

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

Angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

# **Untersuchungen zur Diagnose und Therapie der felines infektiösen Peritonitis**

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

von  
Yvonne Fischer  
aus Augsburg

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

*Meinen Eltern und Markus*

*In tiefer Liebe und Dankbarkeit*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	
	<b>PATHOGENESE DER FELINEN INFEKTIÖSEN PERITONITIS .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Übertragung und Ausscheidung der felines Coronaviren .....</b>	<b>2</b>
<b>2.</b>	<b>Vermehrung der felines Coronaviren.....</b>	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>Mutation der felines Coronaviren.....</b>	<b>5</b>
<b>4.</b>	<b>Antibody dependent enhancement .....</b>	<b>6</b>
<b>5.</b>	<b>Entstehung immun-medierter Veränderungen.....</b>	<b>8</b>
5.1.	Granulomartige Veränderungen .....	9
5.2.	Vaskulitis und Körperhöhlenergüsse .....	11
5.2.1.	Entstehung der Ergüsse .....	11
5.2.2.	Ergussuntersuchung .....	12
5.2.2.1.	Makroskopische Untersuchung.....	13
5.2.2.2.	Zellzahl und Ergusschemie .....	13
5.2.2.3.	Akute-Phase-Proteine im Erguss.....	14
5.2.2.4.	Zytologische Untersuchung.....	14
5.2.2.5.	Nachweis von feline Coronavirus-Antigen in Ergussmakrophagen .....	15
5.2.2.6.	Antikörper gegen feline Coronaviren im Erguss.....	16
5.2.2.7.	Polymerase-Kettenreaktion im Erguss .....	17
5.2.2.8.	Rivalta-Probe.....	17
5.2.2.8.1.	Historie .....	18
5.2.2.8.2.	Durchführung .....	20
5.2.2.8.3.	Einsatz in der Humanmedizin .....	21
5.2.2.8.4.	Einsatz in der Tiermedizin .....	22
5.2.3.	Therapie zur Verminderung von Vaskulitis und Ergussproduktion.....	22
5.2.3.1.	Immunsuppressiva.....	23
5.2.3.2.	Ozagrelhydrochlorid.....	23
5.2.3.3.	Acetylsalicylsäure .....	24
5.2.3.4.	Thioprolin.....	24
5.2.3.5.	Methylxanthinderivate Pentoxifyllin und Propentofyllin .....	25

---

<b>III.</b>	<b>STUDIE I</b>	
	THE RIVALTA'S TEST AS A TEST TO DIAGNOSE FELINE INFECTIOUS PERITONITIS .....	<b>27</b>
<b>IV.</b>	<b>STUDIE II</b>	
	THE RIVALTA'S TEST AS A DIAGNOSTIC VARIABLE IN FELINE EFFUSIONS - EVALUATION OF OPTIMUM REACTION AND STORAGE CONDITION .....	<b>54</b>
<b>V.</b>	<b>STUDIE III</b>	
	RANDOMIZED, PLACEBO CONTROLLED STUDY OF THE EFFECT OF PROPENTOFYLLINE ON SURVIVAL TIME AND QUALITY OF LIFE OF CATS WITH FELINE INFECTIOUS PERITONITIS .....	<b>73</b>
<b>VI.</b>	<b>STUDIE IV</b>	
	PERIKARDERGUSS BEI EINER KATZE MIT FELINER INFEKTIÖSER PERITONITIS .....	<b>81</b>
<b>VII.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>87</b>
<b>VIII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>97</b>
<b>IX.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>99</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>125</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ADE	antibody dependent enhancement
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASS	Acetylsalicylsäure
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
et al.	„ <i>et alii</i> “ (und andere)
FCoV	felines Coronavirus
FECV	felines enterales Coronavirus
FIP	feline infektiöse Peritonitis
FIPV	FIP-Virus
ggf.	gegebenenfalls
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HIV	humanes Immunschwächevirus
i. d. R.	in der Regel
LDH	Laktatdehydrogenase
NPW	negativer prädiktiver Wert
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase- Kettenreaktion)
PPF	Propentofyllin
PPW	positiver prädiktiver Wert
PTX	Pentoxifyllin
SARS	severe acute respiratory syndrome (schweres akutes Atemwegssyndrom)
sog.	sogenannt

v. a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
z. B.	zum Beispiel

## **I. EINLEITUNG**

Die feline infektiöse Peritonitis (FIP) (WOLFE & GRIESEMER, 1966) ist eine tödliche Krankheit bei Katzen, die erstmals 1963 durch HOLZWORTH beschrieben wurde (HOLZWORTH, 1963). Auch heute noch sind viele Fragen zur Pathogenese, Diagnostik und zu den therapeutischen Möglichkeiten ungeklärt.

Es gibt weder eine sichere Prophylaxe (PEDERSEN & BLACK, 1983; HARTMANN, 2008), noch eine bewiesenermaßen erfolgreiche Therapie (RITZ et al., 2007; KENT, 2009; PEDERSEN, 2009). Katzen, bei denen FIP diagnostiziert wird, sterben innerhalb weniger Tage bis Wochen oder müssen euthanasiert werden (PEDERSEN, 2009). Deshalb wäre eine wirkungsvolle Therapie gegen FIP besonders wichtig. Typische Symptome zeigen die erkrankten Katzen meist erst relativ spät nach Ausbruch der Krankheit, wenn das Virus schon weit im Körper verbreitet und die Vaskulitis weit fortgeschritten ist (PEDERSEN, 1995; RITZ et al., 2007). Erst bei Auftreten massiver pathologischer Veränderungen ist jedoch eine definitive Diagnose von FIP anhand des Nachweises von felinem Coronavirus-(FCoV-)Antigen in den Makrophagen in Gewebe oder Erguss möglich (TAMMER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). Die Gewinnung von Gewebsbiopsien ist sehr invasiv. Weniger invasive und sichere diagnostische Verfahren wären daher sehr wichtig.

Das erste Ziel dieser Arbeit (Studie 1 und 2) war eine genaue Betrachtung der Rivalta-Probe in Bezug auf ihren diagnostischen Wert und praktischen Nutzen bei Katzen mit FIP. Dem Prinzip der Rivalta-Probe liegen die Entstehung und das Bestehenbleiben eines Ergusstropfens in einer schwach sauren Lösung zu Grunde. Zweites Ziel der Arbeit (Studie 3) war es festzustellen, ob eine Behandlung mit Propentofyllin eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit, eine Verbesserung des Allgemeinbefindens und eine Reduktion der Vaskulitis bei Katzen mit FIP bewirken kann. Anhand eines Fallberichts (Studie 4) wurden schließlich das sehr akute Auftreten und die schnelle Progression der Symptome bei FIP sowie die Manifestation der Vaskulitis am Perikard beschrieben.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **PATHOGENESE DER FELINEN INFEKTIÖSEN PERITONITIS**

Die Pathogenese der FIP ist komplex und noch immer nicht im Detail geklärt (STODDART et al., 1988; FOLEY et al., 1997a; FOLEY et al., 2003; KIPAR et al., 2005; SHARIF et al., 2010). FIP wird durch eine virulente Variante der an sich harmlosen FCoV verursacht, die von einem Großteil aller Katzen ausgeschieden werden (PEDERSEN et al., 1981b; HERREWEGH et al., 1995b).

#### **1. Übertragung und Ausscheidung der felinen Coronaviren**

Die Infektion mit den FCoV erfolgt hauptsächlich auf dem fäkal-oralem Weg (MCREYNOLDS, 1997; KIPAR et al., 2005; KENT, 2009). Dabei spielt die Übertragung durch FCoV-ausscheidende Mütter auf Welpen eine sehr große Rolle. Die meisten Welpen infizieren sich bereits zwischen der 5. bis 8. Lebenswoche, wenn die maternalen Antikörper abgefallen sind und noch kein adäquater Schutz durch das eigene Immunsystem aufgebaut ist (PEDERSEN et al., 1981a; HARTMANN et al., 2003). Unabhängig vom Alter sind Katzentoiletten die größte Ansteckungsquelle, vor allem (v. a.) in Mehrkatzenhaushalten, Zuchten und Tierheimen (MCREYNOLDS, 1997). Einer Infektion über den Speichel wird nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben (ADDIE & JARRETT, 2001); sie ist aber, wie auch die Ausscheidung über den Urin, möglich (HOSKINS, 1993). Eine transplazentare Übertragung wurde bei einer Katze beschrieben, die während der Trächtigkeit eine FIP entwickelte (PASTORET & HENROTEAUX, 1978). Diese Form der Übertragung kommt jedoch unter natürlichen Umständen sehr selten vor (ADDIE & JARRETT, 1990). Die indirekte Übertragung der FCoV über Kleidung oder Spielzeug ist theoretisch möglich, aber nicht sehr wahrscheinlich (HARTMANN, 2005).

FCoV werden hauptsächlich über den Kot ausgeschieden. Etwa jede dritte FCoV-infizierte Katze scheidet die Viren über den Darm aus. Dies kann sowohl kontinuierlich, als auch intermittierend erfolgen (ADDIE & JARRETT, 1992; HARTMANN, 2005). FCoV konnte hauptsächlich in den Epithelien von Ileum, Kolon und Rektum nachgewiesen werden (HERREWEGH et al., 1997; KIPAR et al., 2010). Die Virusmenge im Kot korreliert mit der Höhe der Antikörper im

Blut. Je höher die Virusvermehrung im Darm ist, desto höher sind die Antikörpertiter. Katzen ohne FCoV-Antikörper scheiden in der Regel (i. d. R.) kein Virus aus (ADDIE & JARRETT, 1992; FOLEY et al., 1997b). Ausscheider von FCoV können sowohl klinisch gesunde, als auch an FIP erkrankte Katzen sein (wobei diese meist weniger Virus ausscheiden als gesunde Tiere) (ADDIE et al., 1996; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006). Zu Beginn einer FCoV-Infektion kann das Virus auch im Speichel oder im Urin, allerdings nur in geringen Mengen, nachgewiesen werden (STODDART et al., 1988; HERREWEGH et al., 1995a; PEDERSEN & HAWKINS, 1995).

Es gibt zwei Theorien über die Entwicklung einer FIP nach Infektion mit FCoV. Die erste, und nach jetzigem Wissensstand wahrscheinlichste Theorie ist die „*in-vivo*-Mutationstheorie“. Bei dieser wird angenommen, dass das avirulente FCoV (auch „felines enterales Coronavirus (FECV)“ genannt) *in vivo* spontan und individuell in der Katze zum pathogenen Virus (auch „FIP-Virus (FIPV)“ genannt) mutiert, und dieses dann eine FIP auslöst (PEDERSEN et al., 1981b; POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998; HARTMANN, 2005; SHARIF et al., 2010; VOGEL et al., 2010). Laut dieser Theorie wird nur das nicht-mutierte FCoV übertragen (FOLEY et al., 1997a). Das krankheitsauslösende, mutierte FCoV konnte weder in Se- noch Exkreten nachgewiesen werden und eine Übertragung des mutierten Virus wird deshalb unter natürlichen Umständen als sehr unwahrscheinlich erachtet (HARTMANN, 2005). Allerdings kann das pathogene FCoV iatrogen gezielt, oder unter experimentellen Bedingungen (zum Beispiel (z. B.) durch Injektion von Erguss einer an FIP erkrankten Katze in eine nicht-infizierte Katze) übertragen werden (SHERDING, 1994; HARTMANN, 2005).

Diese Mutationstheorie wird allerdings seit Kurzem in Frage gestellt; eine zweite Theorie („Zwei-Stämme-Theorie“) wird von manchen Autoren proklamiert (DYE & SIDDELL, 2007; BROWN et al., 2009; SHARIF et al., 2010). Hierbei wird von einer Koexistenz genetisch unterschiedlicher avirulenter und virulenter Formen der FCoV ausgegangen (BROWN et al., 2009). Eine Übertragung der Viren soll auf den gleichen Wegen wie bei der „Mutationstheorie“ erfolgen. Die Katze wird nach dieser Theorie aber entweder mit einem avirulenten oder einem virulenten Stamm infiziert. FIP entwickelt sich demnach nur in den Katzen, die mit dem virulenten FCoV infiziert sind, ähnlich wie es bei dem Dengue-Virus

oder dem equinen Venezuela-Enzephalitis-Virus beschrieben ist (MONGKOLSAPAYA et al., 2003; ANISHCHENKO et al., 2006; BROWN et al., 2009). Diese Theorie wirft jedoch viele ungeklärte Fragen auf, die sie als alleinigen Mechanismus in Frage stellen (PEDERSEN, 2009; CHANG et al., 2011). Es ist auch denkbar, dass beide Theorien zutreffend sind, dass also z. B. bestimmte („virulente“) zirkulierende Stämme prädisponiert für eine *in-vivo*-Mutation sind (BROWN, 2011). Es wird ebenfalls eine genetische Komponente der Katzen diskutiert (BROWN, 2011), da FIP in bestimmten Katzenfamilien häufiger aufzutreten scheint (O'BRIEN et al., 1985; NORRIS et al., 2005; PESTEANU-SOMOGYI et al., 2006).

## 2. Vermehrung der feline Coronaviren

Nach fäkal-oraler Übertragung der FCoV werden hauptsächlich die Enterozyten infiziert (KIPAR et al., 2005; KIPAR et al., 2010). Spezifische Rezeptoren am Darmepithel für FCoV sind das Enzym Aminopeptidase-N (TRESNAN et al., 1996; BENBACER et al., 1997; VAN HAMME et al., 2011) sowie das „feline dentritische zellspezifische Adhäsionsmolekül grabbing non-Integrin“ (VAN HAMME et al., 2011). Nach Infektion kommt es zunächst in den Darmzellen zur Virusvermehrung. Das nicht-mutierte FCoV vermehrt sich ausschließlich in den Enterozyten des Dünndarms (PEDERSEN et al., 1981a; HARTMANN, 2005; ROTTIER et al., 2005). Es infiziert kaum Makrophagen und seine Vermehrungsrate ist viel geringer als bei dem virulenten mutierten FCoV (STODDART & SCOTT, 1989). KIPAR und Mitarbeiter (2010) konnten jedoch zeigen, dass auch das nicht-mutierte FCoV in der Darmmukosa von Makrophagen aufgenommen wird und zu den regionären Lymphknoten transportiert wird. Über Lymph- und Blutgefäße kann das Virus weiter im Körper verteilt werden. So kann auch das nicht-mutierte Virus eine Virämie auslösen.

Es wurde vermutet, dass die mit FIPV infizierten Monozyten in jegliches Gewebe einwandern und sich dann zu persistierenden, infizierten Makrophagen differenzieren können (KIPAR et al., 2010). Das mutierte FCoV erhält durch die Mutation nicht nur die Fähigkeit, auch andere Zellen als die Enterozyten, insbesondere die Makrophagen (und Monozyten) zu befallen (HERREWEGH et al., 1995a; HERREWEGH et al., 1997; GUNN-MOORE et al., 1998; KIPAR et al., 1999; HARTMANN, 2005), sondern sich auch massiv in diesen zu replizieren

(WARD, 1970; PEDERSEN, 1976; STODDART & SCOTT, 1989; ROTTIER et al., 2005). Diese Vermehrung stellt ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der FIP dar (WEISS & SCOTT, 1981b; STODDART & SCOTT, 1988; ROTTIER, 1999; DEWERCHIN et al., 2005).

