytochemie (IZ) von zytologischen Präparaten sowie die Immunfluoreszenz (IF). Bei diesen Färbungen werden Antigene in Zellen durch spezifische Antikörper, die mit einem Detektionssystem gekoppelt sind, nachgewiesen. Diese sind im Falle der IF fluoreszierende Farbstoffe, die mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Im Falle der IH und der IZ katalysieren Enzyme, wie die Meerrettich-Peroxidase, eine Farbreaktion, die mit Hilfe eines Lichtmikroskops sichtbar wird (AVRAMEAS & GUILBERT, 1971; KIPAR et al., 2005; PEDERSEN, 2014b).

### 1.3.1. Immunhistochemie und Immunzytochemie

Die IH und die IZ kann mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern durchgeführt werden. Sie bedient sich verschiedener Verstärkermethoden, wie der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode oder der Peroxidase-Anti-Peroxidase-(PAP)-Technik, um den Nachweis sensitiver zu machen. IH hat eine Spezifität von 100 % und gilt als der Goldstandard in der Diagnose von FIP (TAMMER et al., 1995; KIPAR et al., 1998; GIORI et al., 2011). Tammer und Mitarbeiter (1995) wiesen in 100 von 102 Gewebeproben von Katzen mit FIP das Antigen in FIP-typischen Granulomen nach (Sensitivität: 98 %). Es wurde vorwiegend in Makrophagen in nekrotischen Bereichen erkannt. Bei einer Katze fand sich das Antigen in intravaskulären Makrophagen. In keiner Gewebeprobe der sechs Katzen mit anderen Krankheiten färbte sich Antigen an (Spezifität: 100 %) (TAMMER et al., 1995). Auch andere Studien konnten das fast ausschließliche Vorkommen des Antigens in Makrophagen bestätigen (PEDERSEN et al., 2015). Kipar und Mitarbeiter (1998) untersuchten 23 Katzen mit FIP und drei Katzen mit anderen Krankheiten (Gingivitis, Konjunktivitis und Otitis externa). Sie konnten bei allen Katzen mit FIP und bei keiner der drei Katzen mit anderen Krankheiten Virusantigen mittels IH nachweisen (Sensitivität: 100 %; Spezifität: 100 %) (KIPAR et al., 1998). Auch Paltrinieri und Mitarbeiter (1998) fanden FCoV-Antigen in FIP-typischen Läsionen bei allen 48 an FIP erkrankten Katzen (Sensitivität: 100 %) (PALTRINIERI et al., 1998). Je mehr Nekrose im Granulom, desto mehr Antigen färbte sich an, vermutlich aufgrund von virusinfizierten Makrophagen, die im Nekroseherd zugrunde gegangen waren (KIPAR et al., 1998; PALTRINIERI et al., 1998). Dahingegen wurde wenig Antigen in Granulomen ohne ausgeprägte Nekrose gefunden; dies macht die Diagnose in solchen Fällen schwierig (KIPAR et al., 1998). Eine große Menge an Antigen wurde in Niere und Leptomeninx nachgewiesen; im Knochenmark hingegen wurde kein Antigen gefunden (KIPAR et al., 1998).

Während chirurgisch entnommene Biopate mit nachfolgender IH von betroffenen Organen für eine *ante-mortem*-Diagnose hilfreich sind, haben IH und IZ von True-Cut-Biopsien oder Feinnadelaspirationen von Leber oder Niere eine geringe Sensitivität (11 % - 38 %) (GIORDANO et al., 2005; KIPAR & MELI, 2014). Dabei war die Sensitivität der Proben aus der Niere (11 % – 20 %) niedriger als die der Leberproben (17 % – 38 %) (GIORDANO et al., 2005).



In Fallberichten wurde mittels IH Antigen in Hautläsionen von sehr selten auftretenden dermatologischen Veränderungen bei FIP nachgewiesen (DECLERCQ et al., 2008; BAUER et al., 2013). Ein weiterer Fallbericht wies mittels IZ Antigen in Makrophagen im Liquor nach (IVES et al., 2013).

Um die Sensitivität von Immunfärbungen aus Erguss zu steigern, kann die Anzahl der virusinfizierten Makrophagen in der Probe erhöht werden, indem ein formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Zellpellet aus mindestens 1 ml Erguss angefertigt wird, welches immunhistochemisch untersucht wird und ein verlässlicheres Ergebnis liefern soll als z. B. die IF aus Erguss (KIPAR & MELI, 2014).

### **1.3.2. Immunfluoreszenz**

Zum ersten Mal wurde die IF in einer Studie aus dem Jahr 1981 verwendet, um FCoV-Antigen in Makrophagen und mononukleären Zellen in verschiedenen Organen experimentell infizierter Katzen nachzuweisen (WEISS & SCOTT, 1981). Stoddart und Mitarbeiter (1988) wiesen nach oraler Infektion von Katzen das Virusantigen mittels IF anfangs in den Tonsillen und im Dünndarm, später auch im Caecum, Colon, Mesenteriallymphknoten und in der Leber nach (STODDART et al., 1988). Cammarata Parodi und Mitarbeiter verwendeten 1993 die gleiche Methode, um Antigen im Erguss nachzuweisen und entdeckten bei 20 von 21 Katzen mit FIP FCoV-Antigen mittels IF im Erguss (Sensitivität: 95 %). Alle der elf nicht an FIP erkrankten Katzen waren negativ (Spezifität: 100 %) (CAMMARATA PARODI, 1993). Eine Studie, die IF im Erguss von Katzen mit histologisch nachgewiesener FIP und Katzen mit anderen Krankheiten untersuchte, wies FCoV-Antigen bei 75 von 79 Katzen mit FIP (Sensitivität: 95 %) und bei keiner der 31 anderweitig erkrankten Katzen nach (Spezifität: 100 %) (PALTRINIERI et al., 1999). Hirschberger und Mitarbeiter fanden in 34 von 49 FIP-bedingten Ergüssen FCoV-Antigen mittels IF, aber in keinem der 50 Ergüsse, die durch andere Krankheiten hervorgerufen wurden (Sensitivität: 69 %; Spezifität: 100 %) (HIRSCHBERGER et al., 1995). Eine Studie, die im Erguss von 62 von insgesamt 109 Katzen mit FIP und keiner von 62 Kontrollkatzen FCoV-Antigen nachwies, hatte eine Sensitivität von 57 % und eine Spezifität von 100 % (HARTMANN et al., 2003). Die teilweise niedrige Sensitivität in den verschiedenen Studien kann durch einen niedrigen Gehalt an Makrophagen im jeweiligen Ergusspräparat erklärt werden. Des Weiteren kann ein

negatives Ergebnis auch durch das Besetzen des Antigens mit kompetitiven FCoV-Antikörpern aus dem Erguss selbst verursacht werden (HARTMANN, 2005).

Eine neuere Studie untersuchte die IF im Erguss einer relativ geringen Anzahl von Katzen (zehn Katzen mit pathologisch nachgewiesener FIP (davon alle zehn IF-positiv), sieben Katzen mit anderen pathologisch nachgewiesenen Krankheiten (davon zwei IF-positiv)) (LITSTER et al., 2013). Die Sensitivität betrug 100 %, die Spezifität nur 71 %. Positive Proben blieben ein bis acht Tage positiv, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wurden, und bis zu 13 Tage, wenn sie bei 4 °C gelagert wurden. Als mögliche Ursache für die niedrigere Spezifität im Vergleich zu früheren Studien vermuteten die Autoren Laborkontaminationen der Proben. Eine andere Ursache könnte eine noch nicht klinisch manifeste FIP der jeweiligen Katzen mit nachgewiesenen anderen Krankheiten sein. Die vergleichbar höhere Sensitivität ließe sich durch die Verwendung anderer Antikörper als in früheren Studien oder mit der zügigen Verarbeitung der Proben innerhalb von 24 Stunden nach Probenentnahme erklären (LITSTER et al., 2013).

#### **1.4. Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen**

Da FIP eine immunmedierte Krankheit ist, treten häufig Antigen-Antikörper-Komplexe auf (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979; JACOBSE-GEELS et al., 1980; AUGUST, 1984). Diese können mittels IF, die den abgelagerten Komplementfaktor C3 nachweist, und mittels kompetitiven enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) nachgewiesen werden (JACOBSE-GEELS et al., 1980; HORZINEK et al., 1986; KIPAR et al., 1999).

So wurden in einer Studie von Jacobse-Geels und Mitarbeitern (1980) bei sechs von acht Katzen mit experimentell induzierter FIP und bei allen sechs natürlich an FIP erkrankten Katzen Ablagerungen des Komplementfaktors C3 mittels IF in den Nierenglomeruli nachgewiesen (Sensitivität: 86 %). Keine der acht Kontrollkatzen war positiv (Spezifität: 100 %) (JACOBSE-GEELS et al., 1980). Eine weitere Studie dieser Autoren fand bei allen sechs experimentell infizierten, an FIP erkrankten Katzen C3-Ablagerungen in den Glomeruli der Niere (Sensitivität: 100 %) (JACOBSE-GEELS et al., 1982).

Beim Nachweis mittels kompetitiven ELISA werden die Antigen-Antikörper-Komplexe an ein Antigen, das auf der Microtiterplatte fixiert ist, gebunden. Ein

monoklonaler Antikörper, der gegen das Glykoprotein des Antigens gerichtet ist, konkurriert mit den Antigen-Antikörper-Komplexen um die Bindestellen am fixierten Antigen. Der gebundene monoklonale Antikörper wird mit einem Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörper, der wiederum an den monoklonalen ersten Antikörper bindet, sichtbar gemacht. Somit ist die photometrisch gemessene Farbreaktion umso schwächer, je mehr Antigen-Antikörper-Komplexe in der Probe enthalten sind (HARTMANN et al., 2003).

Hartmann und Mitarbeiter (2003) untersuchten den diagnostischen Nutzen des Nachweises von Antigen-Antikörper-Komplexen im Serum von insgesamt 112 Katzen mittels kompetitivem ELISA. Dieser Test stellte sich aufgrund einer Sensitivität von 48 % (14 von 29 Katzen mit FIP positiv) und einer Spezifität von 92 % (7 von 83 Katzen mit anderen Krankheiten positiv) als wenig aussagekräftig für die Diagnose von FIP dar (HARTMANN et al., 2003). So kann auch das Blut gesunder FCoV-Träger zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe enthalten (MELI et al., 2004). Kipar und Mitarbeiter (1999) wiesen bei sechs von sieben spezifisch pathogenfreien (SPF) Katzen, die FCoV ausgesetzt waren, aber nicht an FIP erkrankten, Antigen-Antikörper-Komplexe mittels kompetitivem ELISA nach (Spezifität: 14 %) (KIPAR et al., 1999).

## **2. Indirekter Erregernachweis**

Als indirekter Erregernachweis gilt der Nachweis von Antikörpern gegen FCoV. Da die Produktion von Antikörpern sowohl durch den Kontakt mit dem nicht mutierten, avirulenten FCoV als auch bei Katzen mit FIP verursacht wird, ist dieses Nachweisverfahren nicht für die Diagnose von FIP geeignet (VENNEMA et al., 1998; HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2014b). Der Nachweis von Antikörpern kann mittels indirektem Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT), Virusneutralisationstest, ELISA oder immunochromatographischem Schnelltest (rapid immunochromatographic test, RIM) durchgeführt werden (PEDERSEN, 2009; MELI et al., 2013; TAKANO et al., 2013). Der IFAT kann nur im Labor durchgeführt werden, für ELISA und RIM gibt es kommerziell erhältliche Schnelltests. Während IFAT und ELISA quantitativ Titer bestimmen können, kann man mit dem RIM-Schnelltest, je nach Stärke der angefärbten Bande, nur graduell unterschiedliche positive und negative Ergebnisse erkennen (ADDIE et al., 2004; ADDIE et al., 2015). Addie und Mitarbeiter (2015) untersuchten acht

verschiedene kommerzielle Tests, darunter vier IFAT, ein ELISA und drei RIM. IFAT und ELISA hatten die höchste Sensitivität zum Nachweis von Antikörpern (96 % -100 %), während RIM nur eine Sensitivität von 64 % - 92 % hatte. Der RIM gewährleistete dagegen die kürzeste Bearbeitungszeit (10 – 15 min) (ADDIE et al., 2015). IFAT gilt als der Goldstandard für den Nachweis von Antikörpern, zeigte aber in verschiedenen Labors stark differierende Ergebnisse (ADDIE et al., 2004; ADDIE et al., 2012; ADDIE et al., 2015). Als Substrat werden meist Schweine- oder Katzenszellen verwendet, die mit dem transmissiblen Gastroenteritis-Virus (TGEV) oder FCoV infiziert wurden (PEDERSEN, 1976; KUMMROW et al., 2005).

### **2.1. Antikörpernachweis im Blut**

Ein Nachweis von Antikörpern im Blut zeigt lediglich einen Kontakt mit FCoV auf. Er ist nicht, wie fälschlicherweise oft noch angenommen, als Mittel für die Diagnose von FIP geeignet (PEDERSEN, 2009; ADDIE et al., 2015).

Eine Studie von Hartmann und Mitarbeitern (2003) zeigte, dass niedrige bis mittlere Antikörpertiter (1:25, 1:100, 1:400) im Serum keinerlei Aussage über das Auftreten einer FIP erlauben. Ein hoher Antikörpertiter (1:1600) im Blut ist zumindest ein Hinweis auf FIP (HARTMANN et al., 2003). Das Fehlen von Antikörpern schließt eine FIP nicht aus, weil bei 10 % der Katzen mit FIP keine Antikörper nachweisbar sind (HARTMANN et al., 2003). Der Grund dafür ist, dass Antikörper in Antigen-Antikörper-Komplexen gebunden sein können und somit nicht an das Antigen im Test binden und dadurch nicht nachgewiesen werden können (MELI et al., 2013).

Der 7b-FIP-Test weist Antikörper gegen das 7b-Protein nach. Er war ein Versuch, die Antikörperbestimmung spezifischer für die Diagnose von FIP zu gestalten (BELL et al., 2006a). Dieser Antikörpernachweis stützte sich auf die fälschliche Annahme, dass nur FCoV von Katzen mit FIP und nicht FCoV von Katzen, die nicht an FIP erkrankten, ein intaktes 7b-Gen exprimieren und somit Antikörper gegen das 7b-Protein induzieren, also nur Katzen mit FIP Antikörper gegen das 7b-Protein besitzen. Ein nicht intaktes 7b-Gen kommt allerdings nur bei einem spezifischen Isolat von nicht virulentem FCoV (WSU-79-1683) vor. Andere Stämme von nicht virulentem FCoV haben ein intaktes 7b-Gen (HERREWEGH et al., 1995b; PEDERSEN, 2009). Das Vorhandensein des 7b-Gens bei FCoV von

Katzen, die nicht an FIP erkrankten, wurde später auch durch Kennedy und Mitarbeiter (2008) bestätigt, die Antikörper gegen das 7b-Protein bei den meisten FCoV-infizierten Katzen fanden und somit schlussfolgerten, dass das Vorhandensein von Antikörpern gegen dieses Protein nicht spezifisch für FIP ist und damit auch keine diagnostische Relevanz hat (KENNEDY et al., 2008).

Auch wenn der Nachweis von Antikörpern nicht für die Diagnose von FIP geeignet ist, so gibt es doch Anwendungsgebiete, wie z. B. die Aufnahme einer neuen Katze in einen FCoV-freien Haushalt (ADDIE et al., 2004). Katzen, die FCoV mit dem Kot ausscheiden, haben signifikant höhere Antikörpertiter im Blut als Katzen, die kein Virus ausscheiden (PEDERSEN et al., 2008). In einer australischen Studie wurden in Mehrkatzenhaushalten signifikant höhere Antikörpertiter festgestellt als in Einzelkatzenhaushalten. Ebenso wurden signifikant höhere Titer bei Katzen unter zwei Jahren im Gegensatz zu älteren Katzen nachgewiesen (BELL et al., 2006b). Außerdem hatten bestimmte Katzenrassen (z. B. Britisch Kurzhaar, Burmese) signifikant höhere Titer als andere Rassen (z. B. Europäisch Kurzhaar, Perser, Siamese). Möglicherweise kann man von rassebedingten Unterschieden der Immunantwort bei einer FCoV-Infektion ausgehen (BELL et al., 2006a). Die Antikörpertiterbestimmung im Blut zur FCoV-Kontrolle in Katzensuchten wird allerdings kontrovers diskutiert, da das Vorhandensein von Antikörpern lediglich einen vorangegangenen Kontakt mit dem Virus bestätigt (PEDERSEN, 2009). Besser geeignet ist die Bestimmung von FCoV-RNA mittels RT-PCR im Kot (ADDIE & JARRETT, 2001; PEDERSEN et al., 2008; ADDIE et al., 2009).

## **2.2. Antikörpernachweis im Erguss**

Zum Nachweis von Antikörpern im Erguss können auch Tests verwendet werden, die für den Nachweis von Antikörpern im Blut zugelassen sind. Denn in einer Studie von Addie und Mitarbeitern (2015) wurde Erguss erfolgreich bei verschiedenen Antikörper-Nachweisverfahren angewendet, auch wenn die Hersteller die Tests nur für den Gebrauch mit Blut empfohlen (ADDIE et al., 2015).

Das Auftreten von Antikörpern im Blut korreliert mit dem Auftreten von Antikörpern im Erguss (SOMA & ISHII, 2004). Auch im Erguss können bei Katzen mit FIP Antikörper in Antigen-Antikörper-Komplexen gebunden und

nicht nachweisbar sein und damit zu falsch negativen Ergebnissen führen (MELI et al., 2013). Hartmann und Mitarbeiter (2003) wiesen bei 102 von 119 Katzen mit FIP (Sensitivität: 86 %) und elf von 74 Katzen mit einer anderen Krankheit (Spezifität: 85 %) Antikörper im Erguss nach (HARTMANN et al., 2003). Damit ist der Nachweis von Antikörpern im Erguss nützlicher als der Antikörpernachweis im Blut (HARTMANN, 2005).

### **2.3. Antikörpernachweis im Liquor cerebrospinalis**

Foley und Mitarbeiter (1998) wiesen bei 15 von 16 Katzen mit neurologischer oder ophthalmologischer Form von FIP FCoV-Antikörper im Liquor nach (Sensitivität: 94 % bei Katzen mit neurologischer FIP), aber bei keiner der drei Katzen mit anderen Erkrankungen (Spezifität: 100 %). Bei keiner von acht Katzen mit nicht-neurologischer FIP wurden FCoV-Antikörper im Liquor gemessen (FOLEY et al., 1998). Die Autoren wiesen Antikörpertiter von 1:25 bis 1:1600 im Liquor nach. Da proportional höhere Antikörpertiter im Liquor als im Serum gemessen wurden, vermuteten Foley und Mitarbeiter (1998) eine intrathekale Produktion von Antikörpern durch die Zellen des ZNS als Antwort auf sich lokal replizierendes Virus. Sie hielten einen Übertritt der Antikörper vom Blut in den Liquor über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke (BHS) für unwahrscheinlich (FOLEY et al., 1998).

Boettcher und Mitarbeiter (2007) wiesen dagegen bei 23 Katzen mit FIP und 44 Kontrollkatzen Antikörper mit einer Sensitivität von 60 % und einer Spezifität von 90 % im Liquor nach. Bei Katzen mit ZNS-Beteiligung (zehn Katzen mit FIP, 29 Katzen mit einer anderen Krankheit) lag die Sensitivität bei 60 %, die Spezifität bei 93 %. Nur bei Katzen mit hohen Serum-Antikörpern (1:4096 bis 1:16384) wurden auch Antikörper im Liquor festgestellt. Es bestand keine Korrelation zwischen Antikörpertiter im Liquor und anderen Parametern im Liquor, wie Zellzahl und Proteingehalt. Außerdem wurden in dieser Studie bei zwei Katzen mit einer anderen neurologischen Krankheit (Gehirntumoren) Antikörper gemessen. Die Autoren postulierten deshalb, dass die Antikörper im Liquor aus dem Blut stammten und der Antikörpernachweis zur Diagnose von FIP nicht geeignet sei (BOETTCHER et al., 2007).

Der diagnostische Nutzen der Antikörperbestimmung im Liquor zum Nachweis von FIP wurde auch durch eine weitere Studie in Frage gestellt, die mithilfe des

Liquor/Serum-Albumin-Quotienten und des IgG-Index die funktionale Integrität der BHS und die Herkunft der Antikörper im Liquor bestimmte (STEINBERG et al., 2008). In dieser Studie wurde bei lediglich 25 % der Katzen mit neurologischer FIP eine intrathekale IgG-Produktion festgestellt, während Katzen, die nicht an FIP erkrankt waren, Antikörper auch durch Zellen des Hirnparenchyms oder der Meningen produzierten. Zudem gab es bei zwei Katzen mit neurologischer FIP aufgrund eines niedrigen Antikörper-spezifischen Index den Hinweis, dass die gemessenen Antikörper im Liquor ausschließlich aus dem Blut stammen (STEINBERG et al., 2008).

### **III. STUDIE I:**

#### **COMPARISON OF REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS, SERUM, AND BODY CAVITY EFFUSION FOR THE DIAGNOSIS OF FELINE INFECTIOUS PERITONITIS**

Stephanie Doenges<sup>1</sup>

Karin Weber<sup>1</sup>, Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Roswitha Dorsch<sup>1</sup>, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA

Robert Fux<sup>2</sup>, Dr. med. vet.

Katrin Hartmann<sup>1</sup>, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

<sup>1</sup> Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

<sup>2</sup> Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, LMU University of Munich, Germany

**Journal of Feline Medicine Surgery**, eingereicht zur Veröffentlichung

(Einverständniserklärung zur Aufnahme in die Dissertation von allen Co-Autoren vorhanden.)



## **Abstract**

### *Objectives*

Diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP) remains challenging especially in cats without effusions. The objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detecting feline coronavirus (FCoV) RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and serum in comparison to the same real-time RT-PCR in body cavity effusions.

### *Methods*

This prospective case control study included 92 cats. Forty three cats had a definitive diagnosis of FIP, established either by histopathological examination (n=28) or by positive immunofluorescence staining of FCoV antigen in macrophages of effusions (n=11), or by both methods (n=4). Forty nine control cats had other diseases, but similar clinical signs. Real-time RT-PCR was performed on PBMC of 37 cats (21 cats with FIP, 16 controls), on serum of 51 cats (26 cats with FIP, 25 controls), and on body cavity effusion of 69 cats (36 cats with FIP, 33 controls). Sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predictive value (NPV) including confidence intervals (CI) were calculated.

### *Results*

Real-time RT-PCR of PBMC, serum, and body cavity effusion showed a specificity of 100% (CI: 79.4%-100% in PBMC, 86.3%-100% in serum, 89.4%-100% in body cavity effusions) and a sensitivity of 28.6% (CI: 11.3%-52.2%) in PBMC, 15.4% (CI: 4.4%-34.9%) in serum, and 88.9 (CI: 73.9%-96.9%) in body cavity effusions to diagnose FIP.

### *Conclusions and relevance*

Although it is known that RT-PCR can often be false positive in healthy cats, this real-time RT-PCR was shown to be a specific tool for the diagnosis of

---

FIP when applied in a clinical setting. Sensitivity in body cavity effusions was high, but low in PBMC and serum. PBMC samples showed a higher sensitivity than serum samples, and might therefore be a better choice if no effusion is present.

## Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) is a common disease and a major reason for death in young cats.<sup>1,2</sup> Feline coronavirus (FCoV) infections occur frequently in the cat population worldwide.<sup>3-6</sup> Despite the high prevalence of FCoV infection, only some infected cats develop FIP.<sup>7</sup> The change from the harmless enteric biotype (feline enteric coronavirus (FECV)) into the pathogenic variant (feline infectious peritonitis virus (FIPV)) is due to mutations of the virus.<sup>8-11</sup> The mutations cause a change in enterocyte to macrophage tropism with the ability to infect and effectively replicate within cells of the macrophages lineage.<sup>2,12</sup> The latter is regarded as the key event in the pathogenesis of FIP.<sup>13,14</sup> Various genes, including the 7b, 3c and S gene are discussed to be associated with virulent mutations and the change of tissue tropism.<sup>8,10,11,15-18</sup>

A definitive diagnosis of FIP ante mortem remains challenging. If no effusion is present, organ biopsy is necessary for a definitive diagnosis.<sup>19</sup> As the median survival time of cats with FIP is only a few days<sup>20,21</sup> and the diagnosis of FIP commonly leads to euthanasia, a highly specific diagnostic tool is necessary to confirm the diagnosis. Different RT-PCR protocols are used to diagnose FIP, but for most of them sensitivity and specificity are rather low.<sup>19,22-25</sup> Most studies used serum or plasma and found a very low sensitivity. Using whole blood was associated with a slightly better sensitivity, but a lower specificity.<sup>26,27</sup> The sensitivity of RT-PCR in body cavity effusions however seems to be higher, but this has not been investigated in controlled studies involving large numbers of cats.<sup>10,19</sup>

The aim of the present study was to investigate and compare sensitivity and specificity of a real-time RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells

(PBMC), serum, and body cavity effusion in cats with confirmed FIP and cats with confirmed diseases other than FIP, but with similar clinical signs.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

This study was designed as a case control study, and included 92 cats. The cats were presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine, LMU University of Munich, Germany (n=80) or to private veterinarians (n=12). The case group (n=43) included cats with a definitive diagnosis of FIP (table 1). FIP diagnosis was confirmed by typical morphology in histopathological examination (surface-bound multisystemic pyogranulomatous and fibrinonecrotic disease with venulitis with or without high-protein exsudate) in 28/43 cats. In 11/43 cats, FIP diagnosis was established by a positive immunofluorescent staining of FCoV antigen in macrophages of thoracic or abdominal effusions,<sup>19,28</sup> and in 4/43 cats, FIP was confirmed by both methods.

The control group (n=49) was defined as a population of cats in which a veterinarian would consider FIP as a differential diagnosis. Only cats were included with one or more of the following signs: body cavity effusion, a rectal temperature of  $\geq 40$  °C (with  $\leq 20,000$  white blood cells/ $\mu$ L and  $\leq 1,000$  banded neutrophils/ $\mu$ L), icterus, ocular signs, neurological signs. Cats were included in the control group if they were definitively diagnosed with diseases other than FIP that explained the clinical signs. These diseases were definitively confirmed either ante-mortem (n=31) or at necropsy and histopathological examination (n=18). Alternatively, cats were included that survived at least 1 year after sampling (n=8; table 2). These cats were included because the average survival time of cats with

FIP after the onset of clinical signs is between days and weeks.<sup>12,20,21</sup>

Consequently, cats with FIP are not expected to be alive after 1 year.

#### *Sampling and RNA extraction of PBMC*

Whole blood samples (n=37) were collected ante mortem for diagnostic purposes. PBMC were obtained from non-coagulated ethylenediaminetetraacetate (EDTA) blood samples (21 of cats with FIP, 16 of cats with other diseases) within 24 hours after sampling by applying the following process: One milliliter of non-coagulated blood mixed with one volume of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) was used for density gradient centrifugation. The mixture was carefully added on top of 5 mL of a density gradient medium (NycoPrep 1.068, Progen Biotechnik) and centrifuged at 300 x g for 30 min. PBMC were collected and, after two washing steps with 10 mL of PBS, centrifuged at 800 x g for 10 min to get a fluid-free cell pellet.

Total RNA of the cell pellet was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were treated with a lysing buffer (buffer RLT) and homogenized using QIAshredder spin columns (Qiagen). The lysate was applied to RNeasy Mini spin columns. After two washing steps, RNA was eluted with 30 µL of RNase-free water and stored at -80 °C in a 1.5 mL Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tube (Eppendorf).