### 3. Mutation der feline Coronaviren

Die Mutation des avirulenten, enteralen FCoV findet in der individuellen Katze spontan durch Deletionen im 3C- und/oder 7B-Gen statt (HERREWEGH et al., 1995b; VENNEMA et al., 1998; PEDERSEN, 2009; PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010). Die meisten Katzen mit FIP zeigen eine Mutation im 3C-Gen des FCoV. Da aber nicht alle an FIP erkrankten Katzen diese Mutation haben, kann sie nicht die einzige Ursache für die Entstehung der FIP darstellen (VENNEMA et al., 1998; CHANG et al., 2010). Durch die Mutation erhält das Virus die Fähigkeit zur massiven Replikation in den Makrophagen (STODDART & SCOTT, 1989; KIPAR et al., 2001; KIPAR et al., 2006; KENT, 2009). In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass avirulente FCoV Makrophagen fast nicht infizieren (STODDART & SCOTT, 1989) und auch die Vermehrung in den Makrophagen geringer ist als bei virulenten Stämmen (MCKEIRNAN et al., 1987; STODDART & SCOTT, 1989).

Die Wahrscheinlichkeit einer Mutation wird von mindestens drei Faktoren beeinflusst. Diese sind erstens die Replikationsrate der Zellen (POLAND et al., 1996). Je schneller sich das Virus innerhalb einer Zelle repliziert, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Mutation (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). Zweitens spielen erworbene oder vererbte Resistenzen bestimmter Rassen, Blutlinien oder der individuellen Katzen gegenüber dem mutierten Virus eine Rolle (POLAND et al., 1996). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Infektion durch FCoV von den zellulären Eigenschaften der Katzen abhängt. Monozyten von manchen Katzen können nicht infiziert werden (DEWERCHIN et al., 2005). Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit der Mutation noch abhängig von Virusmenge, Begleiterkrankungen, Stress und dem individuellen Immunstatus der Katze (HERREWEGH et al., 1995b). Drittens ist auch der FCoV-Stamm an sich (sowie dessen Fähigkeit zur Mutation) entscheidend (VENNEMA et al., 1998).

Bei jungen, immunsupprimierten und erstinfizierten Tieren treten Mutationen häufiger auf (FOLEY et al., 1997b; PEDERSEN et al., 2008). Bei diesen Tieren

ist die Virusvermehrung im Darm besonders hoch (POLAND et al., 1996) und mit wachsender Replikationsrate steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Mutation (VENNEMA et al., 1998; ROTTIER et al., 2005). In einer Studie fand eine Mutation bei 20 % der FCoV-infizierten Katzen statt (POLAND et al., 1996).

Über eine Infektion der Monozyten kann sich das Virus über die Blutzirkulation verteilen. Durch den Befall der Monozyten und Makrophagen nach der Mutation des Virus kommt es zu einer zellassozierten Virämie. Nun werden auch die Makrophagen der regionären Mesenteriallymphknoten infiziert (STODDART et al., 1988; MCREYNOLDS, 1997) und die anderen Organe befallen (WEISS & SCOTT, 1981c; JACOBSE-GEELS et al., 1982; JACOBSE-GEELS & HORZINEK, 1983).

Normalerweise präsentieren infizierte Zellen Virus-Antigene auf ihren Zellmembranen. Entsprechende Antikörper können daran binden und das Immunsystem kann die Zellen erkennen und zerstören („Antikörper-abhängige Zelllyse“). In einer Studie wurde gezeigt, dass viele mit mutierten FCoV-infizierten Zellen keine Antikörper auf der Zellmembran präsentieren und dadurch für die humorale Immunantwort unsichtbar bleiben (CORNELISSEN et al., 2007, 2009). Das mutierte FCoV schützt sich noch auf andere Weise. Wenn die FCoV-infizierten Zellen Virus-Proteine auf der Membran präsentieren und Antikörper daran binden um sie für die Lyse durch das Immunsystem zu markieren, wird die Einschleusung dieser Proteine in die infizierte Zelle induziert und die Plasmamembran somit „gereinigt“. Dadurch kann das Immunsystem auch diese Zellen nicht als infiziert erkennen (DEWERCHIN et al., 2006; CORNELISSEN et al., 2009).

#### **4. Antibody dependent enhancement**

Antibody dependent enhancement (ADE) bedeutet, dass Katzen, die bereits Antikörper im Blut haben, schneller und stärker an FIP erkranken als Katzen ohne FCoV-Antikörper (PETERSEN & BOYLE, 1980). In einer experimentellen Studie, in der Katzen subkutan geimpft wurden und Antikörper entwickelten, traten die Symptome schneller und in einer verstärkten Form auf (VENNEMA et al., 1990; OLSEN, 1993; HOHDATSU et al., 1998). Auch verlief die Krankheit progressiver und es wurde eine Verkürzung der Überlebenszeit beobachtet („early death syndrome“), wenn Katzen zum Zeitpunkt der Infektion bereits Antikörper

hatten (PETERSEN & BOYLE, 1980). Dieses Phänomen wurde als ADE, also als antikörperabhängige Verstärkung beschrieben (PEDERSEN & BOYLE, 1980; WEISS & SCOTT, 1981c).

Der dahinter vermutete Mechanismus ist eine erleichterte Phagozytose von antikörperbeladenen FCoV durch Makrophagen, wenn bereits vor Infektion Antikörper im Blut vorhanden sind (HOHDATSU et al., 1991; CORAPI et al., 1992; OLSEN et al., 1992; OLSEN et al., 1993; CORAPI et al., 1995). Die zerfallenden Makrophagen setzen Komplexe, Entzündungsmediatoren und Virus-Antigene frei. Diese Virus-Antigene können nun wiederum an neue Antikörper binden. Immunkomplexgebundene Viruspartikel werden in größeren Mengen als freies Virus von den Makrophagen aufgenommen und binden mit Hilfe derer Rezeptoren an die Zielzellen (hauptsächlich neue Makrophagen) (HALSTEAD & O'ROURKE, 1977; PEIRIS & PORTERFIELD, 1979, 1981; CHANAS et al., 1982; GOLLINS & PORTERFIELD, 1984, 1985). Auch wenn durch bereits vorhandene Antikörper eine FIP forciert wird, ist das Vorhandensein von Antikörpern vor der Infektion mit FCoV jedoch keine Voraussetzung für die Entwicklung der Krankheit. Auch bei Erstkontakt von Katzen mit FCoV kann sich eine FIP entwickeln (ADDIE et al., 1995; FOLEY et al., 1997b; ADDIE et al., 2003).

Das Phänomen des ADE ist auch bekannt bei Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), dem Dengue-Virus und anderen Viren (PORTERFIELD, 1986). Auch bei dem das schwere akute respiratorische Syndrom (SARS) auslösenden Virus (ebenfalls ein Coronavirus) wird von ADE berichtet. Bei Frettchen wurde eine verstärkte Hepatitis nach Immunisierung mit dem SARS-Virus beobachtet (WEINGARTL et al., 2004).

ADE war bei vielen Impfxperimenten gegen FIP ein Problem (VENNEMA et al., 1990; SCOTT et al., 1995). Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass ADE unter natürlichen Umständen eine Rolle spielt (ADDIE & JARRET, 2006). Manche Autoren sind sogar der Meinung, dass bei natürlich infizierten, Antikörper-positiven Katzen eine bessere Abwehr gegenüber Superinfektionen herrschen könnte und diese Katzen damit resistenter gegen FIP seien (HERREWEGH et al., 1997; ADDIE et al., 2000).

## 5. Entstehung immun-mediierter Veränderungen

FIP ist charakterisiert durch eine fibrinöse bis granulomatöse Serositis. Proteinreiche Ergüsse in Körperhöhlen und granulomatös-entzündliche Läsionen in verschiedenen Organen sind typische Kennzeichen der Erkrankung (MONTALI & STRANDBERG, 1972; WEISS & SCOTT, 1981c; KIPAR et al., 2005; KIPAR et al., 2006).

Früher wurden zwei (oder sogar drei) Formen der FIP unterschieden (MONTALI & STRANDBERG, 1972; WEISS & SCOTT, 1981c; HOSKINS, 1993; KISS et al., 2004; KIPAR et al., 2005; LEGENDRE & BARTGES, 2009; SHARIF et al., 2010; TSAI et al., 2011). MONTALI & STRANDBERG (1972) berichteten als erstes von einer „trockenen/granulomatösen/parenchymatösen“ und einer „feuchten/effusiven/nicht-parenchymatösen“ Form. Daneben wurde eine „gemischte Form“ als dritte Variante beschrieben (MONTALI & STRANDBERG, 1972). Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Unterscheidung in diese Formen nicht sinnvoll ist, da FIP immer als „gemischte“ Form auftritt (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979; WALTER & RUDOLPH, 1989; HARTMANN, 2005). In jeder Katze sind zu irgendeinem Zeitpunkt sowohl Erguss, als auch granulomatöse Veränderungen zu finden, wobei eine der beiden Veränderungen dominieren kann, und die Krankheit somit als „mehr exsudativ“ oder „mehr granulomatös“ bezeichnet werden könnte (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979; WALTER & RUDOLPH, 1989). In vielen Publikationen wird dennoch weiterhin in „feuchte“ und „trockene Form“ unterteilt. Beobachtungen bei experimentell und natürlich infizierten Katzen haben gezeigt, dass der sogenannten (sog.) „trockenen“ Form eine kurze Episode der „feuchten“ FIP voran gehen kann und die granulomatösen Läsionen Rückstände der ursprünglichen Entzündung der „feuchten“ Form sein können. Andererseits aber geht im Endstadium einer FIP oft, wenn das Immunsystem zusammenbricht, eine „trockene“ letztendlich in eine „feuchte“ FIP über (HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009). Anders beschrieben sind beide Formen also nur klinische Extreme eines kontinuierlichen Übergangs (ADDIE et al., 2009).

Welche Form überwiegt, hängt vorwiegend von der Reaktion des Immunsystems ab (PEDERSEN, 1987). Das Überwiegen einer zellulären Immunität soll zu einer „eher granulomatösen“ Form der FIP führen (PEDERSEN, 1987; PALTRINIERI et al., 1998b). Durch eine starke zelluläre Immunantwort kommt es zu einem

Wettbewerb zwischen Virusreplikation und Viruszerstörung (PEDERSEN, 2009). Liegt hauptsächlich eine humorale, aber keine oder nur sehr geringe zelluläre Immunität vor, entsteht die „eher effusive“ Form der FIP (PEDERSEN, 1987; PEDERSEN, 1995; PEDERSEN, 2009).

### **5.1. Granulomartige Veränderungen**

Hauptkennzeichen der „trockenen“ Komponente der FIP sind pyogranulomatöse Infiltrate in vielen Organen (wie Lunge, Leber, Gehirn, Lymphgewebe, Omentum, Nieren, Milz, Augen, Epiglottis, Ösophagus, Pankreas, Magen, Mesenterium, Pleura und Myokard) (WEISS & SCOTT, 1981c; HARTMANN, 2005; KIPAR et al., 2005; LEGENDRE & BARTGES, 2009; PEDERSEN, 2009). Es wird jedoch diskutiert, ob diese fokalen Läsionen tatsächlich „Granulome“ genannt werden dürfen, da diese Herde zwar Makrophagen, Plasmazellen und Lymphozyten beinhalten, die zentrale Veränderung aber eher eine Nekrose mit Fibrin und neutrophilen Granulozyten darstellt (BREUER et al., 1998).

Es werden mehrere Theorien zur Entstehung der granulomatösen Läsionen bei FIP diskutiert. Man geht von Hypersensitivitätsreaktionen aus. Davon sind vier Typen bekannt (Typ I bis IV). Während Typ I bis III antikörpervermittelte Reaktionen darstellen, wird die Typ-IV-Reaktion durch T-Zellen ausgelöst (TIZARD, 2004). Die erste Theorie bei FIP geht von einer Typ-III-Hypersensitivitätsreaktion aus (JACOBSE-GEELS et al., 1980; PETERSEN & BOYLE, 1980; HAYASHI et al., 1982; JACOBSE-GEELS et al., 1982; PALTRINIERI et al., 1998a). Dabei handelt es sich um eine Überempfindlichkeitsreaktion, bei der Antikörper gegen lösliche Antigene gebildet werden und an diese binden. Sie wird deshalb auch antikörperabhängiger-Immunkomplex-Typ, oder Arthus-Typ genannt (TIZARD, 2004). Die gebildeten Immunkomplexe können sich an den Kapillaren anlagern. Lysosomale Enzyme, freie Radikale, Zytokine und Komplement werden ausgeschüttet und führen zu Entzündungsreaktionen und Gewebsschäden der Gefäßwände (TIZARD, 2004; TAKANO et al., 2009). In den pyogranulomatösen Infiltraten an FIP erkrankter Katzen konnten Virusantigen, Immunglobuline und die Komplementkomponente C3 nachgewiesen werden (JACOBSE-GEELS et al., 1980; PETERSEN & BOYLE, 1980; WEISS & SCOTT, 1981c; HAYASHI et al., 1982). Dies sind Kennzeichen einer Typ-III-Reaktion (WAGNER, 2006). Es kommt dadurch zu einer sich sehr schnell verbreitenden Entzündung, zusammen

mit einer weitreichenden Infektion von Makrophagen. In diesen Makrophagen findet eine Virusreplikation statt und aus den infizierten, zugrunde gehenden Zellen tritt neues Virus aus. Die infizierten Makrophagen verlassen den Blutkreislauf und ermöglichen dem Virus, auch Gewebe zu befallen. Antikörper, Komplement, Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie Antigen-Antikörper-Komplexe lagern sich an den Gefäßen an und verursachen die typischen, perivaskulären Pyogranulome. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden jedoch nicht von Killerzellen, wie vorgesehen, zerstört. All diese Vorgänge werden der Typ-III-Hypersensitivitätsreaktion zugesprochen (JACOBSE-GEELS et al., 1980; PETERSEN & BOYLE, 1980; WEISS & SCOTT, 1981c, 1981a; JACOBSE-GEELS et al., 1982; JACOBSE-GEELS & HORZINEK, 1983; PALTRINIERI et al., 1998a; HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009).

Die zweite Theorie ist das Auftreten einer Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion (PEDERSEN & BLACK, 1983; PALTRINIERI et al., 1998b; KIPAR et al., 2001). Diese Typ-IV-Reaktion wird auch verzögerte oder zell-medierte Reaktion genannt und ist Folge von Interaktionen zwischen Antigenen, antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen (TIZARD, 2004). Diese Reaktion wird durch die Aktivierung allergen-spezifischer T-Zellen ausgelöst. Durch drei Mechanismen wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Dies geschieht zum einen durch eine Aktivierung der Makrophagen durch Th1-Zellen, des weiteren durch die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten durch Th2-Zellen und drittens durch eine entzündliche Reaktion mittels zytotoxischer T-Zellen (WAGNER, 2006). In den fokalen Granulomen bei Katzen mit FIP wurden die für die Typ-IV-Reaktion typischen Zellen (hauptsächlich CD<sup>4+</sup>-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen) nachgewiesen (PEDERSEN & BLACK, 1983; PALTRINIERI et al., 1998b). Die Makrophagen in den perivenösen Agglomeraten und die intravaskulären Monozyten setzen Matrix-Metallproteinase-9 frei, die Kollagen IV (einen Hauptbestandteil der Gefäßmembran) spalten kann (KIPAR et al., 2001). Dadurch wird die Membran geschädigt und Flüssigkeit tritt aus.

Die Entstehung der granulomartigen Veränderungen kann nicht eindeutig einer der beiden Typen zugeordnet werden. Daher wird auch eine gleichzeitige Beteiligung beider Hypersensitivitätsreaktionen (dritte Theorie) in Erwägung

gezogen (PALTRINIERI et al., 1998b; KIPAR et al., 2001).

## **5.2. Vaskulitis und Körperhöhlenergüsse**

Kennzeichen der „feuchten“ Komponente der FIP sind unterschiedlich große Mengen an Flüssigkeiten in den Körperhöhlen (HOSKINS, 1993; MOCHIZUKI et al., 1997; ROTTIER, 1999; LEGENDRE & BARTGES, 2009). Die Angaben über die Häufigkeit von Ergüssen bei Katzen mit FIP variieren zwischen 45 und 84 % (WALTER & RUDOLPH, 1989; HOSKINS, 1993; EVERMANN et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; NORRIS et al., 2005; TSAI et al., 2011).

Solche Körperhöhlenergüsse sind die Folge einer systemischen Vaskulitis. Von dieser betroffen sind v. a. Peritoneum und Pleura, daneben die Leptomeningen und die Augen. Im Grunde kann jedes Organ befallen werden (KIPAR et al., 2005; PEDERSEN, 2009). Als typisch für FIP werden eine granulomatöse bis nekrotisierende Phlebitis und Periphlebitis bezeichnet, die jedoch nicht immer offensichtlich sind (MONTALI & STRANDBERG, 1972; HAYASHI et al., 1977; WEISS et al., 1980; PEDERSEN, 1995; KIPAR et al., 1998; KIPAR et al., 2005; GOODSON et al., 2009).

### **5.2.1. Entstehung der Ergüsse**

Für die typischen Körperhöhlenergüsse sind perivaskuläre Entzündungen auf den serösen Oberflächen, v. a. in Thorax und Abdomen verantwortlich, ebenso wie die Entzündungsreaktionen an den Gefäßen und die daraus entstehende Vaskulitis (KENT, 2009; LEGENDRE & BARTGES, 2009). Zur Pathogenese der Vaskulitis bei FIP gibt es unterschiedliche Ansichten.

Die wichtigste Rolle bei der Entstehung der Vaskulitis spielen die Monozyten im Blut und die Makrophagen im Gewebe sowie Immunkomplexablagerungen an den Gefäßwänden (WEISS & SCOTT, 1981c; JACOBSE-GEELS et al., 1982; PEDERSEN & HAWKINS, 1995; KIPAR et al., 2004; DEWERCHIN et al., 2005). Freie Viren innerhalb der Blutgefäße bilden Immunkomplexe mit zirkulierenden Anti-Coronavirus-Antikörpern. Die Komplexe können ihrerseits Komplement und Entzündungsmediatoren aktivieren. Dieser Vorgang führt zur Freisetzung vasoaktiver Amine, zu endothelialen Zellreaktionen und zu erhöhter vaskulärer Permeabilität. Es konnte gezeigt werden, dass bei Katzen mit FIP der sog. „vascular endothelial growth factor (VEGF)“ erhöht war. Je höher die Konzentration dieses Faktors, desto mehr Erguss war vorhanden. Daher wird

angenommen, dass Faktoren, wie der VEGF, durch infizierte Makrophagen und Monozyten produziert werden und die Gefäßpermeabilität erhöhen. Flüssigkeit und Plasmaproteine können aus den Gefäßen austreten und führen zu dem typisch proteinreichen Erguss (MOCHIZUKI et al., 1997; ADDIE et al., 1998; HARTMANN, 2005; KENT, 2009; TAKANO et al., 2011). Da die infizierten Blutzellen (hauptsächlich Monozyten und Makrophagen) sich im Lumen, in der Intima und in den Wänden der Venen sowie im perivaskulären Raum befinden, kommt es bei einer Lyse der befallenen Zellen zusätzlich zur Zerstörung der betroffenen Kapillaren (WEISS & SCOTT, 1981a; WEISS & TOIVIO-KINNUCAN, 1988).

KIPAR und Mitarbeiter (2005) bezweifeln, dass Immunkomplexe Auslöser für die Vaskulitis bei der FIP darstellen. Sie schreiben den Immunkomplexen zwar eine gewisse Beteiligung an der Reaktion zu, postulieren aber, dass die Vaskulitis direkt durch aktivierte, zirkulierende Monozyten verursacht wird. Weiter beschreiben sie, dass diese Monozyten (und eben nicht die Immunkomplexe) sich an die granulomatösen Läsionen an den Gefäßwänden (und auch perivaskulär) ansetzen und die Gefäße teilweise komplett ersetzen; dadurch wird wiederum die Permeabilität gesteigert und Flüssigkeit kann austreten (KIPAR et al., 2005).

Die Vaskulitis bei FIP unterscheidet sich sowohl morphologisch, in der zellulären Zusammensetzung, als auch im Verteilungsmuster deutlich von allen anderen immun-medierten Vaskulitiden (PORTER et al., 1973; LIGGITT & DEMARTINI, 1980; JENNETTE & FALK, 1995; CLAUDY, 1998; THIBAUT et al., 1998; JENNETTE et al., 2001; KIPAR et al., 2005). Es sind nämlich weder die postkapillären Venolen, noch die arteriellen Gefäße bei FIP betroffen (JENNETTE et al., 2001; KIPAR et al., 2005). Bei FIP sind hauptsächlich die kleinen und mittelgroßen Gefäße beteiligt. Auch unterscheidet sich die durch FIP verursachte Vaskulitis von der zell-medierten Vaskulitis, da das Virus die Gefäßwände nicht direkt anzugreifen scheint, sondern die Gefäße bei der Zerstörung der Zellen durch Lyse zugrunde gehen (JENNETTE & FALK, 1995; KIPAR et al., 2005).

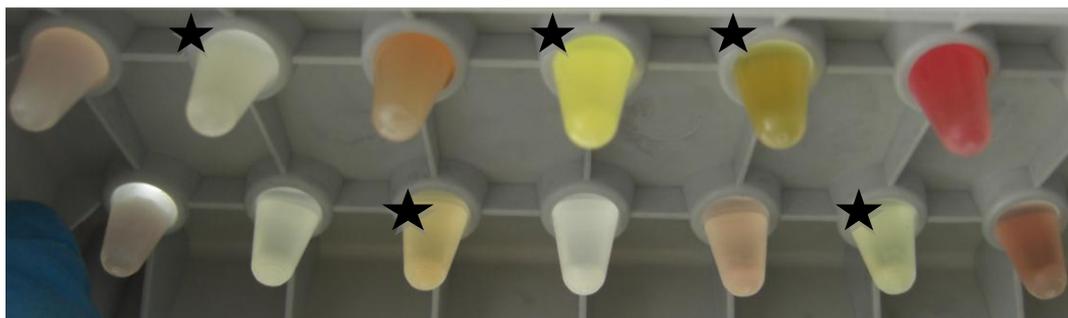
### **5.2.2. Ergussuntersuchung**

Besteht bei einer Katze Verdacht auf FIP und ist Erguss vorhanden, stellt die Untersuchung der punktierten Flüssigkeit den wichtigsten diagnostischen Schritt

zur weiteren Diagnosefindung dar. Sobald das Allgemeinbefinden des Patienten und die Umstände es erlauben, sollten deshalb immer eine Punktion und eine Untersuchung des Ergusses erfolgen (KENT, 2009; BEATTY & BARRS, 2010). Die Ergussdiagnostik weist viel höhere Sensitivität und Spezifität zur Diagnose der FIP auf als sämtliche Bluttests (PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003; ADDIE et al., 2004; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009). Typische Anzeichen für Aszites sind eine Vermehrung des Bauchumfangs sowie fühlbare Fluktuation (ROBISON et al., 1971; HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009). Dyspnoe, Tachypnoe, zyanotische Schleimhäute oder gedämpfte Herztönen können Hinweise auf einen Thorax- oder Perikarderguss sein (ROBISON et al., 1971; HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009; BEATTY & BARRS, 2010).

#### 5.2.2.1. Makroskopische Untersuchung

Der „typische“ Erguss bei FIP wird oft als eine klare, hell bis dunkelgelbe, klebrig-muköse Flüssigkeit beschrieben, die fadenziehend ist und bei Luftzutritt gerinnt (HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009). Häufig wird auch die Beschreibung „bernsteinfarben“ verwendet (PEDERSEN, 2009). Jedoch nicht jeder Erguss, der durch eine FIP verursacht wird stellt sich so typisch dar (Abb. 1). Es wurde sogar milchig-trüber Chylus bei einer Katze mit FIP beschrieben (SAVARY et al., 2001).



**Abb. 1.** Ergüsse unterschiedlicher Genese

★ Ergüsse von an feliner infektiöser Peritonitis erkrankten Katzen

#### 5.2.2.2. Zellzahl und Ergusschemie

Die meisten durch eine FIP verursachten Ergüsse sind als modifiziertes Transsudat oder Exsudat einzustufen (EGBERINK et al., 1995; ALLEMAN, 2003; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009; SHARIF et al., 2010). Der „typische“ FIP-Erguss weist ein hohes Gesamteiweiß (> 35 g/l) und eine niedrige

Zellzahl ( $< 1000/\mu\text{l}$ ) auf (HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009). Diese Werte können jedoch weit variieren, und es kommen Zellzahlen bis zu  $25000/\mu\text{l}$  vor. Ähnliche Ergüsse können aber auch durch anderen Krankheiten, wie Lymphome, Herzversagen, Cholangiohepatitis und bakteriellen Serositiden verursacht werden (HARTMANN, 2005).

Neben dem hohen Eiweißgehalt ist bei Ergüssen von Katzen mit FIP oft die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) erhöht. Bei FIP werden LDH-Aktivitäten von  $> 300 \text{ IU/l}$  als typisch angegeben. Diese Werte werden jedoch auch bei Exsudaten anderer Genese (bakterieller Pleuritis und Malignomen) beobachtet und werden durch eine Freisetzung von Entzündungszellen verursacht (LIGHT et al., 1972; HIRSCHBERGER, 1992; HARTMANN, 2005; ZOIA et al., 2009). In der Humanmedizin wird die Messung der LDH-Aktivität genutzt, um zwischen Transsudaten und Exsudaten zu unterscheiden, und speziell zwischen malignen und benignen Ergussursachen (LIGHT et al., 1972). Häufig werden auch erhöhte  $\alpha$ -Amylase-Aktivitäten in den Ergüssen von Katzen mit FIP gemessen. Hohe Aktivitäten der  $\alpha$ -Amylase werden als Konsequenz einer Pankreasbeteiligung am Krankheitsgeschehen angesehen (LIGHT et al., 1972; HIRSCHBERGER, 1992; HARTMANN, 2005; ZOIA et al., 2009).

#### **5.2.2.3. Akute-Phase-Proteine im Erguss**

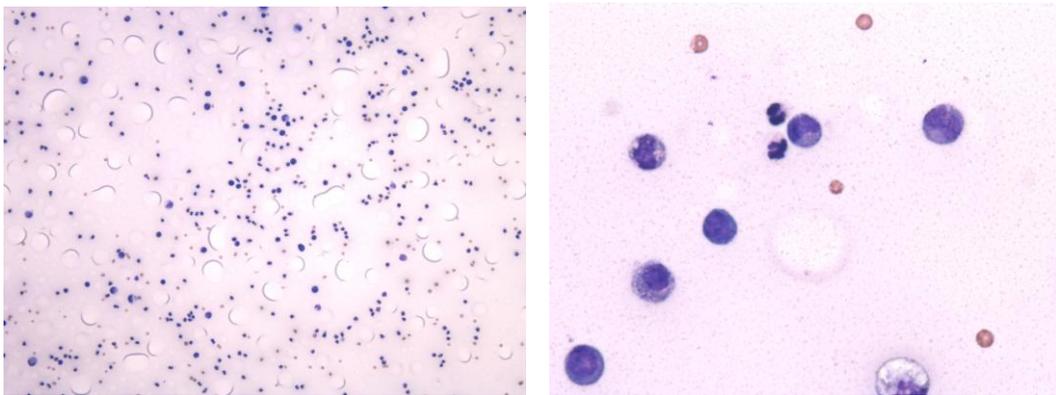
Es gibt nur sehr wenige Untersuchungen über Akute-Phase-Proteine im Erguss. Es konnte gezeigt werden, dass das Akute-Phase-Protein Alpha-1-Acid-Glykoprotein bei Katzen mit FIP im Erguss (wie auch im Serum) stark erhöhte Konzentrationen aufweist (DUTHIE et al., 1997; GIORDANO et al., 2004; GIORI et al., 2011). Man erhoffte sich einen Nutzen bei der Diagnose von FIP (BENCE et al., 2005; GIORI et al., 2011), da die Werte bei an FIP erkrankten Katzen höher waren als bei anderen entzündlich bedingten Ergussursachen (z. B. bei Neoplasien und bakteriellen Serositiden) (DUTHIE et al., 1997; SELTING et al., 2000). Eine frühere Studie ergab nur geringe Aussagekraft der Akute-Phase-Proteine zur Diagnose bei FIP (STODDART et al., 1988). Auch die Ergebnisse einer aktuellen Studie lassen darauf schließen, dass diese bei FIP nicht konstant erhöht sind (TAYLOR et al., 2010).

#### **5.2.2.4. Zytologische Untersuchung**

Die zytologische Untersuchung sollte, wenn möglich, immer als diagnostische

Hilfe zur Einteilung von Ergüssen durchgeführt werden (ALLEMAN, 2003). Das zytologische Bild bei FIP weist einen hauptsächlich pyogranulomatösen Charakter auf. Makrophagen und nicht-degenerierte, neutrophile Granulozyten stellen die vorherrschende Zellpopulation dar (Abb. 2) (HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009; SHARIF et al., 2010). Teilweise sind auch Lymphozyten oder vereinzelt Mesothelzellen zu finden (PALTRINIERI et al., 1999; SHARIF et al., 2010). Der Hintergrund ist oft proteinreich (PALTRINIERI et al., 1999; SHARIF et al., 2010).

Zytologisch kann der Erguss jedoch nur als hinweisend erklärt werden und ist allein nicht beweisend für eine FIP (HARTMANN, 2005). Andere Ergussursachen (z. B. bakterielle Ergüsse, malignes Lymphom) können mit der Zytologie jedoch häufig ausgeschlossen oder als unwahrscheinlich deklariert werden (HARTMANN et al., 2003).



**Abb. 2.** Ergusszytologie einer Katze mit feliner infektiöser Peritonitis  
Links: Proteinreicher Hintergrund („protein crests“, „Halbmonde“)  
Rechts: Zellarmes Präparat, proteinreicher Hintergrund, wenige nicht-degenerierte neutrophile Granulozyten, Makrophagen (teilweise schaumig-aktiviert), wenige kleine Lymphozyten und vereinzelt Erythrozyten

#### 5.2.2.5. Nachweis von felinem Coronavirus-Antigen in Ergussmakrophagen

Mittels Immunfluoreszenzfärbung kann intrazelluläres FCoV-Antigen in den Makrophagen im Erguss nachgewiesen werden (CAMMARATA PARODI et al., 1993; HARTMANN et al., 2003). Erst durch die Mutation erlangen die Viren die Fähigkeit, sich massiv in den Makrophagen zu vermehren. Nur wenn sehr viel Virus in den Makrophagen vorhanden ist, kann dieses mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Der Antigennachweis in den Ergussmakrophagen hat eine Spezifität sowie einen positiven prädiktiven Wert (PPW) von 100 %, da bei allen

Katzen mit einem positiven Ergebnis in diesem Test FIP bestätigt wurde (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). Es gibt jedoch häufig falsch-negative Ergebnisse (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). Diese können z. B. durch eine geringe Zellzahl auf dem Ausstrich aus Erguss und somit zu wenigen Makrophagen zum Nachweis des FCoV-Antigens, verursacht sein. Eine andere Erklärung ist, dass das Antigen durch kompetitive Bindung von FCoV-Antikörpern im Erguss maskiert und eine Bindung von fluoreszierenden Antikörpern verhindert wird. Somit ist eine definitive Diagnose von FIP bei einem positiven Nachweis von intrazellulärem FCoV-Antigen in den Makrophagen im Erguss möglich, aber FIP kann bei einem negativen Ergebnis nicht ausgeschlossen werden (TAMMER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999).