#### *Sampling and RNA extraction of serum and body cavity effusions*

Serum samples (26 of cats with FIP, 25 of cats with other diseases) and body cavity effusion samples (36 of cats with FIP, 33 of cats with other diseases) were obtained ante mortem for diagnostic purposes. Ascitic and thoracic fluids

were obtained with ultrasound guidance using a 19- or 21-gauge butterfly needle. Serum and cell-free body cavity effusions were stored at -80 °C in a 1.5 mL Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tube (Eppendorf).

Viral RNA was isolated from serum and cell-free body cavity effusion using a QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen). Briefly, 140  $\mu$ L aliquots of samples were lysed under highly denaturing conditions to inactivate RNases and isolate the intact viral RNA. Adjusted buffering conditions yielded an optimal binding of the viral RNA on the silica membrane of the QIAamp Mini spin column. After being washed with two wash buffers, the RNA was eluted with 60  $\mu$ L of RNase-free buffer and stored at -80 °C in a 1.5 mL Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tube (Eppendorf).

#### *Real-time RT-PCR*

Detection of FCoV was performed using a real-time RT-PCR as described before.<sup>29</sup> A real-time RT-PCR detecting  $\beta$ -actin messenger RNA (mRNA)<sup>30</sup> was used as an internal and extraction control. The QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) was used for the one-step real-time RT-PCR. Five microliters of RNA template were added to 12.5  $\mu$ L of Master Mix, 0.25  $\mu$ L of RT Mix, 5.25  $\mu$ L of RNase-free water, and 2  $\mu$ L of primer probe mix. All primers were used in a concentration of 0.8  $\mu$ M, and 5'FAM/3'BHQ-1 labeled TaqMan probes were used in a concentration of 0.3  $\mu$ M. For  $\beta$ -actin mRNA, the PCR primer and probe concentrations were 0.2  $\mu$ M and 0.1  $\mu$ M, respectively. The following temperature profile was chosen: reverse transcription at 50 °C for 30 min, reverse transcriptase inactivation and polymerase activation at 95 °C for 15 min, 42 cycles of

denaturation for 30 s at 95 °C, and annealing and elongation for 60 s at 60 °C. A Stratagene MX3005P was used for the fluorescence measurement.

#### *Data analyses*

Sensitivity and specificity as well as the positive (PPV) and negative predictive values (NPV) were calculated. Confidence intervals (CI) of 95% were determined. Data analyses were performed using a two-sided Fisher's exact test with Graph Pad Prism Version 5.0 and a significance threshold of 0.05.

### **Results**

Overall, 157 samples were evaluated, including 83 samples of cats with FIP and 74 samples of control cats (table 3). The sensitivity and specificity as well as the PPV and NPV are shown in table 4. None of the samples that tested positive for FCoV RNA was false positive. Hence, the specificity was 100%. PBMC had a sensitivity of 31.6%, the sensitivity of serum was 23.1%, and the sensitivity of body cavity effusion was 88.9%. Ct values ranged between 25.8 and 41.7 (table 1).

### **Discussion**

The aim of the study was to compare the diagnostic utility of a real time RT-PCR in PBMC, serum, and body cavity effusion as diagnostic tool for FIP. The sensitivity of the present assay was relatively low in PBMC (31.6%) and in serum (23.1%). This is in contrast to previous studies in which RT-PCR of blood had sensitivities ranging from 50% to 93%<sup>19,22,24,26</sup>. It could be argued that these results were caused by a low analytical sensitivity of the PCR assay. However, sensitivity of the same real-time RT-PCR was higher when testing body cavity

effusions (88.9%) in the present study. RNA was isolated from the serum and body cavity effusions using the same method under identical conditions.

Nevertheless, sensitivity of body cavity effusions was quite high and that of serum rather low. This indicates that the RNA extraction was adequate. Thus, the low sensitivity is likely due to a low virus concentration in blood samples. Sensitivity of PBMC was higher than that of serum, which can be explained by the fact that the virus replicates intracellularly. This is in accordance to other studies, which had higher sensitivities when using PBMC.<sup>26</sup> Therefore, PBMC rather than serum should be recommended in the future. The higher sensitivity in body cavity effusion in contrast to blood could be explained by the close contact of body cavity effusion with the pyogranulomas and serosal surface of the abdominal viscera, which contain high virus concentrations.<sup>12</sup>

Although an absolute quantification was not performed, the high Ct values especially in serum indicate a low virus loads in the specimen. Ct values in PBMC were lower than in serum (table 2), which supports the theory of intracellular replication causing higher viral loads in samples with white blood cells in contrast to cell-free serum.

The specificity of the real-time RT-PCR used in this study was 100%, regardless of the material used; thus, this value was much higher than the results of previous studies investigating RT-PCR for the diagnosis of FIP.<sup>19,22,24,25</sup> These previous studies have described RT-PCR specificities ranging between 20% and 90% for serum and plasma. Only one former study had a specificity of 100%, which however used an mRNA RT-PCR.<sup>26</sup> The idea behind detecting for mRNA was to identify only the replicating virus. This impressively high specificity, however, was not confirmed two years later, when Can-Shana and colleagues (2007) used an identical mRNA RT-PCR and found FCoV in 52% of healthy cats



that came from multi-cat households or were stray cats from the same location.<sup>27</sup> Most of the former studies used healthy cats of catteries or shelters, in which prevalence of FCoV infection is generally much higher than in single-cat households.<sup>4,31</sup> One study used cats in the control group that were experimentally infected with non-pathogenic FCoV.<sup>25</sup> These cats, from catteries or experimentally infected, are often transiently viraemic, and FCoV can also be found in various organs in these cats even without development of FIP.<sup>32,33</sup> In the present study, only 5 of 35 cats (of which information was available) of the control group were derived from households with more than 2 cats. Therefore, the high specificity in the present study is probably due to the absence of circulating FCoV infection. Moreover, in the present study, the control group consisted of cats that were presented to veterinarian hospitals for various diseases leading to similar clinical signs to those of FIP. The chosen type of population mimics the real situation in which a clinician considers FIP as differential diagnosis. Such a control group is better suited to evaluate the clinical utility of a diagnostic test for FIP than a control group that includes the entire clinic population, healthy cats, or experimentally FCoV-infected cats.

Furthermore, using a one tube real time RT PCR system minimizes the risk of carry-over contamination, which adds to the high specificity of the assay used in this study.<sup>34</sup>

Mutations in various genes (7a, 7b, 3c) have been discussed for biotype conversion of FCoV.<sup>9,14,15,17</sup> A study found changes in the S gene region encoding the fusion peptide in >95% of cats with FIP.<sup>10</sup> Another study, however, found the resulting amino acid changes in the fusion peptide in cats with and without FIP, suggesting that this mutation rather is a marker for systemic spread of FCoV than for the FIP phenotype.<sup>35</sup> A third study identified mutations at the S1/S2 furin-

cleavage site of the S gene affecting the efficiency of cleavage of the S protein by furin.<sup>11</sup> Thus, so far no specific mutation which 100% correlates with the FIP phenotype has been identified. The real time RT-PCR of the present study did not detect any of the named mutations but used a well conserved nucleotide region spanning the membrane-nucleocapsid gene junction for amplification,<sup>29</sup> which proved to be highly specific. The real-time RT-PCR of the present study with a specificity of 100% can be considered a reliable tool for diagnosing FIP as long as there is no further information available about the different mutations which are supposed to be associated with the acquisition of FIP virulence.<sup>2</sup>

One limitation of this study was that not all sample types were available from each cat. Consequently, the comparability of different sample types from the same cat was limited. Another limitation was the assignment of cats to the control group. Cats were assigned to the control group if a disease other than FIP was confirmed that explained the observed signs. The possibility that a cat in the control group suffered from both, FIP and another disease cannot be excluded completely. The occurrence of such a coincidence is however very unlikely, because no false positive PCR results were observed in the present study.

### **Conclusions**

In conclusion, this study evaluated the sensitivity and specificity of a real-time RT-PCR in PBMC, serum, and body cavity effusion. The study found an excellent specificity, indicating that this PCR is a valuable tool for the diagnosis of FIP. The sensitivity of PBMC and serum was low, with that of PMBC being higher than that of serum, indicating to use PBMC instead of serum or plasma for the diagnosis of FIP if no effusion samples are available. Real-time RT-PCR of

body cavity effusion had a high sensitivity. Thus, body cavity effusion, if available, is the sample type of choice when diagnosing FIP.

### **Conflict of interest statement**

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other organizations or people who could inappropriately influence or bias the content of the paper.

### **Acknowledgements**

Parts of the results of this study were presented at the 21<sup>st</sup> German Internal Medicine and Clinical Pathology Conference 2013 in Munich, Germany.

## References

- 1 Hartmann K. **Feline infectious peritonitis.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35: 39-79.
- 2 Pedersen NC. **An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis.** *Vet J* 2014; 123-132.
- 3 Horzinek MC and Osterhaus AD. **Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey.** *Am J Vet Res* 1979; 40: 1487-1492.
- 4 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.
- 5 Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, et al. **Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea.** *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 331-337.
- 6 Addie DD and Jarrett O. **A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens.** *Vet Rec* 1992; 130: 133-137.
- 7 Addie DD, Toth S, Murray GD, et al. **Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus.** *Am J Vet Res* 1995; 56: 429-434.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 Chang HW, Egberink HF, Halpin R, et al. **Spike protein fusion Peptide and feline coronavirus virulence.** *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1089-1095.
- 11 Licitra BN, Millet JK, Regan AD, et al. **Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus.** *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1066-1073.
- 12 Pedersen NC. **A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008.** *J Feline Med Surg* 2009; 11: 225-258.
- 13 Dewerchin HL, Cornelissen E and Nauwynck HJ. **Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes.** *Arch Virol* 2005; 150: 2483-2500.
- 14 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.
- 15 Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, 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.
- 16 Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, et al. **Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus.** *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1445-1452.
- 17 Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, et al. **Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene.** *J Gen Virol* 2010; 91: 415-420.
- 18 Takano T, Tomiyama Y, Katoh Y, et al. **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* 2011; 156: 72-80.

- 19 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.
- 20 Ritz S, Egberink H and 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: 1193-1197.
- 21 Fischer Y, Ritz S, Weber K, et al. **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: 1270-1276.
- 22 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.
- 23 Herrewegh AA, Mahler M, Hedrich HJ, et al. **Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony.** *Virology* 1997; 234: 349-363.
- 24 Egberink HF, Herrewegh AP, Schuurman NM, et al. **FIP, easy to diagnose?** *Vet Q* 1995; 17: 24-25.
- 25 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.
- 26 Simons FA, Vennema H, Rofina JE, et al. **A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis.** *J Virol Methods* 2005; 124: 111-116.
- 27 Can-Sahna K, Soydal Ataseven V, Pinar D, et al. **The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR.** *J Feline Med Surg* 2007; 9: 369-372.
- 28 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.
- 29 Dye C, Helps CR and Siddell SG. **Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats.** *J Feline Med Surg* 2008; 10: 167-174.
- 30 Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, et al. **Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments.** *J Virol Methods* 2007; 140: 115-123.
- 31 Pedersen NC, Sato R, Foley JE, et al. **Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus.** *J Feline Med Surg* 2004; 6: 83-88.
- 32 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.** *J Feline Med Surg* 2004; 6: 69-81.
- 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 Mackay IM, Arden KE and Nitsche A. **Real-time PCR in virology.** *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292-1305.
- 35 Porter E, Tasker S, Day MJ, 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.

**Table 1.** Cats with feline infectious peritonitis (FIP), clinical signs, method of confirmation of the diagnosis FIP, and threshold cycle (Ct) values of the tested peripheral blood mononuclear cells (PBMC), serum, and body cavity effusion samples

Cat	Signs for inclusion	Diagnosis	Confirmation	Method of confirmation	Ct <sup>a</sup> values of PBMC <sup>b</sup>	Ct values of serum	Ct values of body cavity effusion
#1	Thoracic effusion, icterus	FIP <sup>c</sup>	Post mortem	Histopathology	30.5 (positive)	No Ct	No Ct
#2	Thoracic effusion, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	No Ct	31.3 (positive)
#3	Hyperglobulinemia	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	No Ct	- <sup>d</sup>
#4	Ascites	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV <sup>e</sup> antigen in effusion macrophages	34.6 (positive)	No Ct	27.6 (positive)
#5	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	No Ct	32.3 (positive)
#6	Thoracic effusion, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	No Ct	27.5 (positive)
#7	Ascites, fever	FIP	Ante mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	No Ct	No Ct	27.0 (positive)
#8	Thoracic and pericardial effusions	FIP	Ante mortem Post mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages, histopathology	No Ct	No Ct	27.4 (positive)
#9	Ascites, neurologic signs	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	No Ct	-
#10	Ascites, fever, icterus, neurologic and ocular signs	FIP	Post mortem	Histopathology	26.6 (positive)	37.1 (positive)	29.9 (positive)
#11	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	26.7 (positive)	37.3 (positive)	32.8 (positive)
#12	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	26.9 (positive)	-	26.8 (positive)
#13	Ascites, fever	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	No Ct	No Ct	32.0 (positive)
#14	Thoracic effusion and ascites, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	-	26.9 (positive)

#15	Thoracic effusion and ascites	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	No Ct	No Ct	35.1 (positive)
#16	Ascites, neurologic signs	FIP	Post mortem	Histopathology	28.9 (positive)	39.1 (positive)	36.4 (positive)
#17	Thoracic effusion, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	n.a.	36.7 (positive)
#18	Thoracic effusion and ascites, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	n.a.	No Ct
#19	Thoracic effusion, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	n.a.	n.a.
#20	Ascites	FIP	Post mortem	Histopathology	No Ct	n.a.	n.a.
#21	Ascites, fever, icterus	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	No Ct	No Ct	30.4 (positive)
#22	Ascites	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	No Ct	26.8 (positive)
#23	Icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	No Ct	n.a.
#24	Ascites, fever	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	n.a.	No Ct	n.a.
#25	Thoracic effusion	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	No Ct	27.5 (positive)
#26	Ascites, fever	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	n.a.	No Ct	30.7 (positive)
#27	Ascites, fever, neurologic signs	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	No Ct	31.1 (positive)
#28	Thoracic effusion, fever	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	n.a.	No Ct	28.7 (positive)
#29	Thoracic effusion	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	No Ct	31.0 (positive)
#30	Thoracic effusion	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	n.a.	No Ct	No Ct
#31	Ascites	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	No Ct	32.4 (positive)
#32	Fever	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	41.7 (positive)	n.a.