#### **5.2.2.6. Antikörper gegen feline Coronaviren im Erguss**

Die Messung von anti-FCoV-Antikörpern im Erguss ist ein weit verbreiteter Test. Ein Vorhandensein von Antikörpern im Blut einer Katze zeigt nur einen Kontakt mit FCoV an, kann aber nicht zwischen einer harmlosen FCoV-Infektion und einer FIP unterscheiden (VENNEMA et al., 1998). Antikörper können aus dem Blut in einen Erguss anderer Ursache übertreten. Damit ist der Antikörpernachweis im Erguss oft auch positiv bei Katzen mit anderen Ergussursachen. Ebenso wenig kann ein Fehlen von Antikörpern im Erguss eine FIP ausschließen, da diese durch Antigen-Antikörper-Komplexe gebunden sein können und damit nicht detektierbar sind (BARLOUGH & STODDART, 1988; PEDERSEN, 1995). Die Sensitivität des Nachweises von Antikörpern im Erguss zur Diagnose einer FIP betrug in einer Studie 86 %, die Spezifität 85 % (HARTMANN et al., 2003). Da sich jedoch die Titerhöhe zwischen Katzen mit FIP und Katzen mit anderen Krankheiten nicht signifikant unterscheidet, erscheint auch eine quantitative Messung der Antikörper zur Diagnose von FIP im Erguss nicht hilfreich (KENNEDY et al., 1998; HARTMANN et al., 2003). Die Präsenz von Antikörpern im Erguss korreliert mit der von Antikörpern im Blut (SOMA & ISHII, 2004). Es werden dabei meist, unabhängig von der Ergussursache, höhere Titer im Erguss als im Serum gemessen (PALTRINIERI et al., 1998a; PEDERSEN, 2009).

### 5.2.2.7. Polymerase-Kettenreaktion im Erguss

Auch mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction (PCR)) in Blut oder in Erguss, kann keine gesicherte Diagnose einer FIP gestellt werden (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; GAMBLE et al., 1997; ADDIE et al., 2004). Es existieren nicht viele Studien über Untersuchungen zur Aussagekraft der PCR aus Erguss und der diagnostische Nutzen ist daher schwer einzuschätzen. In einer Studie von HARTMANN und Mitarbeitern (2003) hatten fünf von fünf Katzen mit FIP eine positive PCR im Erguss und die einzige Katze die nicht an FIP erkrankt war (hier wurde ein Lymphom diagnostiziert) hatte ein negatives PCR-Ergebnis (HARTMANN et al., 2003). EGBERINK und Mitarbeiter (1995) fanden in ihrer Studie mit einer größeren Anzahl von Katzen (n = 183) heraus, dass die PCR im Erguss bei 83 % aller an FIP erkrankten Katzen richtig-positiv ausfiel. Bei 17 % der Katzen fiel die PCR falsch-negativ aus. Fünf von 40 Katzen (13 %) mit positiver PCR litten an anderen Erkrankungen. Ein negatives Ergebnis schließt also eine FIP nicht aus und auch bei einem positiven Ergebnis muss eine Katze nicht an FIP erkrankt sein (EGBERINK et al., 1995; GAMBLE et al., 1997; HARTMANN et al., 2003; SHARIF et al., 2010).

### 5.2.2.8. Rivalta-Probe

Ein einfacher, schneller und kostengünstiger Test ist die Rivalta-Probe (RIVALTA, 1895), die in Deutschland bei Katzen mit Körperhöhlenergüssen routinemäßig durchgeführt wird. Ein positiver Ausfall kann einen Hinweis auf FIP geben (HIRSCHBERGER, 1995; HARTMANN et al., 2003) und zur Unterscheidung von anderen Krankheiten beitragen (HARTMANN et al., 2003). Die Rivalta-Probe galt bisher als relativ sensitiv und spezifisch für FIP (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). In früheren Studien wies die Rivalta-Probe sehr gute diagnostische Werte auf. Es gibt jedoch auch Ergüsse mit falsch-positiven Ergebnissen (z. B. bei Vorliegen eines Lymphoms oder bakteriellen Serositiden) (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; HARTMANN, 2005). Außerhalb Deutschlands ist die Rivalta-Probe noch nicht so populär, gewinnt jedoch weiter an Bedeutung. Es ist bisher noch relativ wenig über Herkunft, Nutzen und Funktionsweise dieses Testes bekannt. Aufgrund der Einfachheit und der geringen Kosten sollte die Rivalta-Probe bei jeder Katze mit Erguss durchgeführt werden (HARTMANN et al., 2003).

### 5.2.2.8.1. Historie

Der Name der „Rivalta-Probe“ geht auf den italienischen Mediziner Fabio Rivalta zurück, der als Erfinder dieses Testes gilt (RIVALTA, 1895). Diese Tatsache ist jedoch nicht unumstritten, da auch ein deutscher Mediziner, Friedrich Moritz, Ende des 19. Jahrhunderts Anspruch auf die Urheberschaft stellt (BERTI-BOCK et al., 1979).

Der italienische Mediziner Fabio Rivalta publizierte als Erster im April 1895 ein Vorgehen, mit dessen Hilfe man entzündliche Exsudate von einfachen Transsudaten in menschlichen Körperhöhlenergüssen unterscheiden konnte (RIVALTA, 1895; BERTI-BOCK et al., 1979). Er beschrieb die Reaktion als eine Präzipitation in stark verdünnten sauren Lösungen (bestehend aus ca. 200 ml Wasser, welches durch zwei Tropfen Essigsäure pro 100 ml Wasser angesäuert wird). In diese Lösung wurden langsam einige Tropfen der zu untersuchenden Körperhöhlenflüssigkeit fallen gelassen. Handelte es sich bei der Lösung um ein Exsudat, entstand ein weißliches oder milchiges Zeichen („Rauchfahne“, „Zigarre“). Bei einem Transsudat blieb die Lösung klar (RIVALTA, 1895; EISENACK, 1951; BERTI-BOCK et al., 1979).

Diese Untersuchungsmethode setzte sich wegen ihrer einfachen Durchführung und Zuverlässigkeit in ganz Italien sowie in Deutschland, Polen, Russland und Frankreich unter der Bezeichnung „Rivalta-Probe“ durch (JANOWSKI, 1907; BERTI-BOCK et al., 1979) und behielt diesen Namen bis heute. Damals nahm Rivalta an, dass es sich bei dem ausfällbaren Körper um eine Mischung aus „Para“- und „Pseudoglobulin“ handelte (BERTI-BOCK et al., 1979) und dass sich dieses Phänomen auf die Anwesenheit von großen Mengen Globulin in Exsudaten bezog, welches in Transsudaten fehlte (FRATELLI, 1939).

Etwa zur gleichen Zeit wie Fabio Rivalta beschäftigte sich auch in Deutschland ein Mediziner, namens Friedrich Moritz, mit derselben Untersuchungsmethode. Der gebürtige Mainzer schrieb 1886 seine Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Thema „Beiträge zur Lehre von den Exsudaten und Transsudaten“ und beschrieb darin einen durch Essigsäure ausfällbaren Eiweißkörper, der entzündliche Exsudate von nicht entzündlichen Transsudaten unterscheiden konnte (MORITZ, 1886).

Nachdem Moritz von der „Rivalta-Probe“ erfahren hatte, entzündet sich 1902 eine

Diskussion um die Urheberschaft deren Erfindung. Es fand reger Schriftwechsel zwischen Moritz und Rivalta aufgrund der „Rivalta-Frage“ statt (BERTI-BOCK et al., 1979). In seiner Publikation verwies MORITZ (1902) darauf, dass seine Forschungen zu diesem Test mindestens bis in das Jahr 1886 zurück gehen (MORITZ, 1902). Schließlich kam man zur Einigung, dass Rivalta die Arbeit von Moritz nicht bekannt war und auch die Methoden sich in Bedingungen, technischen Modalitäten und in den Ergebnissen voneinander unterschieden (BERTI-BOCK et al., 1979).

Auch andere Forscher beschäftigte das Thema „Unterscheidung zwischen Trans- und Exsudaten“. Anfang des 20. Jahrhunderts machten die meisten Mediziner gleiche Beobachtungen; nämlich, dass ein durch Essigsäure ausfällbarer Körper in Exsudaten entstand, der nicht in Transsudaten vorkam. Jedoch gingen die Meinungen bezüglich der Beschaffenheit dieses Eiweißkörpers auseinander (MORITZ, 1902; STAEHELIN, 1902; UMBER, 1902; JOACHIM, 1903; GARGANO & BRUSCA, 1960).

Während PAJKULL diesen Körper als Nukleoalbumin bezeichnete, war UMBER (1902) der Meinung, dass es sich um ein Seromucin, eine Zwischenstufe von Eiweißkörper und Mucinen handelte (MORITZ, 1902; UMBER, 1902). STAEHLIN (1902) vertrat die These, dass der Körper den Globulinen ähnelte, bezeichnete ihn aber zunächst weiterhin nur als „den durch Essigsäure fällbaren Eiweisskörper der Exsudate“ (MORITZ, 1902; STAEHELIN, 1902). JOACHIM (1903) vertrat die Ansicht, dass die verschiedenen Autoren unterschiedliche Eiweißkörper beschrieben und dass nur ein ganz bestimmter Globulinanteil, nämlich das „Para-Euglobulin“ ausfallen würde (JOACHIM, 1903). UMBER (1902) schrieb diesem, von ihm so bezeichneten Seromucin sogar eine pathogonische Bedeutung zur Beurteilung, ob ein Erguss exsudativer oder transsudativer Natur sei, zu (UMBER, 1902). Etwa 60 Jahre später wurde die Thematik erneut aufgegriffen und GARGANO & BRUSCA (1960) fanden heraus, dass es sich bei den Substanzen, die eine positive Rivalta-Probe verursachten, um saure Proteinkolloide von polysaccharidärer, nucleotidischer oder phospholipidärer Natur handelten (GARGANO & BRUSCA, 1960).

Auch wenn die Rivalta-Probe heute keine Standarduntersuchung in der Humanmedizin mehr darstellt, wurden von SAKAI und Mitarbeitern (2004) genaue Untersuchungen des Tropfens, der bei der positiven Rivalta-Probe

entsteht, durchgeführt. Dabei konnten acht verschiedene Proteintypen (C-reaktives Protein, alpha1-Antitrypsin, alpha1-Acid Glykoprotein, Haptoglobin, Transferrin, Zeruloplasmin, Fibrinogen und Hämopexin) in humanen Ergüssen mit positiver Rivalta-Probe identifiziert werden. Welche Substanz es nun tatsächlich ist, die eine Rivalta-Probe positiv ausfallen lässt, ist jedoch bis heute nicht geklärt (SAKAI et al., 2004).

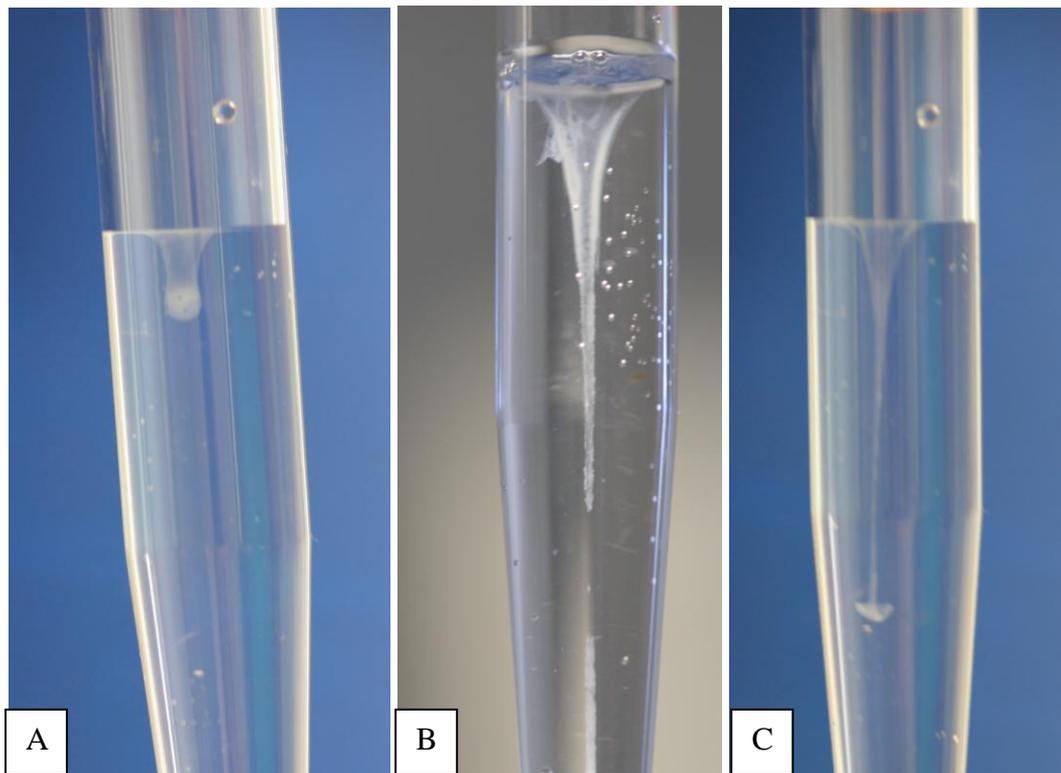
#### **5.2.2.8.2. Durchführung**

Die Rivalta-Probe ist bisher nicht genau standardisiert. Deswegen existieren verschiedene Varianten der Durchführung (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; SAKAI et al., 2004; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009).

Benötigt wird ein Reagenzröhrchen, destilliertes Wasser (Aqua dest.), Eisessig (98%ig) und der zu untersuchende Körperhöhlenerguss (abgefüllt in ein Probenröhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulanzen) (LEGA, 1939; HARTMANN et al., 2003; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009). Die Rivalta-Probe wurde auch schon mit Leitungswasser beschrieben (HIRSCHBERGER et al., 1995). Durchgesetzt hat sich jedoch die Durchführung mit Aqua dest. (LEGA, 1939; HARTMANN et al., 2003; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009).

Das Reagenzröhrchen wird zu etwa drei Vierteln (HARTMANN, 2005) mit Aqua dest. gefüllt. Andere Volumenangaben variieren zwischen 5 ml (HARTMANN et al., 2003) bis zu 7 – 8 ml (ADDIE et al., 2009). Ein Tropfen Eisessig (98%ig) wird hinzugefügt und die Lösung sorgfältig gemischt. Auf die Oberfläche der Lösung wird ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit gegeben (HARTMANN et al., 2003; HARTMANN, 2005).

Die Rivalta-Probe gilt als negativ, falls der zugegebene Tropfen des Körperhöhlenergusses sich auflöst und die Lösung klar bleibt. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der Tropfen seine Form beibehält, mit der Oberfläche verbunden bleibt oder langsam (tropfen- oder quallenförmig) auf den Boden des Reagenzröhrchens schwebt (HARTMANN et al., 2003; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009) (Abb. 3). Auch das Entstehen einer rauchigen Trübung wird manchmal bereits als positiv bewertet (HIRSCHBERGER et al., 1995).



**Abb. 3.** Beispiele für positive Rivalta-Proben

A, Tropfenform erhalten; B, Verbindung zur Oberfläche erhalten, C, „Quallenförmiges“ Absinken des Tropfens zum Boden des Reagenzglases

#### 5.2.2.8.3. Einsatz in der Humanmedizin

Entwickelt wurde die Rivalta-Probe Ende des 19. Jahrhunderts, um in humanen Körperhöhlenergüssen Exsudate von Transsudaten zu unterscheiden (RIVALTA, 1895; EISENACK, 1951; BERTI-BOCK et al., 1979). Sie wird heute nicht mehr routinemäßig in der Humanmedizin angewendet, da sie durch andere Methoden, z. B. die sog. LIGHT-Kriterien (welche die LDH im Pleuralerguss, das Verhältnis von LDH im Pleuralerguss zu LDH im Serum und das Verhältnis von Protein im Pleuralerguss zu Protein im Serum enthalten) oder andere biochemische Messmethoden von Ergussparametern, ersetzt wurde (LIGHT et al., 1972; VIVES et al., 1996).