#33	Thoracic effusion and ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	n.a.	No Ct
#34	Thoracic effusion and ascites, icterus	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	n.a.	n.a.	29.1 (positive)
#35	Ascites, fever	FIP	Ante-mortem, post mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages, histopathology	n.a.	n.a.	29.6 (positive)
#36	Thoracic effusion	FIP	Ante-mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages	n.a.	n.a.	27.7 (positive)
#37	Thoracic effusion and ascites, fever, icterus, neurologic signs	FIP	Ante-mortem, post mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages, histopathology	n.a.	n.a.	31.8 (positive)
#38	Ascites	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	n.a.	39.8 (positive)
#39	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	n.a.	29.4 (positive)
#40	Ascites, icterus	FIP	Ante-mortem, post mortem	Immunohistochemistry of FCoV antigen in effusion macrophages, histopathology	n.a.	n.a.	33.0 (positive)
#41	Thoracic effusion, fever, ocular signs	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	n.a.	26.9 (positive)
#42	Ascites, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	n.a.	32.6 (positive)
#43	Ascites, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	n.a.	n.a.	25.8 (positive)

<sup>a</sup> Ct, threshold cycle

<sup>b</sup> PBMC, peripheral blood mononuclear cells

<sup>c</sup> FIP, feline infectious peritonitis



<sup>d</sup> n.a., not available

<sup>e</sup> FCoV, feline coronavirus

**Table 2.** Cats of the control group with signs for inclusion, confirmed diseases, method of confirmation, and the threshold cycle (Ct) values of the tested peripheral blood mononuclear cells (PBMC), serum, and body cavity effusion samples

Cat	Signs for inclusion	Diagnosis	Confirmation	Method of confirmation	Ct <sup>a</sup> values of PBMC <sup>b</sup>	Ct values of serum	Ct values of body cavity effusion
#1	Thoracic effusion	Lymphoma	Ante-mortem	Cytology	No Ct	No Ct	No Ct
#2	Ascites	Lymphoma	Ante-mortem	Histology	No Ct	No Ct	No Ct
#3	Thoracic effusion, ascites	Lymphoma	Ante-mortem	Cytology	No Ct	No Ct	No Ct
#4	Thoracic effusion	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	No Ct	No Ct	No Ct
#5	Neurologic signs	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	No Ct	No Ct	n.a. <sup>c</sup>
#6	Icterus	Cholangiohepatitis	Survival time $\geq 1$ year, ante-mortem	Ultrasonography	No Ct	No Ct	n.a.
#7	Ascites	Neutrophilic cholangiohepatitis	Survival time $\geq 1$ year, ante-mortem	Histology	No Ct	No Ct	n.a.
#8	Thoracic effusion	Sarcoma, metastatising	Post mortem	Necropsy	No Ct	No Ct	n.a.
#9	Neurologic signs, icterus	Hepatoencephalopathy due to severe hepatolipidosis	Post mortem	Necropsy	No Ct	No Ct	n.a.
#10	Ascites	Urine leakage in association with obstructive feline lower urinary tract disease	Ante-mortem	History, physical examination	No Ct	No Ct	n.a.
#11	Fever <sup>d</sup>	Fever of unknown origin, self limiting after 3 days	Survival time $\geq 1$ year, ante-mortem	Physical examination	No Ct	No Ct	n.a.
#12	Thoracic effusion, ascites	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	No Ct	No Ct	No Ct
#13	Thoracic effusion, ascites	Malignant round cell tumor	Ante-mortem	Cytology	No Ct	n.a.	No Ct
#14	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	No Ct	n.a.	No Ct
#15	Ascites	Pancreatitis	Survival time $\geq 1$ year,	Ultrasonography	No Ct	n.a.	n.a.

ante mortem						
#16	Thoracic effusion, ascites	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	No Ct	No Ct
#17	Ascites	Aneurysm of the portal vein with thrombus formation leading to portal hypertension	Survival time $\geq 1$ year, ante-mortem	Ultrasonography	n.a.	No Ct
#18	Thoracic effusion, ascites	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	No Ct
#19	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	No Ct
#20	Thoracic effusion	Carcinoma	Ante-mortem	Cytology	n.a.	No Ct
#21	Icterus	Hepatolipidosis	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.
#22	Ascites	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	No Ct
#23	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	n.a.
#24	Thoracic effusion, ascites	Carcinoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.
#25	Ascites	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.
#26	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	n.a.
#27	Icterus	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.
#28	Ascites, neurologic signs	Acute kidney injury, likely vasculitis	Survival time $\geq 1$ year, ante-mortem	History, biochemistry, ultrasonography	n.a.	n.a.
#29	Ascites	Eosinophilic enteritis, protein-losing enteropathy, likely transudat due to low oncotic pressure	Survival time $\geq 1$ year, ante-mortem	Enteroscopy, history	n.a.	n.a.
#30	Thoracic effusion	Carcinoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	No Ct
#31	Ascites, fever	Neutrophilic peritonitis, likely bacterial	Survival time $\geq 1$ year, ante-mortem	Histology	n.a.	No Ct
#32	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	No Ct

#33	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	n.a.	No Ct
#34	Thoracic effusion	End stage kidney disease, likely hypervolaemia	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct
#35	Thoracic effusion	Lymphoma	Ante-mortem	Cytology	n.a.	n.a.	No Ct
#36	Thoracic effusion	Chronic thoracic chylous effusion of unknown origin and secondary fibroplastic pleuritis	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct
#37	Thoracic effusion, ascites, neurologic signs	Lymphoma	Ante-mortem	Cytology	n.a.	n.a.	No Ct
#38	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	n.a.	No Ct
#39	Ascites, neurologic signs	Bacterial peritonitis	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct
#40	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	n.a.	No Ct
#41	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	n.a.	No Ct
#42	Thoracic effusion, ascites	Carcinoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct
#43	Thoracic effusion, ascites	Bacterial pleuritis	Ante-mortem	Cytology, bacterial culture of effusion	n.a.	n.a.	No Ct
#44	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	n.a.	n.a.	No Ct
#45	Thoracic effusion	Carcinoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct
#46	Thoracic effusion, fever, neurologic signs	Pulmonary fibrosis with thoracic effusion	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct
#47	Ascites	Carcinoma	Ante-mortem	Cytology	n.a.	n.a.	No Ct
#48	Ascites	Carcinoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct
#49	Thoracic effusion, ascites	Carcinoma	Post mortem	Necropsy	n.a.	n.a.	No Ct

<sup>a</sup> Ct, threshold cycle

<sup>b</sup> PBMC, peripheral blood mononuclear cells

<sup>c</sup> n.a., not available

<sup>d</sup> Fever with  $\leq 20,000$  white blood cells/ $\mu\text{L}$  and  $\leq 1,000$  banded neutrophils/ $\mu\text{L}$

**Table 3.** Results of the real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), serum, and body cavity effusion.

Number of samples	PBMC <sup>a</sup>	Serum	Body cavity effusion
Positive	6	4	32
True positive	6	4	32
False positive	0	0	0
Negative	31	47	37
True negative	16	25	33
False negative	15	22	4
Total	37	51	69

<sup>a</sup> PBMC, peripheral blood mononuclear cells

**Table 4.** Sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV), and negative predictive values (NPV) of the real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), serum, and body cavity effusion to diagnose feline infectious peritonitis (FIP) and the prevalence of FIP.

	Real time RT-PCR <sup>a</sup> PBMC <sup>b</sup>	Real time RT-PCR Serum	Real time RT-PCR body cavity effusion
Sensitivity (%)	28.6	15.4	88.9
(95% CI) <sup>c</sup>	(11.3–52.2)	(4.4–34.9)	(73.9–96.9)
Specificity (%)	100.0	100.0	100.0
(95% CI)	(79.4–100.0)	(86.3–100.0)	(89.4–100.0)
PPV <sup>d</sup> (%)	100.0	100.0	100.0
(95% CI)	(54.1–100.0)	(39.8–100.0)	(89.1–100.0)
NPV <sup>e</sup> (%)	51.6	53.2	89.2
(95% CI)	(33.1–69.9)	(38.1–67.9)	(87.2–97.0)
Prevalence (%)	56.8	51.0	52.2

<sup>a</sup> real time RT-PCR, real time reverse transcriptase polymerase chain reaction

<sup>b</sup> PBMC, peripheral blood mononuclear cells

<sup>c</sup> 95% CI, 95% Confidence interval

<sup>d</sup> PPV, positive predictive value

<sup>e</sup> NPV, negative predictive value

**IV. STUDIE II:****DETECTION OF FELINE CORONAVIRUS IN  
CEREBROSPINAL FLUID FOR DIAGNOSIS OF FELINE  
INFECTIOUS PERITONITIS IN CATS WITH AND WITHOUT  
NEUROLOGIC SIGNS**

Stephanie Doenges<sup>1</sup>

Karin Weber<sup>1</sup>, Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Roswitha Dorsch<sup>1</sup>, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA

Robert Fux<sup>2</sup>, Dr. med. vet.

Andrea Fischer<sup>1</sup>, apl.-Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVN,  
Dipl. ACVIM

Lara Matiasek<sup>1</sup>, Dr. med. vet., Dipl. ECVN, MRCVS

Kaspar Matiasek<sup>3</sup>, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVN, MRCVS

Katrin Hartmann<sup>1</sup>, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

<sup>1</sup> Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

<sup>2</sup> Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, LMU University of Munich,  
Germany

<sup>3</sup> Institute of Veterinary Pathology, LMU University of Munich, Germany

**Journal of Feline Medicine and Surgery**, 1098612X15574757,  
first published on March 3, 2015





# 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*  
1–6

© ISFM and AAFP 2015

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1098612X15574757

jfms.com



Stephanie J Doenges<sup>1</sup>, Karin Weber<sup>1</sup>, Roswitha Dorsch<sup>1</sup>, Robert Fux<sup>2</sup>, Andrea Fischer<sup>1</sup>, Lara A Matiasek<sup>1</sup>, Kaspar Matiasek<sup>3</sup> and Katrin Hartmann<sup>1</sup>

## Abstract

**Objectives** The objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) detecting feline coronavirus (FCoV) RNA in cerebrospinal fluid (CSF) of cats with and without neurological and/or ocular signs for the diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP).

**Methods** This prospective case-control study included 34 cats. Nineteen cats had a definitive histopathological diagnosis of FIP (seven of these with neurological and/or ocular signs), and 15 cats had other diseases but similar clinical signs (three of these with neurological and/or ocular signs). Real-time RT-PCR was performed on the CSF of all cats, and sensitivity, specificity, and positive (PPV) and negative predictive values (NPV) were calculated.

**Results** Real-time RT-PCR of CSF showed a specificity of 100% in diagnosing FIP, a sensitivity of 42.1%, a PPV of 100% and an NPV of 57.7%. The sensitivity of the real-time RT-PCR of CSF in cats with neurological and/or ocular signs was 85.7%.

**Conclusions and relevance** Although it is known that RT-PCR can give false positive results, especially if performed using serum or plasma, this real-time RT-PCR detecting FCoV RNA in CSF can be considered as a reliable specific tool for the diagnosis of FIP. If only cats with neurological involvement are evaluated, the sensitivity of this real-time RT-PCR in CSF is also high.

**Accepted:** 23 January 2015

## Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) is a globally occurring fatal disease caused by feline coronaviruses (FCoVs).<sup>1</sup> FCoV infection is common among cats, particularly in catteries, in which up to 100% of cats are infected, but only approximately 5–10% develop FIP.<sup>2–4</sup> In these cats, FIP is caused by mutation of the generally harmless FCoV, which is sometimes also called feline enteric coronavirus (FECV).<sup>5–7</sup> When specific mutations occur, the virus can then effectively replicate in macrophages, which is considered the key event in the pathogenesis of FIP.<sup>7,8</sup> The virus replicating in macrophages is sometimes called feline infectious peritonitis virus (FIPV). However, it is important to realise that FECV and FIPV are only two biotypes that are almost identical in their genome and thus cannot be differentiated by routine reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Among all cats with FIP, approximately 10% develop

neurological signs,<sup>9,10</sup> which occur as a result of virus-induced pyogranulomatous meningoencephalitis and

<sup>1</sup>Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Munich, Germany

<sup>2</sup>Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, LMU University of Munich, Munich, Germany

<sup>3</sup>Institute of Veterinary Pathology, LMU University of Munich, Munich, Germany

The results of this study were presented at the German Internal Medicine and Clinical Pathology Conference 2013 in Munich, Germany.

### Corresponding author:

Stephanie Doenges, Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Email: steffi@doenges.at

meningomyelitis.<sup>10,11</sup> Commonly reported neurological clinical signs are ataxia, seizures, nystagmus, hyperaesthesia and cranial nerve deficits.<sup>12–15</sup> Most often, a multifocal location is suggested, but, occasionally, focal signs can also occur.<sup>13,16</sup> Ocular manifestations consist predominantly of uveitis and chorioretinitis with associated fibrinous exudate in the anterior ocular chamber, which are common in neurological forms of FIP.<sup>11,17</sup>

The median survival time of cats with FIP is 9 days,<sup>18</sup> and the diagnosis of FIP usually leads to euthanasia. Therefore, a reliable diagnostic tool is needed to confirm the diagnosis. A definitive diagnosis of FIP remains challenging, especially if no effusion is present, and requires histological examination of biopsy specimens of affected organs,<sup>3</sup> but this approach is limited in cats with FIP restricted to the central nervous system (CNS). RT-PCR on blood samples is sometimes used to support a diagnosis of FIP; however, both sensitivity and specificity are too low to allow a definitive diagnosis or to rule out FIP.<sup>3,19,20</sup> So far, there has been only one study that looked

into the diagnostic value of RT-PCR detecting FCoV in cerebrospinal fluid (CSF).<sup>15</sup>

The aim of the present study was to determine sensitivity and specificity of a real-time RT-PCR in CSF to diagnose FIP in cats with and without neurological and/or ocular signs, comparing cats with confirmed FIP with control cats with clinical signs similar to FIP but other confirmed diagnoses.

## Materials and methods

### Animals

This study was designed as a case-control study, and included 34 cats. The cats were presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine, LMU University of Munich, Germany (n = 28), or to private veterinarians (n = 6). The FIP group (n = 19) consisted of animals with a definitive diagnosis of FIP (Table 1). FIP diagnosis was established in all 19 cats by post-mortem examination, including full body necropsy with histopathological examination. FIP diagnosis was confirmed by typical

**Table 1** Cats with feline infectious peritonitis (FIP), clinical signs, method of confirmation of the diagnosis of FIP, presence of neurological and/or ocular signs, and threshold cycle (Ct) values of the tested cerebrospinal fluid (CSF) sample

Cat	Signs for inclusion	Diagnosis	Confirmation	Method of confirmation	Neurological and/or ocular signs	Ct values CSF
1	Thoracic effusion, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	Seizures	No Ct
2	Thoracic effusion, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	–	36.1 (positive)
3	Thoracic effusion	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
4	Ascites, icterus, neurological signs	FIP	Post mortem	Histopathology	Seizures	32.1 (positive)
5	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
6	Thoracic effusion	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
7	Ascites	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
8	Thoracic and pericardial effusions	FIP	Post mortem	Histopathology	–	31.7 (positive)
9	Ascites, neurological signs	FIP	Post mortem	Histopathology	Paresis, ataxia, anisocoria, inability to control urination and defecation	32.6 (positive)
10	Ascites, fever, icterus, neurological and ocular signs	FIP	Post mortem	Histopathology	Paresis, uveitis	32.0 (positive)
11	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
12	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
13	Ascites, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
14	Thoracic effusion and ascites, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
15	Fever, icterus, neurological signs	FIP	Post mortem	Histopathology	Ataxia	26.5 (positive)
16	Fever, ocular signs	FIP	Post mortem	Histopathology	Uveitis	32.0 (positive)
17	Thoracic effusion, fever, ocular signs	FIP	Post mortem	Histopathology	Uveitis	29.9 (positive)
18	Thoracic effusion and ascites, fever	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct
19	Ascites, fever, icterus	FIP	Post mortem	Histopathology	–	No Ct

**Table 2** Cats in the control group with signs for inclusion, confirmed diseases, method of confirmation, presence of neurological and/or ocular signs, and the threshold cycle (Ct) values of the tested cerebrospinal fluid (CSF) sample

Cat	Signs for inclusion	Diagnosis	Confirmation	Method of confirmation	Neurological and/or ocular signs	Ct values CSF
1	Thoracic effusion	Lymphoma	Ante-mortem	Cytology	–	No Ct
2	Ascites	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
3	Ascites	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
4	Thoracic effusion	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
5	Ascites	Neoplasia close to the liver, probably adenocarcinoma of the biliary tract	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
6	Thoracic effusion	Adenocarcinoma, lung	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
7	Thoracic effusion	Bronchial carcinoma, metastasising	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
8	Thoracic effusion	Sarcoma, metastasising	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
9	Thoracic effusion	Decompensated cardiac disease	Ante-mortem	Echocardiography	–	No Ct
10	Thoracic effusion, fever, neurological signs	Pulmonary fibrosis with thoracic effusion	Post mortem	Necropsy	Ataxia	No Ct
11	Thoracic effusion	Chylothorax with fibroplastic pleuritis	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
12	Icterus	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
13	Icterus	Lymphoma	Post mortem	Necropsy	–	No Ct
14	Neurological signs	Lymphoma, mild encephalomyelitis, high-grade cellulitis, fasciitis, myositis (interstitially) in the lumbar part of the spine	Post mortem	Necropsy	Ataxia, paralysis of the tail, inability to control urination and defaecation	No Ct
15	Neurological signs, icterus	Hepatoencephalopathy due to severe hepatolipidosis	Post mortem	Necropsy	Status epilepticus	No Ct

morphology (surface-bound multisystemic pyogranulomatous and fibrinonecrotic disease with venulitis with or without high-protein exudate). In the control group (n = 15), cats for which FIP was considered as a differential diagnosis because of 'FIP typical' clinical signs were included. Cats with one or more of the following clinical signs were included: effusion (n = 11), a rectal temperature of  $\geq 40^{\circ}\text{C}$  (with  $\leq 20,000$  white blood cells/ $\mu\text{l}$  and  $\leq 1000$  banded neutrophils/ $\mu\text{l}$ ; n = 1), icterus (n = 3) or neurological signs (n = 3). Cats were only included in the control group if they were definitively diagnosed with diseases other than FIP that explained the clinical signs. These other diseases were confirmed either at necropsy (n = 13) or ante-mortem (n = 2). One of the two cats diagnosed ante-mortem had effusion caused by

lymphoma, which was confirmed by cytological examination of thoracic effusion and fine-needle aspiration of lymph nodes. The other cat had thoracic effusions caused by a decompensated cardiac disease confirmed by echocardiography (Table 2).

Of the 19 cats with FIP, seven had neurological (n = 5) and/or ocular (n = 3) signs (Table 1). Of the 15 cats with other diseases, three had neurological (n = 3) and/or ocular (n = 0) signs (Table 2).

#### Samples

CSF was collected immediately after cats were euthanased with a 19 G needle from the cerebellomedullary cistern. Cell-free CSF was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in a 1.5 ml Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tube.

**Table 3** Results of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) of cerebrospinal fluid of all cats with feline infectious peritonitis (FIP) and of all cats with other diseases, and of cats with FIP and other diseases with and without neurological and ocular involvement

	Real-time RT-PCR positive	Real-time RT-PCR negative	Total
<b>Cats with FIP (n = 19)</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>19</b>
Cats with neurological and/or ocular signs (n = 7)	6	1	7
Cats without neurological and without ocular signs (n = 12)	2*	10	12
<b>Cats with other diseases (n = 15)</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
Cats with neurological and/or ocular signs (n = 3)	0	3	3
Cats without neurological and without ocular signs (n = 12)	0	12	12
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>26</b>	<b>34</b>

\*Post-mortem examination identified microscopic involvement of the central nervous system in one of these cats

**Table 4** Sensitivity, specificity, and positive (PPV) and negative predictive values (NPV) of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in cerebrospinal fluid to diagnose feline infectious peritonitis (FIP) and the prevalence of FIP

	All cats (n = 34)	Cats with neurological and/or ocular signs (n = 10)
Sensitivity	42.1 (20.3–66.5)	85.7 (42.1–99.6)
Specificity	100.0 (78.2–100.0)	100.0 (29.2–100.0)
PPV	100.0 (63.1–100.0)	100.0 (54.1–100.0)
NPV	57.7 (36.9–76.7)	75.0 (19.4–99.4)
Prevalence (%)	55.9	70.0

Values are given as % (95% confidence interval) unless otherwise indicated

#### RNA extraction

Viral RNA was isolated from cell-free CSF using a QIAamp Viral Mini RNA Kit (Qiagen). Briefly, 140 µl aliquots of samples were lysed under highly denaturing conditions to inactivate RNases and isolate the intact viral RNA. Adjusted buffering conditions yielded an optimal binding of the viral RNA on the silica membrane of the QIAamp Mini spin column. After being washed with two wash buffers, the RNA was eluted with 60 µl of RNase-free buffer and stored at –80°C.

#### Real-time RT-PCR

The detection of FCoV was performed using a real-time RT-PCR.<sup>21</sup> A QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) was used for this one-step real-time RT-PCR. Five microlitres of RNA template was added to 12.5 µl Master Mix, 0.25 µl RT Mix, 5.25 µl RNase-free water and 2 µl primer probe mix. All primers were used in a concentration of 0.8 µM, and 5'FAM/3'BHQ-1 labelled TaqMan probes were used in a concentration of 0.3 µM. The following temperature profile was chosen: reverse transcription at 50°C for 30 mins, reverse transcriptase inactivation and polymerase activation at 95°C for 15 mins, 42 cycles of denaturation for 30 s at 95°C, and annealing and elongation for 60 s at 60°C. A Stratagene Mx3005P (Thermo Scientific) was used for the fluorescence measurement.

#### Data analyses

The sensitivity and specificity, as well as the positive (PPV) and negative predictive values (NPV), were calculated for the whole group, as well as only for cats with neurological and/or ocular signs. Ninety-five percent confidence intervals were determined. Data analyses were performed using a two-sided Fisher's exact test with GraphPad Prism Version 5.0 and a significance threshold of 0.05.

#### Results

Results of the real-time RT-PCR in cats with neurological and/or ocular signs, and all cats are shown in Table 3. Threshold cycle (Ct) values of all real-time RT-PCR results are shown in Tables 1 and 2. Sensitivity, specificity, and PPV and NPV of real-time RT-PCR of CSF are shown in Table 4. None of the specimens were false positive in the real-time RT-PCR of CSF, leading to a specificity of 100%. Sensitivity was only 42.1% when looking at all cats, but was better when the results of only cats with neurological and/or ocular signs were evaluated (Table 4).

#### Discussion

The purpose of this study was to determine sensitivity and specificity of a real-time RT-PCR on CSF samples in order to assess the diagnostic feasibility of this method for the ante-mortem diagnosis of FIP.

FCoV can be detected in the CSF if the virus replicates in CSF macrophages in cats with FIP with neurological involvement, or if a spillover of infected blood monocytes occurred during the disease or the tap. The entry route for FCoV into the CSF is unknown but the virus probably trespasses the blood–brain barrier (BBB) cell-bound within macrophages. As in other parts of the body, macrophages also resemble the principal target cells for FCoV in the CNS.<sup>17</sup> The other possibility for the presence of FCoV in the CNS, and therefore in CSF, is a non-targeted way through an impaired BBB or blood–CSF barrier that could be disrupted non-specifically during virtually any inflammation of the CNS.<sup>22</sup> Generally, in inflammatory states involving the CNS, mononuclear cells can enter both by opened tight junctions between endothelial cells and via diapedesis through endothelial cells.<sup>23–26</sup> Even if not specifically investigated in FIP, the brain endothelium produces inflammatory mediators, adhesion molecules and matrix metalloproteinases, which lead to a disruption of the tight junction complex allowing particles to cross the barriers.<sup>22</sup>

The specificity of the real-time RT-PCR in CSF in this study was 100%. While RT-PCR is commonly used in serum and plasma for the diagnosis of FIP, it is not a reliable tool for confirmation because specificities range only between 20% and 90%.<sup>3,19,27–29</sup> False positive RT-PCR results in serum and plasma can be caused by the fact that intestinal infection with harmless FCoV is accompanied by viraemia.<sup>30,31</sup> Recent studies determined mutations in different parts of the FCoV genome.<sup>32,33</sup> Detecting mutations in the putative fusion peptide of the spike protein of FCoV seems to be a more reliable tool for the diagnosis of FIP,<sup>32</sup> but large studies confirming specificity are still missing. The reason for the high specificity of the real-time RT-PCR used in the present study, which did not specifically detect the mutated virus, can be explained by an absence of FCoV in CSF if no inflammation and an intact BBB are present, and FCoV is not produced within the CNS. The presence of viral RNA therefore seems to be more reliable in diagnosing FIP than the presence of antibodies; in a previous study anti-coronavirus antibodies were detected in CSF of cats with FIP without neurological involvement, but also in the CSF of cats with neurological diseases other than FIP.<sup>34</sup> In this previous study it was postulated that the anti-coronavirus antibodies were derived from antibody-containing blood and did not necessarily indicate intrathecal antibody production and the presence of FCoV in the CNS. As many cats are FCoV antibody-positive in blood,<sup>2,35</sup> antibodies can easily cross the BBB in cats with any disruption of the BBB due to various diseases that impair the BBB or CSF flow. Thus, a method, like RT-PCR, detecting the pathogen itself instead of antibodies in CSF seems to be more specific. The results of the present study are in accordance with the only previous study that investigated RT-PCR in CSF. In this previous study, similar to the present one, only three cats with neurological disease other than FIP were

investigated,<sup>15</sup> but the present study included a large number of non-neurological controls.

While the real-time RT-PCR in CSF in this study showed an excellent specificity, sensitivity was not as high (42.1%). Failure to detect FCoV in CSF in this real-time RT-PCR was most likely caused by the absence of CNS inflammation and FCoV-infected macrophages in the CSF. In the cats with neurological signs in which FCoV was detected in the CSF, Ct values were relatively high (mean Ct 30.8; range 26.5–32.6). This indicates that the FCoV numbers were relatively low, even if the CNS is involved. Nevertheless, the sensitivity of real-time RT-PCR in CSF, even when looking at all cats (with and without neurological involvement), was even higher in the present study than in a previous study with a sensitivity of 31% in cats with neurological involvement.<sup>15</sup>

In the present study, two cats with FIP with ocular but without neurological signs had detectable virus. As ocular signs often co-occur with neurological FIP,<sup>11,17</sup> these two cats could have had the beginning of neurological involvement, without clinical signs and pathological lesions. As the CNS and eyes are in close proximity to each other, a spillover of infected monocytes into CSF or monocyte homing might also be possible. Another two cats with FIP but without clinically obvious neurological or ocular signs had positive results in real-time RT-PCR in CSF. In one of these two cats, histological examination of the brain showed inflammatory infiltration with macrophages, granulocytes, plasma cells and lymphocytes, as well as necrotic lesions, which were obviously too mild to cause clinical signs. In the other cat, no visible gross or histological lesions were found in the CNS. However, it might be that this cat also had the beginnings of neurological involvement of FIP without visible changes of tissue.