Dennoch gibt es immer wieder aus nicht-europäischen Ländern (z. B. China und Japan) einzelne Berichte über die Durchführung der Rivalta-Probe in menschlichen Ergüssen. Auch eine weitere Nutzung in ärmeren Ländern, in denen die diagnostischen Möglichkeiten beschränkt sind, ist denkbar (TAKEDA et al., 2000; SAKAI et al., 2004; OTA et al., 2007; ZHOU et al., 2009).

#### **5.2.2.8.4. Einsatz in der Tiermedizin**

Seit vielen Jahren hat sich die Rivalta-Probe als diagnostischer Test bei Katzen mit Körperhöhlenergüssen in Deutschland durchgesetzt. Wie herausgefunden wurde, zeigt die Rivalta-Probe gute diagnostische Werte zur Diagnose von FIP. Allerdings gibt es (z. B. bei einem Lymphom oder eitrigen Ergüssen) auch falsch-positive Ergebnisse bei Katzen, die nicht an FIP erkrankt sind (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003).

Der Test ist einfach, billig und kann in jeder Tierarztpraxis sofort durchgeführt werden. Auch wenn die Rivalta-Probe nicht die Diagnose sichern kann, macht sie FIP als Ursache dennoch wahrscheinlich oder schließt sie mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Daher sollte sie bei jeder Katze mit Erguss durchgeführt werden (HARTMANN et al., 2003).

Über die Grenzen Europas hinaus hat die Rivalta-Probe zur FIP-Diagnostik noch keine große Popularität. Sie wird erst in verschiedenen neuen Publikationen erwähnt (ADDIE et al., 2009; PEDERSEN, 2009). Außer der einfachen und kostengünstigen Durchführung sehen einige Autoren aber in der Rivalta-Probe keinen diagnostischen Vorteil gegenüber der bisherigen Ergussdiagnostik (mikroskopische und biochemische Diagnostik) (ADDIE et al., 2009; PEDERSEN, 2009).

Bei Untersuchungen von Ergüssen bei Hunden zeigte die Rivalta-Probe keinen diagnostischen Nutzen und keine ausreichende Sensitivität zur Unterscheidung von entzündlichen und nicht-entzündlichen Ergüssen (KASBOHM, 1976). Hinsichtlich der Genese des Ergusses bei Hunden unterscheiden sich die Ursachen von Rivalta-positiven und Rivalta-negativen Ergüssen nicht signifikant voneinander (HIRSCHBERGER, 1994).

#### **5.2.3. Therapie zur Verminderung von Vaskulitis und Ergussproduktion**

Da es derzeit keine Möglichkeit gibt, eine an FIP erkrankte Katze zu heilen, kann nur durch symptomatische Therapie versucht werden, den Katzen zu helfen, die Vaskulitis zu vermindern und ein Fortschreiten der Krankheit zu verzögern. Ein Abziehen des Ergusses stellt eine Möglichkeit dar. Gerade bei Tieren, die aufgrund des Ergusses Unwohlsein oder sogar Dyspnoe aufweisen, kann eine Punktion die klinischen Symptome vermindern und dem Patienten vorübergehend Erleichterung verschaffen (RAHMAN et al., 2004). Da es sich bei FIP um eine

immun-medierte Vaskulitis handelt, wird durch verschiedene Arzneimittel versucht, die überschießende Immunantwort auf das FCoV und damit die Vaskulitis zu kontrollieren (ADDIE et al., 2009).

#### **5.2.3.1. Immunsuppressiva**

Durch diese Arzneimittelgruppe soll das Entzündungsgeschehen und v. a. die humorale Immunantwort unterdrückt werden. Am häufigsten werden bei FIP Glukokortikoide als Immunsuppressiva eingesetzt (HARTMANN, 2005; RITZ et al., 2007; ADDIE et al., 2009). Diese bewirken vermutlich durch ihre anti-inflammatorischen Effekte eine Stabilisierung der Membran und eine verminderte Freisetzung lysosomaler Enzyme und Zytokine. Dadurch wird die Gefäßpermeabilität vermindert. Es gibt jedoch keine kontrollierten Studien über einen vorteilhaften Effekt von Glukokortikoiden bei FIP (ADDIE et al., 2009). In vielen Untersuchungen, bei denen man Glukokortikoide zusammen mit verschiedenen Medikamenten eingesetzt hatte, wurde immer nur die Wirksamkeit des jeweiligen anderen Medikamentes evaluiert (MADEWELL et al., 1978; BILKEI, 1988; BÖLCSKEI & BILKEI, 1995; WATARI et al., 1998; ISHIDA et al., 2004; RITZ et al., 2007; SCHERK, 2007). Die mediane Überlebenszeit bei Katzen aus den Kontrollgruppen dieser Studien, die nur mit Glukokortikoiden therapiert wurden, lag bei nur acht oder zehn Tagen (BÖLCSKEI & BILKEI, 1995; RITZ et al., 2007).

Als weiteres immunsuppressives Medikament wird manchmal Cyclophosphamid eingesetzt, welches sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunantwort inhibiert. Es gibt über die Wirksamkeit von Immunsuppressiva bei Katzen mit FIP jedoch keine kontrollierten Studien. Daher basiert die aktuelle Datenlage alleinig auf anekdotischen Berichten (BILKEI, 1988; BÖLCSKEI & BILKEI, 1995).

#### **5.2.3.2. Ozagrelhydrochlorid**

Durch eine Hemmung der Thromboxan-A<sub>2</sub>-Produktion wird durch Ozagrelhydrochlorid die Plättchenaggregation unterdrückt. Ein weiterer Effekt ist die Induktion einer Kontraktion der Kapillarwände (HIRAKU et al., 1986). In einer Studie soll durch die Verabreichung von Ozagrelhydrochlorid die Vaskulitis bei Katzen erfolgreich bekämpft worden sein. Die Diagnose FIP war jedoch nicht gesichert und die Studie beinhaltete nur zwei Katzen. Bei einer Katze war zwei Wochen nach Therapiebeginn kein Erguss mehr erkennbar, das

Allgemeinbefinden und auch die Blutwerte verbesserten sich. Nach 18 Monaten war die Katze immer noch bei gutem Allgemeinbefinden und symptomfrei. Auch bei der zweiten Katze verschwand der Erguss nach zwölf Tagen unter Therapie und die Katze war für acht Monate bei gutem Allgemeinbefinden. Die Therapie musste dann jedoch aufgrund von Nebenwirkungen (Nasenbluten) abgebrochen werden. Daraufhin bildete sich wieder Erguss und die Katze verstarb zwei Monate später. Ob Ozagrelhydrochlorid nun tatsächlich zu der langen Überlebenszeit beitrug, ist nicht bekannt (WATARI et al., 1998).

#### **5.2.3.3. Acetylsalicylsäure**

Bei Acetylsalicylsäure (ASS) handelt es sich um ein nicht-steroidales Antiphlogistikum. Die Wirkungen sind sowohl anti-pyretisch, anti-inflammatorisch, als auch gerinnungshemmend. ASS hemmt auch die Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub> und damit die Thrombozytenaggregation. Die Wirkungsweise bei FIP soll auf einer Unterdrückung des Entzündungsgeschehens sowie der Vaskulitis beruhen; ähnlich der Wirkung, die bei dem humanen Kawasaki-Syndrom beschrieben ist. Bei dieser Erkrankung handelt es sich ebenfalls um eine, durch eine generalisierte Vaskulitis geprägte, Erkrankung beim Menschen (ONOUCHI & KAWASAKI, 1999). Ein zusätzlich positiver Effekt bei FIP könnte die anti-pyretische Wirkung von ASS darstellen. Über die tatsächliche Wirksamkeit gibt es jedoch keine Studien und eine Kombination mit Glukokortikoiden ist aufgrund der Nebenwirkungen (z. B. Gefahr von Magen-Darm-Ulzera) nicht sinnvoll (ADDIE et al., 2009).

#### **5.2.3.4. Thioprolin**

Bei dem Wirkstoff Thioprolin handelt es sich um ein Antioxidans und einen freien Radikalfänger. Dadurch könnten die zellulären Membranen vor freien Radikalen geschützt werden (WEBER et al., 1982). Thioprolin senkt die Produktion des Zytokins TNF- $\alpha$  (welches bei der Entstehung einer Vaskulitis beteiligt ist (SULLIVAN et al., 1988)) und kann durch eine Immunmodulation gegebenenfalls (ggf.) ein Fortschreiten der Krankheit einschränken (FORD, 1986; DE LA FUENTE et al., 2002; GUAYERBAS et al., 2004). In einer Studie mit 52 Katzen mit angeblicher FIP gingen die typischen Symptome Fieber, Erguss und Anorexie nach Therapie mit Thioprolin in Remission. Jedoch war die Diagnose FIP nicht gesichert, es existierte keine Kontrollgruppe und es gab keine Angaben über die

Dauer der Remission (FORD, 1986).

#### **5.2.3.5. Methylxanthinderivate Pentoxifyllin und Propentofyllin**

Bisher wurden noch keine klinischen Studien mit Propentofyllin (PPF) oder Pentoxifyllin (PTX) durchgeführt. Es gibt jedoch verschiedene Berichte, die PTX in Kombination mit Glukokortikoiden eine Wirksamkeit bei Katzen mit FIP zuschreiben (LITTLE, 2005; NORRIS, 2007; SCHERK, 2007; PEDERSEN, 2009). Obwohl die genaue Wirkungsweise und der Mechanismus noch nicht völlig geklärt sind, erscheint eine Wirksamkeit dieser beider Methylxanthinderivate aufgrund der pharmakodynamischen Eigenschaften wahrscheinlich (NORRIS, 2007; SCHERK, 2007). PTX und PPF wirken als Inhibitoren der Phosphodiesterase, von Interleukinen und TNF- $\alpha$  (ZABEL et al., 1993; MEINERS et al., 2004). Diese pro-inflammatorischen Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Vaskulitis bei Katzen mit FIP und ihre Konzentrationen sind bei diesen Katzen stark erhöht (KISS et al., 2004; KIPAR et al., 2005; REGAN et al., 2009; TAKANO et al., 2009). TNF- $\alpha$  induziert die Synthese von Fibrinogen und ist verantwortlich für eine Hyperadhäsion der neutrophilen Granulozyten an den Endothelzellen und für eine gesteigerte Produktion von freien Radikalen, die Gewebsschäden verursachen. Durch die mikrovaskulären Verletzungen wird die Gefäßpermeabilität erhöht und eine Vaskulitis entsteht (MOVAT, 1987; MOVAT et al., 1987; SULLIVAN et al., 1988). PTX verhindert die Synthese von diesem TNF- $\alpha$  durch aktivierte Monozyten und kann so vermutlich sowohl die Gewebsschäden und die Vaskulitis vermindern und auch die hohen Fibrinogenkonzentrationen reduzieren (HAMMERSCHMIDT et al., 1988; BACHET et al., 1989; SORIA et al., 1990; GROSS, 1994; NEUNER et al., 1994).

Es gibt einige Studien über die Hemmung dieser inflammatorischen Zytokine durch PTX bei Menschen und Tieren und deren Erfolge bei der Therapie von Vaskulitiden unterschiedlicher Genese (ZABEL et al., 1989; ARIAS-DIAZ et al., 1994; NEUNER et al., 1994; MARTON et al., 1998; NICHOLS et al., 2001). Bei Menschen, die nach einer Injektion von Endotoxinen stark erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen aufwiesen, waren diese drei Wochen nach Therapie mit PTX wieder auf das ursprüngliche Level gesunken (ZABEL et al., 1989). Auch normale TNF- $\alpha$ -Konzentrationen konnten durch orale Gabe von PTX gesenkt werden. Bei Ratten mit iatrogen-induzierter, akuter Pankreatitis wurden durch

---

Therapie mit PTX sowohl die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen, als auch die Mortalitätsrate signifikant gesenkt (MARTON et al., 1998). PEDERSEN (2009) beschreibt einen Therapieversuch mit PTX und Interferon- $\gamma$  bei einer Katze mit FIP, der jedoch ohne Erfolg blieb (PEDERSEN, 2009).

### **III. STUDIE I**

## **The Rivalta´s Test as a Test to Diagnose Feline Infectious Peritonitis**

**Yvonne Fischer**<sup>1</sup>

**Carola Sauter-Louis**, Dr. med. vet., PhD (epidemiology), Dipl. ECVPH<sup>2</sup>

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

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

<sup>2</sup> Clinic for Ruminants, LMU University of Munich, Germany

**Veterinary Clinical Pathology, akzeptiert**

## The Rivalta's test as a test to diagnose feline infectious peritonitis

Yvonne Fischer, Carola Sauter-Louis, and Katrin Hartmann

### **Abstract:**

**Background:** Since years, the Rivalta's test is routinely used in Europe to diagnose feline infectious peritonitis (FIP) in cats with effusion. It is inexpensive and easy to perform in private practice. There is, however, only little information about its mode of action and diagnostic value.

**Objectives:** The objectives of this study were to evaluate sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of the Rivalta's test for diagnosing FIP and to investigate if there are correlations with any effusion or blood variables.

**Methods:** Medical records of 782 cats between 1999 and 2010 were reviewed. Effusion and blood variables were compared between Rivalta-positive and -negative effusions using the Mann Whitney U test and a multivariate analysis.

**Results:** Prevalence of FIP in cats with effusion was 34.6%. The Rivalta's test showed a sensitivity of 91.3%, a specificity of 65.5%, a PPV of 58.4%, and a NPV of 93.4% for the diagnosis of FIP. Most important significantly different variables in Rivalta-positive effusions were higher cholesterol and specific gravity, and lower albumin to globulin ratio, as the higher bilirubin in the blood.

**Conclusions:** The Rivalta's test in general is an easy and cheap test, but its sensitivity and specificity to diagnose FIP are not as high as previously assumed. If it is, however, performed in young cats or if certain diseases have been ruled-out, it is a valuable practice test. It remains unknown which components in effusions lead to a positive Rivalta's test, but the positivity is not due to high protein concentrations.

## Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) is a very common disease, especially in young cats. The clinical signs are variable and depend on the involved organs<sup>1-2</sup>. A definitive diagnosis is often difficult to obtain. Many diagnostic tests exist in blood and effusions of body cavities, but most of these tests do not provide a definitive diagnosis and make FIP just more or less suggestive<sup>3-4</sup>.

In Germany, a simple test performed on effusions of cats suspected to have FIP has been used, named "Rivalta's test". This test is cheap and can be quickly performed in private practice. The principle of the Rivalta's test is the formation of a drop if effusion is added to a slightly acetic solution. This test was examined in two previous studies and showed a very high sensitivity<sup>3</sup> as well as a high specificity for FIP<sup>3, 5</sup>. In these studies, however, that have used study populations of past decades, the test was only evaluated in a relatively low number of cats<sup>5-6</sup>. Although used for a long time, there is only little information about the mode of action of the Rivalta's test. The test was developed by and named after the Italian physician Fabio Rivalta to differentiate exudates from transudates in human body cavity effusions<sup>7-9</sup>. Rivalta et al. published this method in 1895<sup>7</sup>. Since then, the "Rivalta's test" has been mainly used in Germany, Poland, Russia, and France<sup>10</sup>. Today, the Rivalta's test is not longer used in human medicine, because other analytical methods, including the Light's criteria (pleural LDH, pleural/serum LDH ratio, and pleural/serum protein ratio) have replaced it<sup>1, 11-12</sup>. In dogs, the Rivalta's test has not demonstrated good diagnostic value and is lacking sensitivity to diagnose exudates<sup>13</sup>.