One limitation of this study was the relatively low sample size, especially of cats with neurological and/or ocular involvement. Another limitation was the assignment of cats to the control group. Cats were assigned to the control group if a disease other than FIP was confirmed that explained the observed signs. There is a low probability that a cat in the control group suffered from both another disease as well as FIP; however, this situation was not likely as 13/15 cats were examined at necropsy and no false positive real-time RT-PCR result was observed in the present study.

## Conclusions

This study evaluated the sensitivity and specificity of a real-time RT-PCR detecting FCoV in CSF to diagnose FIP in cats with and without neurological involvement. The study found an excellent specificity, indicating that real-time RT-PCR in CSF is a reliable tool for diagnosing FIP. The sensitivity of this approach was fairly high, at least in cats with neurological and/or ocular signs, making this an interesting tool for the diagnosis of neurological FIP.

**Conflict of interest** The authors do not have any potential conflicts of interest to declare.

**Funding** This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

## References

- Pedersen NC. Coronavirus diseases (coronavirus enteritis, feline infectious peritonitis). In: Holzworth J (ed). Diseases of the cat medicine and surgery. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1987, pp 193–214.
- Addie DD and Jarrett O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec* 1992; 130: 133–137.
- 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.
- Pedersen NC. An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Feline Pract* 1995; 23: 7–20.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dewerchin HL, Cornelissen E and Nauwynck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol* 2005; 150: 2483–2500.
- Rohrer C, Suter PF and Lutz H. The diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP): a retrospective and prospective study. *Kleintierpraxis* 1993; 38: 379.
- Kline KL, Joseph RJ and Averill DR. Feline infectious peritonitis with neurologic involvement: clinical and pathological findings in 24 cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1994; 30: 111–118.
- Slauson DO and Finn JP. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 160: 729–734.
- Marioni-Henry K, Vite CH, Newton AL, et al. Prevalence of diseases of the spinal cord of cats. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 851–858.
- Timmann D, Cizinauskas S, Tomek A, et al. Retrospective analysis of seizures associated with feline infectious peritonitis in cats. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 9–15.
- Barnes HL, Chrisman CL, Mariani CL, et al. Clinical signs, underlying cause, and outcome in cats with seizures: 17 cases (1997–2002). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 1723–1726.
- Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, et al. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 415–423.
- Diaz JV and Poma R. Diagnosis and clinical signs of feline infectious peritonitis in the central nervous system. *Can Vet J* 2009; 50: 1091–1093.
- Foley JE and Leutenegger C. A review of coronavirus infection in the central nervous system of cats and mice. *J Vet Intern Med* 2001; 15: 438–444.
- Ritz S, Egberink H and 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: 1193–1197.
- 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.
- Herrewegh AA, Mahler M, Hedrich HJ, et al. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology* 1997; 234: 349–363.
- Dye C, Helps CR and Siddell SG. Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 167–174.
- Webb AA and Muir GD. The blood–brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 399–411.
- Engelhardt B and Wolburg H. Mini-review: transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 2004; 34: 2955–2963.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K and Engelhardt B. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 181–190.
- Konsman JP, Drukarch B and Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 1–25.
- Bolton SJ, Anthony DC and Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood–brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 1998; 86: 1245–1257.
- Can-Sahna K, Soydal Ataseven V, Pinar D, et al. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 369–372.
- 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.
- Egberink HF, Herrewegh AP, Schuurman NM, et al. FIP, easy to diagnose? *Vet Q* 1995; 17: 24–25.
- Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, et al. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol* 2010; 91: 1698–1707.
- Vogel L, Van der Lubben M, te Lintelo EG, et al. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Vet Res* 2010; 41: 71.
- Chang HW, Egberink HF, Halpin R, et al. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1089–1095.
- Licitra BN, Millet JK, Regan AD, et al. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1066–1073.
- Boettcher IC, Steinberg T, Matiasek K, et al. 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.
- Horzinek MC and Osterhaus AD. Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey. *Am J Vet Res* 1979; 40: 1487–1492.

## V. DISKUSSION

Die Diagnose von FIP stellt immer noch eine Herausforderung dar. Auch wenn viele Parameter wie klinische Präsentation, Alter des Patienten, Blutbild, Serumchemie sowie Ergussdiagnostik oft stark auf FIP hinweisen, ist eine definitive Diagnose für die Entscheidung zur Einleitung der nächsten Schritte dieser bisher unheilbaren Krankheit unerlässlich. Der Goldstandard zur Diagnosestellung setzt invasive Eingriffe voraus, denn für die histologische und immunhistochemische Untersuchung sind Organbiopsien notwendig (TAMMER et al., 1995; GIORI et al., 2011). Auch wenn in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Krankheit gewonnen wurden und bestätigt wurde, dass Mutationen eine entscheidende Rolle spielen, weiß man bisher noch nicht, inwieweit diese Mutationen mit der Immunpathogenese von FIP zusammenhängen (PEDERSEN, 2014a). Die RT-PCR stellt zwar eine wenig invasive, aber relativ unspezifische Methode zur Diagnose von FIP dar, da sie sowohl pathogene als auch apathogene Viren nachweist. Diese Arbeit untersuchte Sensitivität und Spezifität einer real-time RT-PCR in verschiedenen Körperflüssigkeiten zur Diagnose von FIP und stützte sich dabei auf Katzen mit nachgewiesener FIP und Katzen mit FIP-ähnlichen Symptomen, bei denen eine andere Krankheit definitiv diagnostiziert wurde.

FCoV wurde mittels RT-PCR in PBMC bei sechs von 21 Katzen mit FIP nachgewiesen. Die Sensitivität von 29 % ist damit im Vergleich zur Mehrzahl der in der Literatur angegebenen Studien gering. Die Ct-Werte der real-time RT-PCR in PBMC waren, wie auch in den anderen untersuchten Körperflüssigkeiten, verhältnismäßig hoch (26,6 – 34,6). Diese hohen Ct-Werte weisen auf eine geringe Virusmenge hin. Die virale RNA ist in der Umwelt relativ fragil, und RNasen, die für die Degradation der RNA verantwortlich sind, kommen ubiquitär und v. a. in entzündlichen Exsudaten vor (ADDIE & JARRETT, 2001; BUSTIN & NOLAN, 2004). Daher könnten die Lagerungsbedingungen der Proben vor der Durchführung der real-time RT-PCR einen Einfluss auf die Sensitivität gehabt haben. Zu den Transport- und Lagerungsbedingungen der Proben ist in den früheren Studien meist nichts angegeben. Allerdings stammten die Blutproben z. B. der Studie von Simons und Mitarbeitern (2005), die FCoV mittels mRNA RT-PCR mit einer hohen Sensitivität (94,6 %) erkannten, aus verschiedenen

Tierkliniken in den Niederlanden (SIMONS et al., 2005). Man kann also davon ausgehen, dass die Proben nach der Probenentnahme zunächst eine gewisse Zeit transportiert wurden, bevor sie bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Im Gegensatz dazu stammte in der vorliegenden Arbeit lediglich das Probenmaterial von zehn Katzen von anderen Tierärzten. Die übrigen 33 Katzen waren Patienten der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, deren Proben vor Ort verarbeitet wurden. Sie wurden entweder direkt oder, in seltenen Fällen, nach spätestens 24 Stunden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und erst zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion wieder aufgetaut. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren hat hingegen einen negativen Effekt auf die Sensitivität der RT-PCR (FEHR et al., 1996). Lagerungsbedingungen als Ursache für die niedrige Sensitivität können in der vorliegenden Arbeit daher vernachlässigt werden.

Weitere Gründe für die niedrige Sensitivität könnten eine inadäquate RNA-Extraktion oder das Vorkommen von PCR-Inhibitoren sein. PCR-Inhibitoren kommen v. a. im Kot vor, aber auch Hämoglobin kann eine PCR inhibieren (BUSTIN & NOLAN, 2004; RADSTROM et al., 2004).  $\beta$ -Aktin wurde in dieser Arbeit als interne Kontrolle und Extraktionskontrolle nach einem Protokoll von Toussaint und Mitarbeitern (2007) verwendet (TOUSSAINT et al., 2007). Außerdem wurde der Erguss mit den gleichen Methoden und unter gleichen Bedingungen behandelt wie PBMC und Serum. Im Erguss wurde hingegen eine hohe Sensitivität (89 %) bestimmt, sodass man von einer adäquaten RNA-Extraktion ausgehen kann.

Aufgrund der hohen Genomdiversität der Coronaviren ist es möglich, dass Viren teilweise nicht erkannt werden, weil die Primer nur an eine ganz bestimmte Nukleotidsequenz des zu amplifizierenden Bereiches binden können. So werden nur bestimmte FCoV-Varianten erkannt. Die Primersequenzen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, umfassten den Bereich zwischen Nukleokapsid- und Membran-Gen (DYE et al., 2008), der bei den meisten FCoV gut konserviert ist (JOUVENNE et al., 1990; TOBLER et al., 1993). Trotzdem ist es möglich, dass FCoV-Varianten mit Nukleotidabweichungen in diesem Bereich nicht erkannt wurden.

Des Weiteren ist es möglich, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Blut der Katzen mit FIP kein Virus enthalten war. Diese Theorie stützt eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der bei 20 Katzen, die mit virulentem FCoV infiziert



wurden und von denen alle bis auf eine Katze an FIP verstarben, kein Virus im Blut (zumindest über der Nachweisgrenze des Tests) gefunden wurde. In jener Studie werteten die Autoren aber nur Ct-Werte  $\leq 37$  in der real-time RT-PCR als positiv, da sie bei SPF-Katzen, die keinen Kontakt zu FCoV hatten, Ct-Werte ab 37 nachwiesen. Die Autoren hielten die Verlässlichkeit früherer RT-qPCR-Ansätze für fraglich. Sie postulierten, dass die Virämie bei experimentell induzierter FIP entweder nicht vorhanden sei oder jenseits verlässlicher Nachweisgrenzen läge und der Virusnachweis daher besser in Erguss und Gewebe durchgeführt werden solle. Denn sie wiesen mit der gleichen real-time RT-PCR hohe Mengen an Virus in verändertem Gewebe und Erguss nach (PEDERSEN et al., 2015). De Groot-Mijnes und Mitarbeiter (2005) konnten eine Virämie bei Katzen mit experimentell induzierter FIP zwar bestätigen, jedoch waren die Virusmengen relativ gering, und eine Virämie war nur zu bestimmten Zeiten, vorwiegend zu Beginn und am Ende des Krankheitsverlaufes, nachzuweisen (DE GROOT-MIJNES et al., 2005). Allerdings handelt es sich hier um zwei experimentelle Studien, die nur bedingt mit einer natürlich auftretenden FIP vergleichbar sind. Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass die Virämie bei einer natürlich erworbenen FIP transient oder zumindest intermittierend ist und nicht permanent besteht. Somit kann FCoV auch nicht zu jedem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Dies alles erklärt die niedrige Sensitivität.

Im Serum wurde FCoV bei vier von 26 Katzen mit FIP nachgewiesen. Die Sensitivität im Serum war mit 15 % noch deutlich niedriger als in PBMC. Dies ist nicht ungewöhnlich, da die Zielzellen des Virus Makrophagen sind und FCoV sich nur intrazellulär vermehrt (WEISS & SCOTT, 1981; STODDART & SCOTT, 1989). So kann FCoV eher in zellhaltigen Proben als im zellfreien Überstand nachgewiesen werden (PEDERSEN et al., 2015). Frühere Studien gaben eine bessere Sensitivität im Plasma als im Serum an (HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998). Möglicherweise hätte die Verwendung von Plasma zu einer höheren Sensitivität geführt. Da auch Hartmann und Mitarbeiter (2003) Serum zum Virusnachweis verwendeten (HARTMANN et al., 2003) und Serumproben schnell und einfach bis zur Durchführung der RT-PCR asserviert werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit neben PBMC auch Serum für die real-time RT-PCR genutzt. Auch waren die Ct-Werte im Serum tendenziell höher als in PBMC (37,1 - 41,7), was auf eine geringere Virusmenge hinweist.

Außerdem konnte bei zwei Katzen FCoV in PBMC nachgewiesen werden, im Serum jedoch nicht. Daher sollte für die Diagnose von FIP aus Blut in Zukunft unbedingt zellhaltiges Probenmaterial verwendet werden.

Eine hohe Sensitivität von 89 % hatte dagegen die real-time RT-PCR im Thoraxerguss und Ascites von Katzen mit FIP. Hier wurden 32 von 36 FIP-Katzen richtig positiv erkannt. Die im Gegensatz zu PBMC und Serum hohe Sensitivität lässt sich dadurch erklären, dass der Erguss im engen Kontakt zu den pyogranulomatösen Veränderungen und der Serosa steht, die viel Virus enthalten (PEDERSEN, 2009). Eine Studie von Dean und Mitarbeitern (2003) konnte FCoV-RNA in den Lymphgeweben der Körperhöhlen, wie Mediastinal- und Mesenteriallymphknoten, Milz und Thymus bei 75 % der untersuchten Gewebeproben infizierter Katzen nachweisen, allerdings nur bei 27 % der untersuchten peripheren Lymphgewebeproben (DEAN et al., 2003). Auch Pedersen und Mitarbeiter (2015) fanden mittels real-time RT-PCR große Mengen an Virus im veränderten Netz, den Mesenteriallymphknoten und der Milz, wenig hingegen z. B. in den Popliteallymphknoten (PEDERSEN et al., 2015). Da gerade die Organe der Körperhöhlen bei FIP oft massiv von granulomatösen Veränderungen betroffen sind, ist ein Nachweis von Virus gerade in diesen Organen und entsprechend auch im Erguss leicht möglich. Auch frühere Studien wiesen FCoV im Erguss mit einer Sensitivität zwischen 91 % und 100 % nach, allerdings waren die Patientenzahlen in diesen älteren Studien teilweise gering (HERREWEGH et al., 1995a; GAMBLE et al., 1997; HARTMANN et al., 2003; TSAI et al., 2011). Eine neuere Studie von Soma und Mitarbeitern (2013) wies bei einer großen Anzahl an Katzen (854 Stück) FCoV mit einer Sensitivität von 44 % im Erguss nach. Bei diesen Katzen bestand allerdings lediglich der klinische Verdacht auf FIP ohne definitive Diagnose (SOMA et al., 2013), so dass die niedrige Sensitivität auch fälschlicherweise aufgrund einer gar nicht vorhandenen FIP bei den negativ getesteten Katzen zustande gekommen sein könnte. Zwei Studien, die mittels real-time RT-PCR FCoV nachwiesen, hatten im Erguss etwas niedrigere Sensitivitäten (69 % und 80 %) als in der vorliegenden Arbeit (HORNYAK et al., 2012; MELI et al., 2013). Möglicherweise waren jedoch auch hier nicht alle Katzen tatsächlich an FIP erkrankt, da nicht alle Katzen der Studien histopathologisch untersucht wurden.

Die Ct-Werte in dieser Studie waren auch im Erguss relativ hoch (25,8 – 39,8).

Die geringe Virusmenge könnte durch die zellfreien Ergussproben bedingt sein, die für die real time RT-PCR in der vorliegenden Studie verwendet wurden. Da im Überstand im Vergleich zu zellhaltigem Erguss 10- bis 100-mal weniger Virus enthalten ist (PEDERSEN et al., 2015), hätte zellhaltiger Erguss möglicherweise niedrigere Ct-Werte ergeben als der hier verwendete zellfreie Erguss.

Die Sensitivität der RT-PCR aus Liquor lag in dieser Arbeit bei 42 %. Bei acht von 19 Katzen mit FIP wurde FCoV im Liquor nachgewiesen. FCoV kann im Liquor erkannt werden, wenn es sich entweder im Zuge des Krankheitsgeschehens intrathekal, also direkt in den Makrophagen des ZNS, vermehrt oder wenn es aus dem Blut in den Liquor übertritt. Dieser Übertritt kann entweder während der Probenentnahme als Artefakt passieren oder durch eine krankheitsbedingt defekte BHS ermöglicht werden. Während eines Entzündungsgeschehens gelangen Leukozyten transendothelial, also via Diapedese durch Endothelzellen oder durch die durch Entzündung durchlässig gewordene Tight Junctions, ins ZNS (BOLTON et al., 1998; ENGELHARDT & WOLBURG, 2004; KONSMAN et al., 2007). Durch den Einfluss von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Metalloproteinasen wird die BHS geschädigt und der Eintritt von Leukozyten ermöglicht (WEBB & MUIR, 2000). Es ist nicht genau bekannt, wie FCoV bei FIP in das ZNS übertritt, aber das Virus gelangt vermutlich intrazellulär in den Makrophagen ins Gehirn. In der vorliegenden Arbeit konnte bei drei Katzen die Abwesenheit von FCoV im Blut nachgewiesen werden, während bei diesen Katzen FCoV mittels real-time RT-PCR im Liquor nachgewiesen werden konnte. Eine Katze war sowohl im Blut als auch im Liquor positiv. Bei den übrigen zwei Katzen, die im Liquor positiv waren, wurde kein Blut untersucht. Zumindest bei den Katzen, bei denen im Blut kein Virus nachgewiesen wurde, ist am ehesten von einer intrathekalen Replikation des Virus auszugehen und weniger von einer aus dem Blut stammenden Akkumulation von Virus im Liquor.

In einer früheren Studie von Foley und Mitarbeitern (1998) wurde bei 31 % der Katzen mit der neurologischen Form von FIP FCoV im Liquor nachgewiesen. Betrachtet man lediglich die Katzen mit neurologischen und/oder ophthalmologischen Symptomen (n = 7), ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine höhere Sensitivität von 86 %. Ophthalmologische Veränderungen kommen häufig in Zusammenhang mit der neurologischen Form von FIP vor (SLAUSON

& FINN, 1972; FOLEY & LEUTENEGGER, 2001). Durch die enge Nachbarschaft der beiden Organe ist ein Übertritt von infizierten Makrophagen vom Auge ins ZNS denkbar. Mit diesem Übertritt würde sich das positive Ergebnis im Liquor der beiden Katzen mit ausschließlich ophthalmologischer Beteiligung erklären lassen. Bei einer der beiden Katzen, die positiv in der real-time RT-PCR waren, aber keine neurologischen und/oder ophthalmologischen klinischen Symptome hatten, wurden histopathologische Veränderungen im ZNS festgestellt. Die andere Katze hatte keine histopathologischen Veränderungen. Möglicherweise hatte sie aber eine beginnende neurologische Form von FIP, die aber noch nicht im Gewebe sichtbar war. Auch wenn die Anzahl der untersuchten Katzen mit neurologischer FIP in dieser Arbeit niedrig war, wurde FCoV bei diesen Katzen im Liquor mittels real-time RT-PCR häufig erkannt. Die Ct-Werte in dieser Arbeit waren im Liquor verhältnismäßig hoch (26,5 – 36,1). Dies weist auf eine geringe Virusmenge hin, auch wenn das ZNS in das Krankheitsgeschehen involviert war. Eine höhere Virusmenge hätte wie im Erguss eventuell durch Verwendung von zellhaltigem Probenmaterial nachgewiesen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden PBMC, Serum, Erguss und Liquor von insgesamt 50 Katzen mit einer anderen definitiven Krankheit als FIP untersucht. In keiner der 89 untersuchten Proben wurde FCoV mittels real-time RT-PCR nachgewiesen. Die Spezifität lag daher in allen Materialien bei 100 %. Einen Grund für die hohe Spezifität stellt die Nutzung einer real-time RT-PCR im Gegensatz zu früher häufig genutzten konventionellen RT-PCRs dar. Die one-tube real-time RT-PCR hat den Vorteil, dass für das Durchführen der Arbeitsschritte nur ein Reaktionsgefäß je Probe benötigt wird und somit carry-over-Kontaminationen vermieden werden (MACKAY et al., 2002; BASTIEN et al., 2008).

In früheren Studien war die Spezifität oft niedrig, sodass bei Katzen ohne FIP fälschlicherweise trotzdem FCoV mittels real-time RT-PCR nachgewiesen wurde. Allerdings wurden in diesen Studien Katzen verwendet, die experimentell mit FCoV infiziert worden waren (MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden als Kontrollgruppe nur Katzen gewählt, die ähnliche klinische Symptome wie FIP aufwiesen, aber eine andere definitiv diagnostizierte Krankheit in der Sektion hatten. Zusätzliche wurden einige Katzen eingeschlossen, die nach Probenentnahme mindestens ein Jahr überlebten, da

Katzen mit FIP normalerweise nur Tage bis Wochen überleben (RITZ et al., 2007; FISCHER et al., 2011). Diese Studienpopulation imitiert daher die reale Situation in der Praxis, in der der Tierarzt ein verlässliches Mittel für die Diagnose von FIP braucht.

Die Spezifität von 100 % in PBMC (n = 16) und Serum (n = 25) ist im Vergleich zu anderen Studien ungewöhnlich hoch. Frühere Studien wiesen FCoV mit einer Spezifität von 62 % - 98 % nach, teilweise sogar nur mit einer Spezifität von 11 % (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; HERREWEGH et al., 1997; GUNN-MOORE et al., 1998). Jene Studien verwendeten Katzen aus Katzenzuchten, teilweise mit vorberichtlichen Fällen von FIP im Haushalt (GUNN-MOORE et al., 1998). In Mehrkatzenhaushalten und Katzenzuchten ist der Großteil der Katzen mit FCoV infiziert. V. a. wenn diese Katzen im Haus gehalten werden und sich durch gemeinsame Katzentouletten, aber auch durch den Kontakt mit Katzen aus anderen Zuchten infizieren und reinfizieren, steigt der Virusdruck in der Population (ADDIE, 2000; KISS et al., 2000; ADDIE et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit stammten lediglich fünf Katzen (von insgesamt 36 Katzen, zu denen es vorberichtlich Informationen zu den Haltungsbedingungen gab) aus Haushalten mit mehr als zwei Katzen. Deshalb kann man von einer deutlich geringen Anzahl von FCoV-Infektionen in dieser Population ausgehen.

Studien, deren Kontrollgruppe, wie in der vorliegenden Arbeit, aus Katzen mit anderen definitiv diagnostizierten Krankheiten bestand, hatten typischerweise eine höhere Spezifität von 88 % - 100 % (KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; SIMONS et al., 2005). Eine solche Studienpopulation spiegelt vielmehr die reale Situation in der Praxis dar, in welcher der Tierarzt FIP als Differentialdiagnose erwägt, als eine Population, die gesunde oder experimentell infizierte Katzen verwendet. Simons und Mitarbeiter (2005), die in einer großen Studiengruppe Katzen mit FIP und mit anderen Krankheiten untersuchten und FIP mit einer Spezifität von 100 % nachwiesen, verwendeten eine RT-PCR, welche mRNA und damit das sich replizierende Virus nachweist (SIMONS et al., 2005). Can-Sahna und Mitarbeiter (2007), die zwei Jahre später nur eine Spezifität von 48 % mit der gleichen RT-PCR bei gesunden Katzen ermittelten, verwendeten v. a. freilaufende, streunende Katzen. Warum die Spezifität in der letztgenannten Studie so gering war, erschloss sich auch den Autoren nicht. Sie vermuteten aber eine FCoV-Übertragung zwischen den Katzen, die zwar Freigänger waren, aber

gemeinsame Futter- und Kotplätze aufsuchten (CAN-SAHNA et al., 2007). So tragen offensichtlich unterschiedliche Studienpopulationen maßgeblich zur Spezifität einer Untersuchungsmethode bei. Daher ist es wichtig, für die jeweilige Fragestellung die richtige Studienpopulation zu wählen. So verwendete die vorliegende Arbeit als Kontrollkatzen Katzen mit ähnlichen Symptomen wie FIP für die Ermittlung der diagnostischen Brauchbarkeit der real-time RT-PCR.

In früheren Studien, in welchen Katzen experimentell mit harmlosen FCoV infiziert wurden, konnten bei den meisten Katzen FCoV im Blut und sogar in den Organen nachgewiesen werden, ohne dass diese Katzen an FIP erkrankten (MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010). Die Erkenntnisse von experimentellen Infektionsstudien können allerdings nur bedingt als Vergleich für die Diagnose der natürlich erworbenen FIP herangezogen werden. Sie weisen aber auf eine zumindest transiente Virämie nach FCoV-Infektion hin, unabhängig vom Entstehen einer FIP (MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit waren alle 33 Ergussproben von Katzen mit anderen Krankheiten als FIP negativ. Die Spezifität der RT-PCR im Erguss wurde in der Literatur nur bei wenigen Katzen untersucht (HERREWEGH et al., 1995a; HARTMANN et al., 2003). Eine Studie, die Katzen mit anderen definitiven Krankheiten als FIP untersuchte, fand nur bei einer Katze mit einem Sarkom FCoV im Erguss und hatte eine Spezifität von 91 % (GAMBLE et al., 1997).

Auch im Liquor war die Spezifität der RT-PCR der vorliegenden Arbeit 100 %. Liquor eignet sich offenbar gut zum Ausschluss der FIP. Bei Katzen ohne entzündliche Vorgänge im ZNS treten keine Makrophagen und darin enthaltenes intrazelluläres FCoV trans- oder parazellulär ins ZNS über (ABBOTT et al., 2010). Da in der vorliegenden Arbeit lediglich drei Katzen neurologische Symptome zeigten, kann man bei den übrigen zwölf der 15 Katzen davon ausgehen, dass diese eine intakte BHS hatten. Somit würde sich die hohe Spezifität auch durch den Einschluss vorwiegend nicht neurologischer Kontrollkatzen mit einer intakten BHS erklären lassen, und man könnte spekulieren, ob der Einschluss einer höheren Anzahl von neurologischen Kontrollkatzen mit einer gestörten BHS die Spezifität maßgeblich verändert hätte. Dies ist allerdings nicht relevant, da in dieser Arbeit auch kein FCoV im Blut nachgewiesen wurde. Somit hätte bei einer gestörten Funktion der BHS auch kein FCoV vom Blut in den Liquor übertreten können. Auch Foley und Mitarbeiter

(1998) wiesen bei keiner der drei Katzen ihrer Kontrollgruppe, welche neurologische Symptome hatten, FCoV im Liquor nach (FOLEY et al., 1998).

Im Gegensatz zur hohen Spezifität beim Nachweis von FCoV-RNA im Liquor scheint der Nachweis von FCoV-Antikörpern nicht spezifisch zu sein. Boettcher und Mitarbeiter (2007) konnten bei zwei Katzen mit Gehirntumor FCoV-Antikörper nachweisen. Ihrer Meinung nach stammten die Antikörper aus dem Blut und wurden nicht intrathekal produziert, da Katzen mit Antikörpern im Liquor immer auch hohe Serumantikörpertiter aufwiesen (BOETTCHER et al., 2007). So scheint der direkte Nachweis des Virus spezifischer zu sein als der Nachweis von Antikörpern.