The objectives of this study were to determine the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the Rivalta's test to diagnose FIP, using a large cohort of cats with a definitive diagnosis, and to investigate its correlation with effusion (including specific gravity (SG), white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), total protein (TP), triglycerides, glucose, creatinine, lactate dehydrogenase (LDH),  $\alpha$ -amylase, albumin, cholesterol) and blood (including RBC, hemoglobin, hematocrit, WBC, monocytes, lymphocytes, banded neutrophils, mature neutrophils, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), bilirubin, TP, albumin, urea, creatinine, glucose, albumin to globulin ratio, phosphorus, sodium, potassium, chloride, total and ionized calcium) variables.

## Materials and Methods

### Study design

The study was conducted according to the *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD)*<sup>14-15</sup>, which standardize the conduct and reporting of results of studies of diagnostic accuracy. It was performed as a retrospective analysis, including data of 782 cats with effusion that had been presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig Maximilian University of Munich, Germany, between January 1999 and May 2010. Information collected on these cats included age of the cats, effusion variables, blood variables (CBC, serum chemistry, and electrolytes), and (if available) definitive diagnosis. Inclusion criteria to enter the study were the presence of effusion (detected by ultrasound) and a Rivalta's test performed. Exclusion criterion was a questionable Rivalta's test result. A Rivalta's test was defined as questionable (n = 69) if slightly cloudy shadows were seen in the solution, but one was not able to distinguish if these dissolved or not. For the assessment of the prevalence of FIP and the diagnostic accuracy of the Rivalta's test, only cats with a definitive diagnosis were included (n = 497) as shown in figures 1 to 3. For the correlation of the Rivalta's test with blood or effusion variables, all cats with a clearly positive or negative Rivalta's test result were included (figure 4).

The definitive diagnosis of FIP was either confirmed by immunofluorescent staining of feline coronavirus (FCoV) antigen in macrophages in effusion<sup>5</sup>, by histopathologic changes (if diagnostic for FIP)<sup>16-17</sup>, or immunohistochemical staining of FCoV antigen in tissue macrophages at postmortem examination<sup>18</sup>. The definitive diagnoses of other diseases causing effusion were obtained as follows. Effusion due to heart disease was diagnosed using echocardiography<sup>19-20</sup>. Neoplasia was either diagnosed by cytology or, if not diagnostic, by histopathological examinations or necropsy<sup>21</sup>. Bacterial infections were confirmed by bacterial culture or detection of bacteria in cytology<sup>22-23</sup>. Cholangiohepatitis and intussusception were diagnosed by abdominal ultrasound<sup>24-25</sup>, laparotomy, or necropsy<sup>25-27</sup>. Pancreatitis was diagnosed by an elevation of the feline pancreatic lipase immunoreactivity (fPLi)<sup>28-29</sup>, abdominal ultrasound<sup>28-29</sup>, laparotomy<sup>30</sup>, necropsy<sup>30</sup>, or a combination of those features<sup>31</sup>. Feline lower urinary tract disease with leakage of urine in the abdominal cavity was diagnosed using a combination of history of anuria, physical and ultrasound examination. Bleeding was

diagnosed by comparing effusion and blood packed cell volume. If the hematocrit was equal or higher in the effusion than in the peripheral blood, the effusion was assumed to be caused by bleeding<sup>32</sup>. Systemic hypertension was determined by Doppler-guided measuring of the systemic blood pressure<sup>33</sup>. When FIP was diagnosed, it was considered to be the responsible disease for the effusion and therefore, those cats were classified to the group "FIP". If cats with FIP had concurrent diseases (e. g., diabetes mellitus, feline immunodeficiency virus (FIV) infection), these diseases were not evaluated because they were not considered to be a cause for an effusion.

### Test methods

To perform tests on effusion fluid, thoraco- or abdominocentesis was performed ultrasound-guided, which in most cases is possible without sedation. A 19- or 21-gauge butterfly needle connected to a closed system, using a 3-way-stopcock and a 10 ml syringe was used to carefully and sterilely draw the effusion out of the body cavity. Depending on how much effusion was present, the amount of effusion removed varied between 0.5 and 800 ml. The effusion was filled in reagent tubes, containing EDTA as anticoagulant, and in plain serum tubes without anticoagulant. For every individual cat, effusion variables were determined and the Rivalta's test was performed for diagnostic purposes on the day of aspiration.

For the Rivalta's test, a plastic reagent tube (volume 10 ml) was filled with 7 to 8 ml of distilled water. One drop of acetic acid (98 to 100%) was added from a disposable pipette. The suspension was thoroughly mixed. Using a second disposable pipette, one drop of effusion fluid was carefully laid on top of the suspension. If a drop developed and stayed attached to the surface, retained its shape or slowly floated down to the bottom of the reaction tube, the Rivalta's test was defined as positive (figure 5). If the drop disappeared and the solution remained clear, the Rivalta's test was defined as negative. Slightly cloudy shadows were considered a "questionable" Rivalta's test. Those cats were excluded from analysis. Variables evaluated in effusions included SG, WBC, RBC, TP, triglycerides, glucose, creatinine, LDH,  $\alpha$ -amylase, albumin, and cholesterol. SG was measured using a refractometer (Atago Company Ltd, Japan). Cell counts of effusions were determined by an automatic analyzer (Cell-Dyn 3500; Abbott Laboratories, Illinois, USA). The other effusion variables were

analyzed by automatic analyzers (1999 - 2000: Hitachi 717; 2000 - 2010: Hitachi 911; Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Germany). Effusions were classified, according to concentration of TP, SG, and WBC, as transudate (SG < 1.018, TP < 25 g/l, and WBC < 1500/ $\mu$ l), modified transudate (SG 1.018 – 1.025, TP 25 – 30 g/l, and WBC 1500 – 7000/ $\mu$ l; an effusion that had characteristics of both, a transudate and an exudate (e. g., because of a high TP, but a low WBC) was also classified as a modified transudate.), or exudate (SG > 1.025, TP > 30 g/l and WBC > 7000/ $\mu$ l). Classification of effusion was possible in 643 cats. The other 139 effusions could not be classified because values of SG, TP, and/or WBC were not available (figure 4).

Blood samples were taken out of the *Vena (V.) cephalica*, the *V. saphena medialis*, or the *V. jugularis*, using a 20-gauge needle. Blood was collected in plastic tubes containing EDTA, in plastic serum tubes without anticoagulant, and in blood gas tubes containing lithium-heparin. In blood, the following variables were analyzed: RBC, hemoglobin, hematocrit, WBC, monocytes, lymphocytes, banded neutrophils, mature neutrophils, ALT, AP, bilirubin, TP, albumin, urea, creatinine, glucose, albumin to globulin ratio, phosphorus, sodium, potassium, chloride, total and ionized calcium. The CBC was determined using an automatic analyzer (Cell-Dyn 3500; Abott Laboratories, Illinois, USA). The differential WBC count was determined manually counting 100 white blood cells. The serum chemistry was evaluated using an automatic analyzer (1999 - 2000: Hitachi 717; 2000 - 2010: Hitachi 911; Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Germany). The ionized calcium was measured with an automatic electrolyte analyzer (GEM Premier 3000; Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim, Germany).

### Statistical methods

Values used to evaluate the diagnostic utility of the Rivalta's test included the diagnostic sensitivity (proportion of cats that show Rivalta-positive test results among all cats with FIP), the diagnostic specificity (proportion of cats that show Rivalta-negative test results among all cats with other diseases than FIP), the PPV (probability for a cat with Rivalta-positive test results to have FIP), and the NPV (probability for a cat with Rivalta-negative test results to have no FIP). These values were calculated for all cats with a definitive diagnosis (n = 497) and in addition for different subpopulations of cats (figures 1 to 3). Subpopulations were

all cats a) excluding those with bacterial infection or lymphoma (because these diagnoses usually can easily be differentiated from FIP by cytology and/or bacterial culture<sup>5</sup>) (n = 383) and cats not older than b) 2 years (n = 118) (because most cats with FIP are young<sup>1, 3, 34-36</sup>).

To investigate the correlation between different blood and effusion variables (figure 4) with the results of the Rivalta's test and the classifications of the effusions in transudate, modified transudate, or exudate, statistical analyses were performed using software SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Because almost all variables were not normally distributed (determined visually using boxplots), the Mann Whitney U test was used to investigate a difference between the effusion and blood variables of cats with Rivalta-positive or -negative effusions. All variables, that showed a statistically significant difference in the univariate analysis, were analyzed in a multivariate logistic regression model, using backwards selection (likelihood ratio). Not all variables were available in all cats. For the logistic regression model, only those samples with complete data could be analyzed. Variables were retained in the model if the p-value was less than 0.05. The significance of a variable was higher the more the Odds-ratio (OR) was distanced to 1.000. The OR is a descriptive statistic, describing the strength of association between two variables.

## Results

### *Diagnoses in cats with effusion*

Of all 782 cats with effusion included, 497 cats had a definitive diagnosis (table 1). Of those 172 had FIP, and 325 had other diseases (156, neoplasia; 93, heart diseases; 45, bacterial infection; 11, pancreatitis; 3, cholangiohepatitis; 2, intussusception; 1, systemic hypertension; 4, bleeding; 10, feline lower urinary tract disease with effusion secondary to obstruction or lesions of the urinary tract).

There were 643 effusions, which could be classified as transudate, modified transudate, or exudate (figure 4). Of the Rivalta-positive effusions, 49.7% were classified as exudates, 44.6% as modified transudates, and 5.7% as pure transudates. However, also 11.5% of the Rivalta-negative effusions were exudates (table 2).

### *Value of the Rivalta's test to diagnose FIP*

Only the results of cats with a definitive diagnosis ( $n = 497$ ) were used for the determination of the prevalence of FIP, the sensitivity, the specificity, the PPV, and the NPV of the Rivalta's test to diagnose FIP (figure 1 - 3, table 3). The prevalence of FIP was 34.6%. There was only a low number of cats  $\leq 2$  years ( $n = 22$ ; 96/118 had FIP) with diseases other than FIP, and the prevalence, as the diagnostic sensitivity and the PPV in this subgroup was higher.

### *Correlation of effusion and blood variables with Rivalta's test results*

For the evaluation of the correlation between effusion and blood variables and the Rivalta's test, 782 effusions were included (figure 4). A statistically significant difference in most of the blood or effusion variables was found between cats with Rivalta-positive and -negative effusions (table 4 and 5) using the Mann Whitney U test. However, using a multivariate logistic regression model with 329 effusions included, only 4 variables in the effusion and 2 variables in the blood remained as significant factors in the model (table 4 and 5). The significance of the resulting variables (cholesterol, specific gravity, glucose, and triglycerides in the effusions, as albumin to globulin ratio and bilirubin in the blood) are higher the more their OR was distanced to 1.000.

## Discussion

The prevalence of FIP (34.6%) in cats with effusion in this study was lower than in previous studies of the past decades, in which it reached 41%<sup>3</sup> to 51%<sup>5</sup>. The question arises whether there is a true decrease in the overall prevalence of FIP within the past 15 years. It may be possible that many cats with high suspicion of FIP are no longer referred to the University Veterinary Teaching Hospital by other veterinarians, but are more often euthanized in private practice because of the very poor prognosis of FIP. The prevalence in this study could also be low, because cats without a definitive diagnosis were excluded from statistical analysis. Of these cats, many were highly suspicious for FIP, but because of the bad prognosis for most causes of effusion, many owners elected not to pursue diagnostic tests for a definitive diagnosis. In recent years, more and more owners decline to allow necropsy. For that reason, more cats might have been taken home after death to be buried or cremated and less have been left at the University to perform a necropsy, which likely would have revealed a definitive diagnosis. These points may bias the population in this study<sup>14-15</sup>. The fact, that about one third of all cats with effusions had to be excluded from further evaluation because of a missing definitive diagnosis, might bias the sensitivity and specificity of the test as well as predictive values of this study<sup>14-15</sup>. Many of those cats were suspicious for FIP. If these cats would have gone to necropsy, the prevalence of FIP and in consequence also the PPV would have been higher. On the other hand, there are many other diseases (e. g., other neoplasias than lymphoma), which are not easy to detect and can also cause effusion. If many of those cats would have had a diagnosis, this would also influence the predictive values. Another reason for the lower prevalence of FIP in the present study could be that other diseases, such as neoplasia (one of the most common differential diagnoses), pancreatitis, or heart diseases are now more commonly diagnosed. Due to better possibilities today to find such diagnoses, e. g. heart diseases and tumors (better equipment and techniques in ultrasonography, cytology, diagnostic imaging), more other diseases may have been diagnosed in the present study (which might have not been diagnosed in earlier studies because of missing diagnostic possibilities), which could have decreased the percentage of FIP amongst cats with a definitive diagnosis.

The prevalence of FIP in the population of cats younger than 2 years of age is

much higher with 81.4%, respectively, than in the overall population of cats with effusion. This higher percentage has to be expected, because most cats with FIP are younger than 2 years or even younger than 1 year<sup>1, 3, 34-36</sup> and the differential diagnoses causing effusions are rare at this young age<sup>37</sup>.

If the Rivalta's test was positive, the probability of FIP as the causative disease was 58.4% (PPV), which is much lower than in earlier studies (86% or 84%)<sup>3, 5</sup>. Other differential diagnoses resulting in a positive Rivalta's test in former studies were rare. In the study of Hirschberger et al.<sup>3</sup>, 83.9% of the cats with Rivalta-positive effusions had FIP. In contrast, a much higher proportion of Rivalta-positive effusions were caused by other diseases in the present study that, however, included a much higher number of cats. An explanation for the higher number of other diseases causing Rivalta-positive effusions (besides the lower prevalence of FIP in the present study) could be that some effusions remained in the body cavity for a longer period. There could be an inflammation and serositis secondary to the effusion, which could result in production of inflammatory mediators and cytokines leading to a positive Rivalta's test at a later stage of disease independent of the original disease process. Alternatively, cats with a positive Rivalta's test and another diagnosis than FIP, such as heart disease, could, in theory, have had two diseases at the same time. If a diagnosis as a reason for the effusion was found in a cat, no further diagnostics might have been performed. So, FIP might have been undetected in these cats, and the Rivalta's test could have been truly positive because of FIP, and not "false-positive" because of the other disease. Although this is a potential explanation, it is quite unlikely, because many of the cats with other diseases lived longer than 14 days. Although some cats with FIP can live longer, a median survival time of only 8 days is described<sup>38</sup>.

One important reason for the lower PPV in contrast to older studies is that predictive values strongly depend on the prevalence of the disease, and the lower prevalence of FIP can explain the lower PPV of the Rivalta's test in this study. In a population of young cats ( $\leq 2$  years), the probability for a cat with a positive Rivalta's test to have FIP reaches about 90%, due to the higher prevalence of FIP in this population<sup>1, 3, 34-36</sup>. As there are not many differential diagnoses for a young cat with effusion, the probability of FIP in a cat with a positive Rivalta's test remains very high. Predictive values are strongly influenced by the prevalence of

the disease, which may vary considerably from one clinical situation to another<sup>14-15</sup>. Therefore, the predictive values reported in this study have to be interpreted in view of the investigated population and may not be assigned to other clinical situations.

Although the sensitivity of the Rivalta's test to diagnose FIP was also lower than in former studies (98% and 100%)<sup>5, 39</sup>, it was still very good in the present one (91.3%). Correspondingly, the NPV was very high (93.4%). Therefore, if a cat with effusion has a negative Rivalta's test, the likelihood of FIP is very low, and other diseases should be considered (sensitivity 91.3%).

Different effusion variables were analyzed and correlated with the Rivalta's test outcome to see, if there is a correlation between a positive Rivalta's reaction and any components in the effusion. In most of the variables measured in effusion or in blood, a statistically significant difference between Rivalta-positive and Rivalta-negative effusions (table 4 and 5) was obvious when analyzed with the Mann Whitney U test. The high number of significant differences is a result of the large number of patients included, but not all variables and differences seem to be clinically relevant. In the multivariate logistic regression model, only cholesterol concentration, the specific gravity, the glucose concentration, and the triglycerides of the effusion, as well as the albumin to globulin ratio and the bilirubin in the blood were significantly different.

For a long time it was assumed, that a positive Rivalta's test is mainly dependent on the TP concentration in the effusion<sup>8, 40-42</sup>. This assumption obviously seems not to be true, because in the present study the TP concentrations of Rivalta-positive and Rivalta-negative effusions were not significantly different in the multivariate analysis. There were Rivalta-negative effusions with a very high TP and Rivalta-positive effusions with quite low TP levels (table 4). Thus, the findings of this study suggest that the TP is not the major variable correlated with the outcome of the Rivalta's test, and therefore, other components of the effusion seem to be involved in the formation of the drop seen in a positive Rivalta's test.

The cholesterol concentration in effusion was significantly higher in Rivalta-positive effusions and the OR was highest in this variable. Cholesterol is a useful variable to differentiate between transudates and exudates in human effusions<sup>43-45</sup>. The reason for the higher concentration in exudates is not fully understood.

Possibilities are that cholesterol develops because of a degeneration of effusion components (e. g., WBC and RBC), or that cholesterol can pass the vessels because of increased capillary permeability in vasculitis<sup>44, 46</sup>. As there were much more Rivalta-positive effusions in this study classified as exudates, and exudates show higher cholesterol concentrations, it seems logical that the cholesterol concentrations were higher in these Rivalta-positive effusions. Whether, however, the cholesterol in the effusion actually could cause the positive Rivalta's reaction, still remains to be clarified. Interestingly, the triglyceride concentration, in contrary, was significantly lower in Rivalta-positive than in Rivalta-negative effusions (table 4). It would have been expected, that triglycerides and cholesterol show the same pattern. Triglycerides may, however, behave different as it was shown in one study in mice, that cholesterol feeding and high cholesterol levels actually decreased the production of triglycerides<sup>47</sup>. Another explanation could be that some effusions may be present in the body cavities for an extended period of time before being diagnosed. In this case, a "pseudochyle" can develop, which typically contains high cholesterol values, but no triglycerides<sup>48</sup>.

The SG showed significantly higher values in Rivalta-positive than in Rivalta-negative effusions (table 4). The SG should mainly depend on the TP concentrations or cell counts<sup>49</sup> of an effusion, but both did not remain significantly different between Rivalta-positive and Rivalta-negative effusions in the multivariate analysis. Potentially other components, like the high cholesterol or other not investigated variables, also influence the SG.

In blood, only albumin to globulin ratio and the bilirubin were significantly different in the multivariate logistic regression model. Cats with Rivalta-positive effusions had significantly lower albumin to globulin ratios; cats with a positive Rivalta's reaction in effusion had a median blood albumin to globulin ratio of 0.56, while cats with a negative test result had a median ratio of 0.88. A low albumin to globulin ratio not only depends on a high globulin but also on a low albumin. The low albumin may be caused by reduced production in the liver, but most likely may be caused by vasculitis, leading to a leakage of protein and other blood components in the effusion, thus leading to a positive Rivalta's test<sup>1</sup>.

The highest OR in blood (1.019) was reached with the bilirubin concentration; the median bilirubin concentration was markedly higher in cats with Rivalta-positive effusions (table 5). The high percentage of cats with FIP could be responsible for

that difference<sup>2</sup>. Cats with FIP often show a hyperbilirubinemia without an increase of liver enzymes. An interaction of the bilirubin metabolism and the excretion into the biliary system is suggested<sup>1</sup>. Cytokines can affect the degradation of bilirubin. Either they reduce transporter gene expression or they inhibit the transport protein function directly in liver cells. In consequence, serum bilirubin increases<sup>50</sup>. Hyperbilirubinemia in FIP can also be caused by hemolysis (as a result of disseminated intravascular coagulation or autoimmunhemolytic anemia), an involvement of the liver, or cholestasis<sup>1,51</sup>.

There were several limitations in this study. This was a retrospective analysis, and not all variables were available in every patient<sup>14-15</sup>. Other limitations of the study are a certain subjectivity of the Rivalta's test with no available reference standard method for the performance of the test, and the fact that the laboratory personal performing the test changed since 1999, which could also bias the results of this study<sup>14-15</sup>. Because not every cat went to necropsy after death, FIP could not be completely ruled-out as a second disease in the group with other diseases, and therefore as a cause responsible for a positive Rivalta's reaction. In contrary, cats with FIP may have had a second disease that might have also caused effusion. Although unlikely, this is a problem that cannot be totally excluded.

In conclusion, this study showed that the Rivalta's test can be used as a good diagnostic variable in effusion diagnostics. Although its PPV to diagnose FIP is not as high as in former studies, especially in young cats, the diagnostic value is very good. The big asset of the Rivalta's test is to significantly decrease the probability of FIP if the test is negative. TP was not significantly higher in Rivalta-positive than in Rivalta-negative effusions when analyzed with a multivariate regression model. Therefore, the Rivalta's reaction seems not to mainly depend on a high protein concentration, as it was assumed earlier<sup>8, 40-42</sup>. Cholesterol may play a role in a positive reaction, but it still remains unclear which components in the effusions of cats actually lead to a positive Rivalta's test. Thus, it would be very important to explore the mode of action of this test and further identify responsible variables for its positive outcome.

## References

1. Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;35:39-79.
2. Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). *Aust Vet J.* 2005;83:666-673.
3. Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, Frost J, Lutz H, Kraft W. Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis. *Tierarztl Prax.* 1995;23:92-99.
4. Pedersen NC. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* 1976;37:1449-1453.
5. 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.
6. Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, Frost J, Lutz H, Kraft W. [Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis]. *Tierarztl Prax.* 1995;23:92-99.
7. Rivalta F. Su di una nuova reazione per la diagnosi chimica differenziale fra gli essudati sierosi e i semplici trasudati. *La Riforma Medica.* 1895:242.
8. Berti-Bock G, Vial F, Premuda L, Rulliere R. Exudates, transudates and the Rivalta reaction (1895). Current status and historical premises. *Minerva Med.* 1979;70:3573-3580.
9. Eisenack W. Untersuchungen über Exsudat und Transsudat (Dissertation). *Veterinär-Medizinische Fakultät der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen*; 1951
10. Virchow R. *Jahresbericht über die Leistungen und Fortschritte in der gesamten Medizin.* 1895.
11. Vives M, Porcel JM, Vicente de Vera M, Ribelles E, Rubio M. A study of Light's criteria and possible modifications for distinguishing exudative from transudative pleural effusions. *Chest.* 1996;109:1503-1507.
12. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WCJ. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med.* 1972;77:507-513.
13. Kasbohm C. Effusions of body cavities in the dog (2). Clinical and diagnostic study with special reference to punctate cytology. *Tierarztl Prax.* 1976;4:85-94.
14. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem.* 2003;49:7-18.
15. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. *Clin Chem.* 2003;49:1-6.
16. Addie DD, Paltrinieri S, Pedersen NC. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J Feline Med Surg.* 2004;6:125-130.
17. 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;129:209-212.
18. 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;49:177-182.
19. Ferasin L. Feline myocardial disease 2: diagnosis, prognosis and clinical management. *J Feline Med Surg.* 2009;11:183-194.
  20. Bonagura JD. Feline echocardiography. *J Feline Med Surg.* 2000;2:147-151.
  21. Hirschberger J, DeNicola DB, Hermanns W, Kraft W. Sensitivity and specificity of cytologic evaluation in the diagnosis of neoplasia in body fluids from dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 1999;28:142-146.
  22. Ottenjann M, Lubke-Becker A, Linzmann H, Brunnberg L, Kohn B. [Pyothorax in 26 cats: clinical signs, laboratory results and therapy (2000-2007)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2008;121:365-373.
  23. Barrs VR, Beatty JA. Feline pyothorax - new insights into an old problem: part 1. Aetiopathogenesis and diagnostic investigation. *Vet J.* 2009;179:163-170.
  24. Newell SM, Selcer BA, Girard E, Roberts GD, Thompson JP, Harrison JM. Correlations between ultrasonographic findings and specific hepatic diseases in cats: 72 cases (1985-1997). *J Am Vet Med Assoc.* 1998;213:94-98.
  25. Patsikas MN, Papazoglou LG, Papaioannou NG, Savvas I, Kazakos GM, Dessiris AK. Ultrasonographic findings of intestinal intussusception in seven cats. *J Feline Med Surg.* 2003;5:335-343.
  26. Day DG. Feline cholangiohepatitis complex. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1995;25:375-385.
  27. Day MJ. Immunohistochemical characterization of the lesions of feline progressive lymphocytic cholangitis/cholangiohepatitis. *J Comp Pathol.* 1998;119:135-147.
  28. Forman MA, Marks SL, De Cock HE, et al. Evaluation of serum feline pancreatic lipase immunoreactivity and helical computed tomography versus conventional testing for the diagnosis of feline pancreatitis. *J Vet Intern Med.* 2004;18:807-815.
  29. Gerhardt A, Steiner JM, Williams DA, et al. Comparison of the sensitivity of different diagnostic tests for pancreatitis in cats. *J Vet Intern Med.* 2001;15:329-333.
  30. Webb CB, Trott C. Laparoscopic diagnosis of pancreatic disease in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2008;22:1263-1266.
  31. Zoran DL. Pancreatitis in cats: diagnosis and management of a challenging disease. *JAM Anim Hosp Assoc.* 2006;42:1-9.
  32. Noone KE. Pleural effusions and diseases of the pleura. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1985;15:1069-1084.
  33. Stepien RL. Feline systemic hypertension: Diagnosis and management. *J Feline Med Surg.* 2011;13:35-43.
  34. Marioni-Henry K, Vite CH, Newton AL, Van Winkle TJ. Prevalence of diseases of the spinal cord of cats. *J Vet Intern Med.* 2004;18:851-858.
  35. Rohrbach BW, Legendre AM, Baldwin CA, Lein DH, Reed WM, Wilson RB. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218:1111-1115.
  36. Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc.* 1997;210:1313-1318.
  37. Beatty J, Barrs V. Pleural effusion in the cat: a practical approach to

- determining aetiology. *J Feline Med Surg.* 2010;12:693-707.
38. 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;21:1193-1197.
  39. Hirschberger J. Cytology of body cavity effusions. *Tierarztl Prax.* 1995;23:192-199.
  40. Matraccia S, Campo G, Titone C. Interaction between globin and Rivalta-positive colloids. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1963;39:148-149.
  41. Moritz F. Beiträge zur Lehre von den Exsudaten und Transsudaten (Dissertation). *Hohe Medicinische Facultät der königl. Ludwig-Maximilians-Universität zu München.* 1886
  42. Staehelin R. Ueber den durch Essigsäure fällbaren Eiweisskörper der Exsudate und des Urins. *Munch Med Wochenschr.* 1902;34:1413-1415.
  43. Jenss U, Towe D, Diwok K. Determination of individual lipid parameters in non-chylous pleural effusions. *Z Erkr Atmungsorgane.* 1989;173:161-165.
  44. Valdes L, San-Jose E, Estevez JC, et al. Cholesterol in pleural exudates depends mainly on increased capillary permeability. *Transl Res.* 2010;155:178-184.
  45. Guleria R, Agarwal SR, Sinha S, Pande JN, Misra A. Role of pleural fluid cholesterol in differentiating transudative from exudative pleural effusion. *Natl Med J India.* 2003;16:64-69.
  46. Valdes L, Pose A, Suarez J, et al. Cholesterol: a useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. *Chest.* 1991;99:1097-1102.
  47. Van der Veen JN, Havinga R, Bloks VW, Groen AK, Kuipers F. Cholesterol feeding strongly reduces hepatic VLDL-triglyceride production in mice lacking the liver X receptor alpha. *J Lipid Res.* 2007;48:337-347.
  48. Hillerdal G. Chylothorax and pseudochylothorax. *Eur Respir J.* 1997;10:1157-1162.
  49. Meyers DG, Meyers RE, Prendergast TW. The usefulness of diagnostic tests on pericardial fluid. *Chest.* 1997;111:1213-1221.
  50. Zollner G, Trauner M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr.* 2006;156:380-385.
  51. Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg.* 2009;11:225-258.

**Table 1.** Outcome of the Rivalta's test in cats with feline infectious peritonitis and other diseases

	total		FIP		other diseases	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Rivalta-positive	268	(100.0)	157	(58.6)	111	(41.4)
Rivalta-negative	229	(100.0)	15	(6.6)	214	(93.4)
all effusions	497	(100.0)	172	(34.6)	325	(65.4)

FIP, feline infectious peritonitis;

**Table 2.** Classification of 643 effusions in exudates, modified transudates, and transudates, based on the content of total protein (TP), specific gravity (SG), and white blood counts (WBC) of the effusions, in Rivalta-positive and-negative effusions

	exudate*		modified transudate*		transudate*		total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Rivalta-positive	156	(49.7)	140	(44.6)	18	(5.7)	314	(100)
Rivalta-negative	38	(11.5)	219	(66.6)	72	(21.9)	329	(100)
all effusions	194	(30.2)	359	(55.8)	90	(14.0)	643	(100)

\* exudate (SG > 1.025, TP > 30 g/l and WBC > 7000/ $\mu$ l), modified transudate (SG 1.018 – 1.025, TP 25 – 30 g/l, and WBC 1500 – 7000/ $\mu$ l; an effusion that had characteristics of both, a transudate and an exudates (e. g., because of a high TP, but a low WBC) was also classified as a modified transudate.), or transudate (SG < 1.018, TP < 25 g/l, and WBC < 1500/ $\mu$ l)

**Table 3.** Prevalence of feline infectious peritonitis; sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the Rivalta's test to diagnose feline infectious peritonitis, based on 497 effusions of cats with definitive diagnoses

	n	PRE of FIP (%)	SE (%) (CI 95%)	SP (%) (CI 95%)	PPV (%)	NPV (%)
all cats	497	34.6	91.3 (86.1 – 94.6)	65.5 (60.2 – 70.5)	58.4	93.4
cats without BI and lymph	383	45.0	91.3 (86.1 – 94.6)	73.0 (66.6 – 78.5)	73.4	91.1
cats ≤ 2 years of age	118	81.4	94.8 (88.4 – 97.8)	45.5 (26.9 – 65.3)	88.4	66.7

PRE, prevalence; FIP, feline infectious peritonitis; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value, SE, sensitivity; SP, specificity; CI, confidence interval;

\*effusions of cats with bacterial infection (BI) and lymphoma (lymph) were excluded of the analysis

**Table 4.** Effusion variables (medians, percentiles (2.5; 97.5)), results of the Mann Whitney U test, and of the multivariate analysis of Rivalta-positive and Rivalta-negative effusions; variables are given in the order of ascending p-values in Mann Whitney U test; if p was less than 0.001, it was recorded as < 0.001; p-values < 0.05 were considered significant

variables	units	Mann Whitney U test						multivariate analysis		
		Rivalta-negative			Rivalta-positive			p-value (MWU)	p-value (MA)	OR (CI 95%)
		n	median	percentiles (2.5; 97.5)	median	percentiles (2.5; 97.5)				
LDH	U/l	489	102	(16 - 7304)	773	(50 - 6337)	< 0.001	n. s.	-	
specific gravity		655	1.022	(1.008 - 1.040)	1.030	(1.014 - 1.046)	< 0.001	0.002	1.131 (1.044 - 1.224)	
TP	g/l	608	31.8	(3.0 - 69.7)	48.0	(8.7 - 84.8)	< 0.001	n. s.	-	
$\alpha$ -amylase	U/l	492	613	(113 - 2164)	1029	(225 - 3296)	< 0.001	n. s.	-	
WBC	$\times 10^9/l$	690	1.05	(0.02 - 34.04)	4.17	(0.07 - 129.75)	< 0.001	n. s.	-	
cholesterol	mmol/l	502	1.83	(0.10 - 5.94)	2.68	(0.45 - 5.75)	< 0.001	0.031	1.534 (1.041 - 2.262)	
creatinine	$\mu\text{mol/l}$	502	114	(40 - 715)	80	(27 - 449)	< 0.001	n. s.	-	
glucose	mmol/l	492	6.70	(0.11 - 11.75)	5.16	(0.05 - 12.47)	< 0.001	0.008	0.896 (0.826 - 0.972)	
albumin	g/l	500	15.4	(0.89 - 32.14)	17.2	(3.4 - 29.4)	0.001	n. s.	-	
RBC	$\times 10^6/\mu\text{l}$	671	0.006	(0.000 - 1.699)	0.015	(0.000 - 2.583)	0.001	n. s.	-	
triglycerides	mmol/l	501	0.44	(0.11 - 11.75)	0.37	(0.11 - 16.73)	0.010	0.013	0.954 (0.919 - 0.990)	