Die Primer der real-time RT-PCR dieser Arbeit waren auf einen Bereich mit 171 Nukleotiden gerichtet, der einen Bereich zwischen N- und M-Gen umfasst (DYE et al., 2008). Dieser Bereich des Genoms ist bei FCoV gut konserviert (JOUVENNE et al., 1990; TOBLER et al., 1993). Daher wurden mit dieser real-time RT-PCR keine Nukleotidsequenzen erkannt, die eine der vermutlich entscheidenden Mutationen im Bereich des S-Gens beinhalten (CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013). So wurden potentiell alle pathogenen und nicht pathogenen FCoV erkannt. Auch wenn Chang und Mitarbeiter (2012) zwei veränderte Aminosäuren im S-Protein bei über 95 % der Katzen mit FIP, aber bei keiner der Kontrollkatzen fanden, so stellt sich doch die Frage, ob diese Mutation allein verantwortlich für die Entstehung von FIP ist. Grundsätzlich lässt sich eine Mutation im S-Gen mit daraus folgender Veränderung der Aminosäuresequenz des S-Proteins gut mit einer Tropismusänderung des Virus erklären. Denn das S-Protein kontrolliert mit seinen Untereinheiten S1 und S2 alle Funktionen für den Zelleintritt in die Wirtszelle (ROTTIER et al., 2005). So ist es verantwortlich für Rezeptorerkennung, Rezeptoradhäsion und Fusion mit der Wirtszelle (BOSCH et al., 2003; ROTTIER et al., 2005). Gerade in der Region, die für das Fusionspeptid codiert, scheint das entscheidende Mutationsgeschehen vor sich zu gehen, das zwischen dem avirulenten und virulenten FCoV unterscheidet (ROTTIER et al., 2005; CHANG et al., 2012; BANK-WOLF et al., 2014). Wenn aber nur diese zwei Punktmutationen im S-Gen für das Entstehen von FIP verantwortlich sind (CHANG et al., 2012), stellt sich die Frage warum nur etwa 5 % bis 10 % der FCoV-infizierten Katzen FIP entwickeln (ADDIE & JARRETT, 1992). Denn eine der Mutationen würde aufgrund des stochastischen Auftretens von RNA-

Polymerase-Fehlern im Verlauf einer FCoV-Infektion bei tausenden von Viren vorkommen (FU & BARIC, 1994; CHANG et al., 2012). Chang und Mitarbeiter (2012) zogen daher potenzielle weitere Mutationen in Betracht, die zusätzlich für die Entstehung von FIP notwendig sein könnten. Am wahrscheinlichsten würden diese im 3c-Gen liegen, da dieses Gen bei den meisten Katzen mit FIP Mutationen aufweist und bei apathogenen FCoV konserviert ist (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012). Während das intakte 3c-Gen für die Replikation im Intestinaltrakt essentiell zu sein scheint, ist seine Funktion beim mutierten, in Makrophagen replizierenden FCoV scheinbar unwichtig. Chang und Mitarbeiter (2012) vermuteten möglicherweise sogar eine bessere Replikationsfähigkeit des mutierten Virus im Organismus, wenn die Funktion des 3c-Gens gestört ist. Eine oder mehrere Mutationen im 3c-Gen zusätzlich zu Mutationen im S-Gen würden auch das spärliche Auftreten von FIP erklären, denn ohne intaktes 3c-Gen verliert FCoV seine Replikationsfähigkeit im Darm und es können so auch nicht eine Vielzahl an pathogenen Viren ausgeschieden werden (CHANG et al., 2012). Porter und Mitarbeiter (2014) stellten das Mutationsgeschehen im S-Gen als Ursache für FIP in Frage, da sie auch bei 89 % der Katzen ohne FIP die Mutation fanden, die den Aminosäureaustausch im S-Protein an Position 1058 von Methionin zu Leucin bewirkte. Sie hielten die Mutation eher für ausschlaggebend für die Verbreitung von FCoV außerhalb des Intestinaltrakts als für die Entstehung von FIP (PORTER et al., 2014). Solange das genaue Mutationsgeschehen und dessen Zusammenhang mit der Immunpathogenese nicht vollständig geklärt ist (PEDERSEN, 2014a), scheint die real-time RT-PCR der vorliegenden Arbeit aufgrund ihrer Spezifität von 100 % einen wertvollen Beitrag zur Diagnose von FIP leisten zu können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit verwendete real-time RT-PCR zur Diagnose von FIP zwar eine je nach verwendetem Material niedrige Sensitivität, aber eine exzellente Spezifität aufweist. Als Probenmaterial der Wahl sollte, soweit vorhanden, Erguss verwendet werden. Bei Katzen mit neurologischen und/oder ophthalmologischen Symptomen kann auch die Untersuchung von Liquor für die Diagnose hilfreich sein. Der Nachweis im Blut war oft falsch-negativ und sollte, wenn überhaupt, nur aus zellhaltigem Material durchgeführt werden.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Doktorarbeit, die zwei Studien umfasst. Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Aussagekraft des Nachweises von felinem Coronavirus (FCoV) mit Hilfe einer real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR) in verschiedenen Körperflüssigkeiten zur Diagnose der feline infektiösen Peritonitis (FIP).

Im ersten Teil der Arbeit wurde die real-time RT-PCR für den Nachweis von FCoV in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), in Serum und Erguss verwendet. Im zweiten Teil wurde die gleiche Methode aus Liquor von Katzen mit und ohne neurologischen und/oder ophthalmologischen Symptomen durchgeführt. Die Studien verwendeten Katzen mit definitiv diagnostizierter FIP. Die Diagnose wurde entweder mittels histopathologischer Untersuchung oder mittels Immunfluoreszenznachweis von Virusantigenen in Makrophagen im Erguss gestellt. In die Kontrollgruppe wurden Katzen eingeschlossen, die FIP-ähnliche klinische Symptome zeigten, bei welchen aber eine andere Krankheit definitiv diagnostiziert wurde. Alternativ lebten die Katzen länger als ein Jahr nach Probenentnahme.

Die Arbeit ermittelte eine Sensitivität von 29 % in PBMC, 15 % in Serum und 89 % im Erguss. Die Sensitivität im Liquor lag unter Einbeziehung aller Katzen bei 42 %, bei Katzen mit neurologischen und/oder ophthalmologischen Symptomen bei 80 %. Die Spezifität der RT-PCR in allen Proben betrug 100 %.

Die Ergebnisse zeigen, dass die real-time RT-PCR eine verlässliche Bestätigungsmethode in der Diagnose der FIP darstellt. Die Sensitivität der real-time RT-PCR war in dieser Arbeit in PBMC und im Serum niedrig. Im Erguss und im Liquor von Katzen mit neurologischen und/oder ophthalmologischen Symptomen war die Sensitivität ausreichend hoch. Daher ist anhand der hier vorliegenden Daten zu empfehlen, Ergussmaterial für den Nachweis von FCoV zu nutzen. Sollte kein Erguss vorhanden sein, ist eine Verwendung von zellhaltigen Blutproben zur Untersuchung anzuraten. Bei Katzen mit neurologischen und/oder ophthalmologischen Symptomen kann Liquor verwendet werden. Bei Katzen ohne neurologische Beteiligung ist dies aufgrund der aufwändigen Gewinnung von Liquor und der vielen falsch-negativen Ergebnisse nicht zu empfehlen.

## VII. SUMMARY

The doctoral thesis contains two studies. The aim of these studies was to evaluate the diagnostic utility of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) in various body fluids for the diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP). In the first study, real-time RT-PCR was performed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), serum, and body cavity effusions. In the second study, usefulness of the same real-time RT-PCR was investigated in cerebrospinal fluid of cats with and without neurological and/or ocular signs.

The studies included cats with a definitive diagnosis of FIP. Diagnosis was established either by histopathological examination or by positive immunofluorescence staining of FCoV antigen in effusion macrophages. Cats of the control group had similar clinical signs, but other confirmed diseases. Alternatively, control cats lived longer than one year after sampling.

The real-time RT-PCR showed a sensitivity of 29 % in PBMC, 15 % in serum, and 89 % in body cavity effusions. The sensitivity in cerebrospinal fluid was 42 % in all cats with FIP and 80 % in cats with FIP with neurological and/or ocular signs. The specificity of the real-time RT-PCR of all samples was 100 %.

The results of the studies show that this real-time RT-PCR is a reliable tool for the diagnosis of FIP. In the present studies, sensitivity was low in PBMC and in serum. In body cavity effusions and cerebrospinal fluid of cats with neurological and/or ocular signs, sensitivity was, however, sufficiently high. Therefore, it is recommended to use body cavity effusions for the diagnosis of FIP. If no effusion is present, cell-containing blood samples should be first choice. In cats with neurological and/or ocular signs, cerebrospinal fluid can be used for the diagnosis of FIP. In cats without neurological and/or ocular signs, examination of cerebrospinal fluid is not recommended, because sampling is invasive and results are often false negative.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 13-25.

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

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

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* 2004; 6: 63-7.

Addie DD, 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, McDonald M, Audhuy S, Burr P, Hollins J, Kovacic R, Lutz H, Luxton Z, Mazar S, Meli ML. Quarantine protects Falkland Islands (Malvinas) cats from feline coronavirus infection. *J Feline Med Surg* 2012; 14: 171-6.

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.

August JR. Feline infectious peritonitis. An immune-mediated coronavirus vasculitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1984; 14: 971-84.

Avrameas S, Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol* 1971; 1: 394-6.

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.

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.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1897-900.

Battilani M, Balboni A, Bassani M, Scagliarini A, Paltrinieri S, Prosperi S. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of feline coronaviruses circulating in Italy. *New Microbiol* 2010; 33: 387-92.

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.

Bell ET, Malik R, Norris JM. The relationship between the feline coronavirus antibody titre and the age, breed, gender and health status of Australian cats. *Aust Vet J* 2006a; 84: 2-7.

Bell ET, Toribio JA, White JD, Malik R, Norris JM. Seroprevalence study of feline coronavirus in owned and feral cats in Sydney, Australia. *Aust Vet J* 2006b; 84: 74-81.

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.

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.

Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 1998; 86: 1245-57.

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.

Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 287: 1-30.

Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15: 155-66.

Cammarata Parodi MC, G.; Paltrinieri, S.; Lavazza, A.; Ape, F. Using indirect 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.

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.

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.

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.

Dye C, Helps CR, Siddell SG. Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 167-74.

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

Engelhardt B, Wolburg H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 2004; 34: 2955-63.

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.

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* 1997; 210: 1307-12.

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, Leutenegger C. A review of coronavirus infection in the central nervous system of cats and mice. *J Vet Intern Med* 2001; 15: 438-44.

Fu K, Baric RS. Map locations of mouse hepatitis virus temperature-sensitive mutants: confirmation of variable rates of recombination. *J Virol* 1994; 68: 7458-66.

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.

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.

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.

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.

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.

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.



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.

Holzworth J. Some important disorders of cats. *Cornell Vet* 1963; 53: 157-60.

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

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.

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.

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.

Jouvenne P, Richardson CD, Schreiber SS, Lai MM, Talbot PJ. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus 229E. *Virology* 1990; 174: 608-12.

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* 1998; 65: 243-57.

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, 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* 2006; 8: 69-72.

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. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. *Vet J* 2000; 159: 64-70.

Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 1-25.

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.

Le Poder S. Feline and canine coronaviruses: common genetic and pathobiological features. *Adv Virol* 2011; 2011: 609465.

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* 2009; 11: 413-9.

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.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292-305.

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.

Paltrinieri S, Cammarata MP, Cammarata G, Comazzi S. Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 65: 205-20.

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 pleural effusions. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 358-61.

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

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

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. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. *Vet J* 2014a: 123-32.

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: Diagnostics and therapeutics. *Vet J* 2014b; 201

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.

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.

Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, Gross JD, Ross AM, Nasim S, Garrett CT. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J Med*

Virology 1990; 30: 85-91.

Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 133-46.

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.

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.

Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 331-7.

Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA, Fong LS, Rahman NA, Arshad H, Shamsudin S, Isa MK. Descriptive distribution and phylogenetic analysis of feline infectious peritonitis virus isolates of Malaysia. *Acta Vet Scand* 2010; 52: 1.

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.

Slauson DO, Finn JP. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 160: 729-34.

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 Clinically Suspected Cats of 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.

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.

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, Pearson GR. The sites of early viral replication in feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 1988; 18: 259-71.

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* 2011; 156: 72-80.

Takano T, Ishihara Y, Matsuoka M, Yokota S, Matsuoka-Kobayashi Y, Doki T, Hohdatsu T. Use of recombinant nucleocapsid proteins for serological diagnosis of Feline coronavirus infection by three immunochromatographic tests. *J Virol Methods* 2013; 196: 1-6.

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.

Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 58-72.

Tobler K, Bridgen A, Ackermann M. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv Exp Med Biol* 1993; 342: 49-54.

Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods* 2007; 140: 115-23.

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.

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.

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.

Webb AA, Muir GD. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 399-411.

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



## IX. DANKSAGUNG

Sehr herzlich möchte ich mich bei **Frau Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann** bedanken, die diese Arbeit mit viel Enthusiasmus und Zielstrebigkeit unterstützt hat. Die klinische Tätigkeit im Rahmen der Dissertation hat mein Wissen immens erweitert und war eine sehr wertvolle und lehrreiche Zeit. Die effektive und umfassende Unterstützung beim Verfassen der Arbeit und die Verfügbarkeit auch außerhalb üblicher Arbeitszeiten stellten einen wesentlichen Beitrag für die schriftliche Ausarbeitung dieser Arbeit dar.

An dieser Stelle möchte ich mich auch besonders bei **Herrn Dr. Robert Fux** und **Frau Dr. Karin Weber** bedanken, ohne die die Arbeit im Labor nicht möglich gewesen wären.

Vielen Dank an alle **Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik**, die meine Arbeit im Klinikalltag unterstützten, indem sie fleißig Proben gesammelt haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön an meinen Kollegen **Herrn Bernd Röttcher**, der bei jeder FIP-verdächtigen Katze an mich gedacht hat und so für sehr viele der Proben, die nicht aus der Medizinischen Kleintierklinik stammten, „verantwortlich“ war.

In tiefer Dankbarkeit und Liebe bin ich meinen **Eltern** verbunden, die mich zu Lebzeiten bedingungslos unterstützt und gefördert haben und immer für mich da waren. Ohne ihre Unterstützung wäre weder mein Studium noch der Beginn der Doktorarbeit möglich gewesen. Sie waren immer mit den richtigen Worten zur Stelle, wenn ich drohte, den Mut zu verlieren.

---

Meiner **Tante, Gabriele Reihofner**, danke ich für Ihre moralische Unterstützung und dafür, dass Sie mir in immer den Rücken freigehalten hat, damit ich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Peter**. Er hat dafür gesorgt, dass die Arbeit nicht stagnierte. Er hatte Lösungen parat, wenn ich nicht weiterwusste. Er hat mich motiviert, wenn mir die Motivation fehlte und stand mir zu jeder Zeit mit wertvollem Rat und Tat zur Seite.

Abschließend möchte mich bei allen **Freunden und Kollegen** bedanken, die fest an mich geglaubt und mich unterstützt haben.