Multivariate analysis, multivariate logistic regression model; n, number of cats included in the analysis; MWU, Mann Whitney U test; OR, Odds-ratio; CI, confidence interval; MA, multivariate analysis; n. s., not significant

LDH, lactate dehydrogenase; TP, total protein; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells

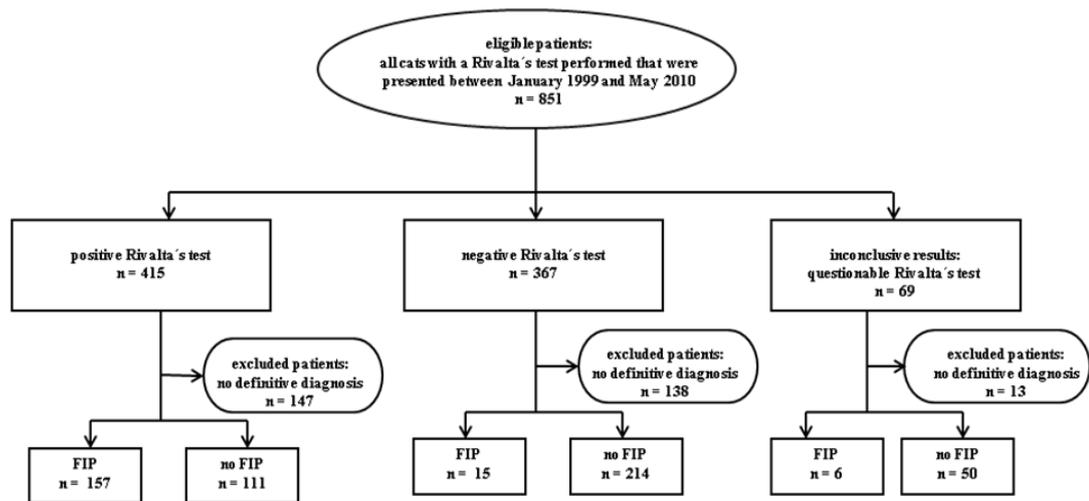
**Table 5.** Blood variables (medians, percentiles (2.5; 97.5)), results of the Mann Whitney U test, and of the multivariate analysis of Rivalta-positive and Rivalta-negative effusions; variables are given in the order of ascending p-values in Mann Whitney U test; if p was less than 0.001, it was recorded as < 0.001; p-values < 0.05 were considered significant

variables	Mann-Whitney U test										multivariate analysis	
	Rivalta-negative					Rivalta-positive					p-value (MA)	OR (CI 95%)
	rr	units	n	median	percentiles (2.5; 97.5)	median	percentiles (2.5; 97.5)	p-value (MWD)				
albumin/globulin ratio	-	-	607	0.88	(0.30-1.52)	0.56	(0.24-1.16)	<0.001	0.013	0.025 (0.001 - 0.460)	n. s.	
creatinine	(0-169)	µm ol/l	637	121	(42-825)	85	(27-362)	<0.001	-	-	n. s.	
urea	(5.00-11.30)	mmol/l	634	11.42	(4.33-66.79)	8.10	(3.59-38.79)	<0.001	-	-	n. s.	
albumin	(26.00-56.00)	g/l	608	28.80	(14.45-43.11)	23.96	(14.11-38.64)	<0.001	-	-	n. s.	
AP	(0-94)	U/l	533	30	(7-460)	19	(3-139)	<0.001	-	-	n. s.	
banded neutrophils	(0.00-0.60)	x10 <sup>9</sup> /l	577	0.19	(0.00-4.66)	0.50	(0.00-9.23)	<0.001	-	-	n. s.	
bilirubine	(0.00-4.74)	µm ol/l	555	2.90	(0.50-110.86)	6.72	(0.46-137.03)	<0.001	0.002	1.019 (1.007 - 1.031)	n. s.	
ALT	(0-114)	U/l	547	55	(12-858)	38	(10-618)	<0.001	-	-	n. s.	
sodium	(146.0-165.0)	mmol/l	567	148	(128-158)	146.5	(122.2-158.0)	<0.001	-	-	n. s.	
glucose	(3.70-6.90)	mmol/l	586	7.58	(3.39-29.89)	6.72	(2.28-19.54)	<0.001	-	-	n. s.	
hemoglobin	(5.60-9.30)	mmol/l	668	7.04	(2.51-11.92)	6.26	(2.54-10.86)	<0.001	-	-	n. s.	
hematocrit	(0.30-0.44)	l/l	668	0.34	(0.13-0.54)	0.30	(0.12-0.50)	<0.001	-	-	n. s.	
TP	(57.00-94.00)	g/l	606	65.40	(35.32-95.17)	69.65	(39.91-102.60)	<0.001	-	-	n. s.	
RBC	(5.00-10.00)	x10 <sup>12</sup> /l	670	7.84	(2.54-12.80)	7.38	(2.59-11.74)	0.007	-	-	n. s.	
total calcium	(2.30-3.00)	mmol/l	293	2.24	(1.65-3.00)	2.19	(1.35-2.71)	0.008	-	-	n. s.	
potassium	(3.50-5.60)	mmol/l	570	4.10	(2.70-6.19)	4.00	(2.50-5.88)	0.029	-	-	n. s.	
WBC	(6.00-11.00)	x10 <sup>9</sup> /l	671	14.00	(3.32-43.32)	15.60	(1.76-46.73)	0.039	-	-	n. s.	
chloride	(100-124)	mmol/l	531	115	(98-128)	114	(90-127)	n. s.	-	-	n. d.	
matre neutrophils	(3.00-11.00)	x10 <sup>9</sup> /l	576	11.47	(0.71-39.39)	12.64	(1.27-40.91)	n. s.	-	-	n. d.	
lymphocytes	(1.00-4.00)	x10 <sup>9</sup> /l	576	1.06	(0.07-7.10)	1.05	(0.00-7.19)	n. s.	-	-	n. d.	
phosphorus	(0.97-2.36)	mmol/l	533	1.66	(0.60-4.46)	1.74	(0.58-2.75)	n. s.	-	-	n. d.	
monocytes	(0.04-0.50)	x10 <sup>9</sup> /l	577	0.28	(0.00-2.96)	0.24	(0.00-2.52)	n. s.	-	-	n. d.	
ionized calcium	(1.20-1.35)	mmol/l	356	1.19	(0.91-1.47)	1.17	(0.83-1.42)	n. s.	-	-	n. d.	

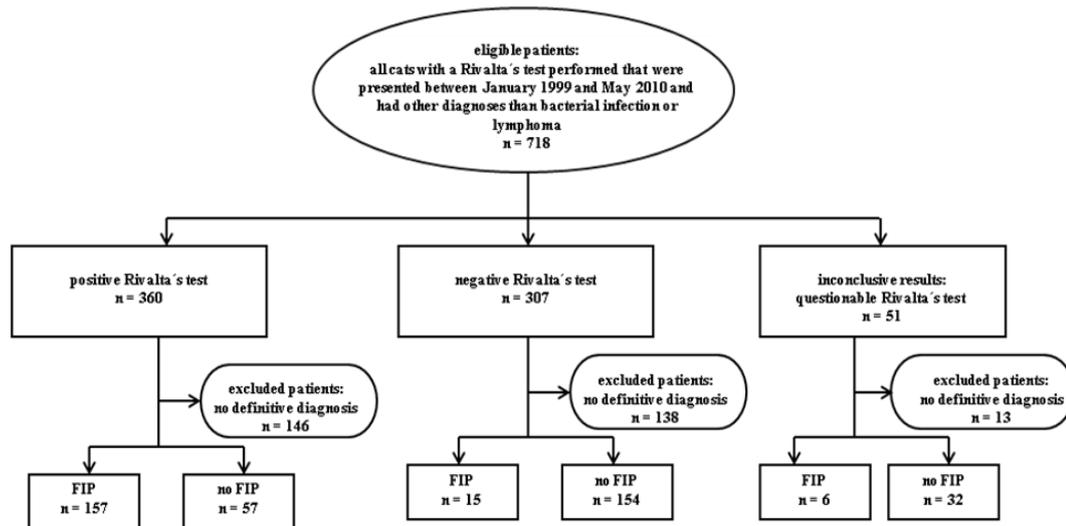
---

Multivariate analysis, multivariate logistic regression model; rr, reference range; n, number of cats included in the analysis; MWU, Mann Whitney U test; OR, Odds-ratio; CI, confidence interval; MA, multivariate analysis; n. s., not significant; n. d., not determined

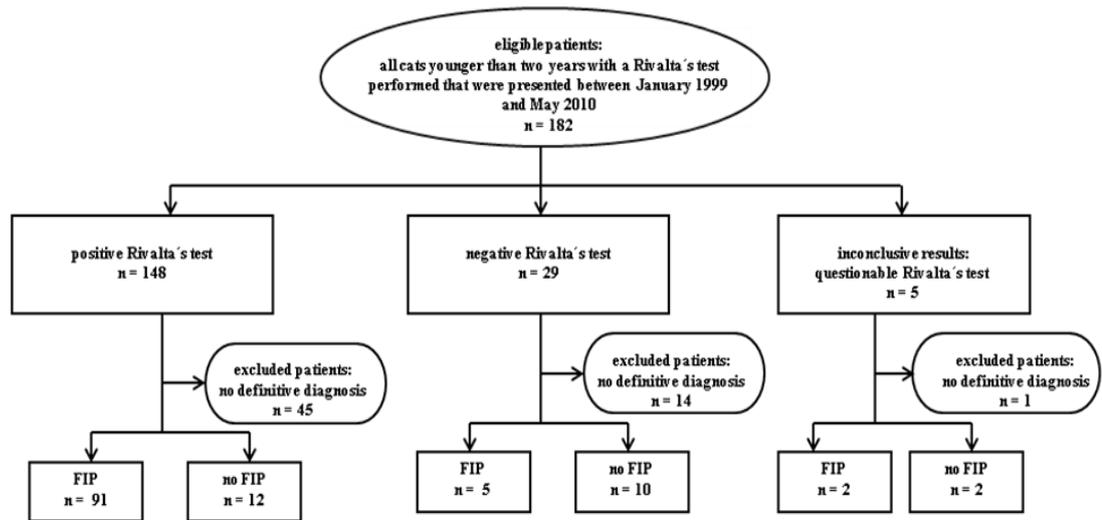
AP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; TP, total protein; RBC, red blood counts; WBC, white blood cell



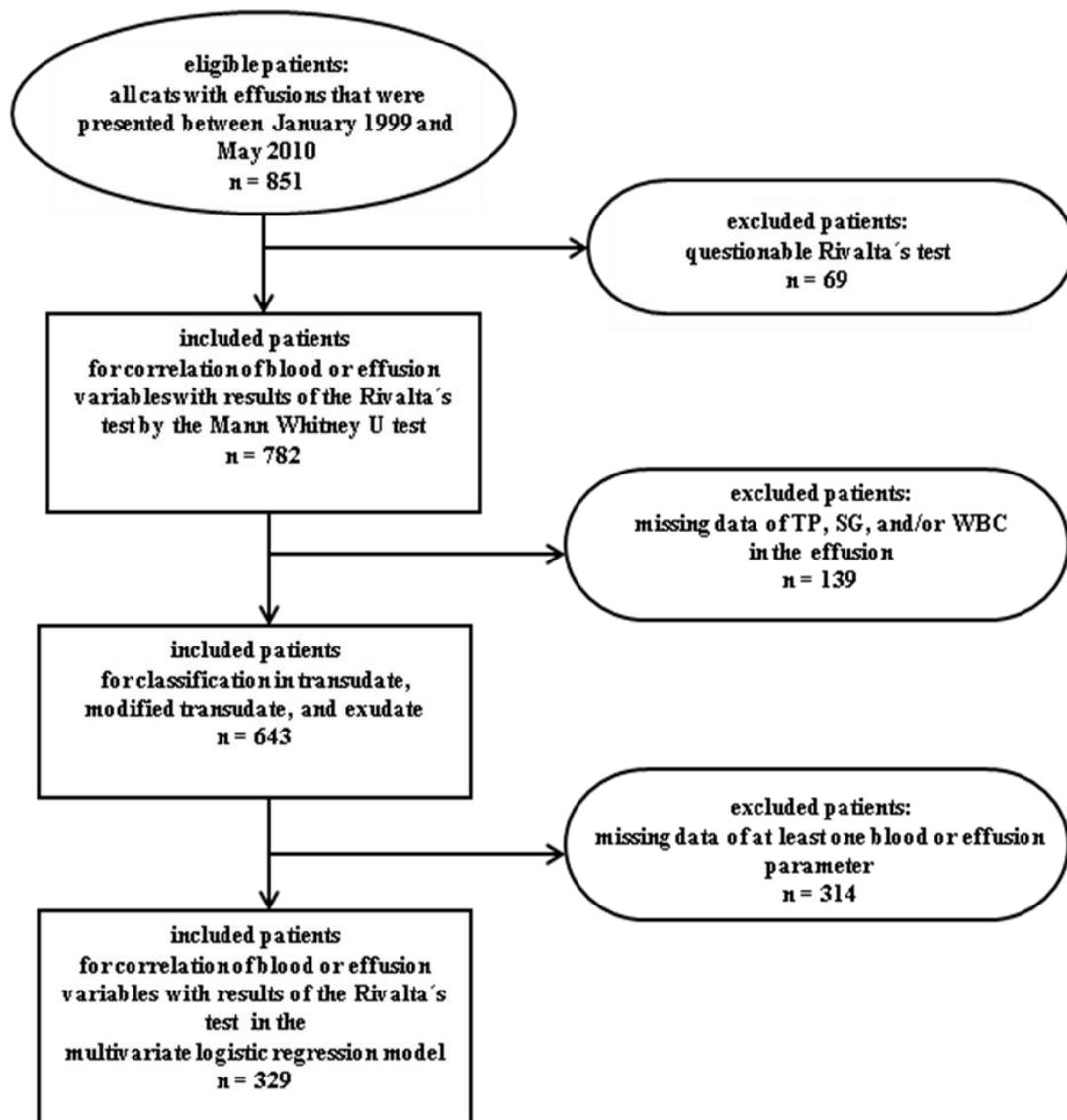
**Figure 1.** Overall population of cats used for assessing the prevalence of feline infectious peritonitis (FIP), and the diagnostic accuracy (sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value) of the Rivalta's test to diagnose feline infectious peritonitis<sup>14-15</sup>.



**Figure 2.** Population of cats excluding those with the diagnosis bacterial infection or lymphoma, used for assessing the prevalence of feline infectious peritonitis (FIP), and the diagnostic accuracy (sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value) of the Rivalta's test to diagnose feline infectious peritonitis<sup>14-15</sup>.

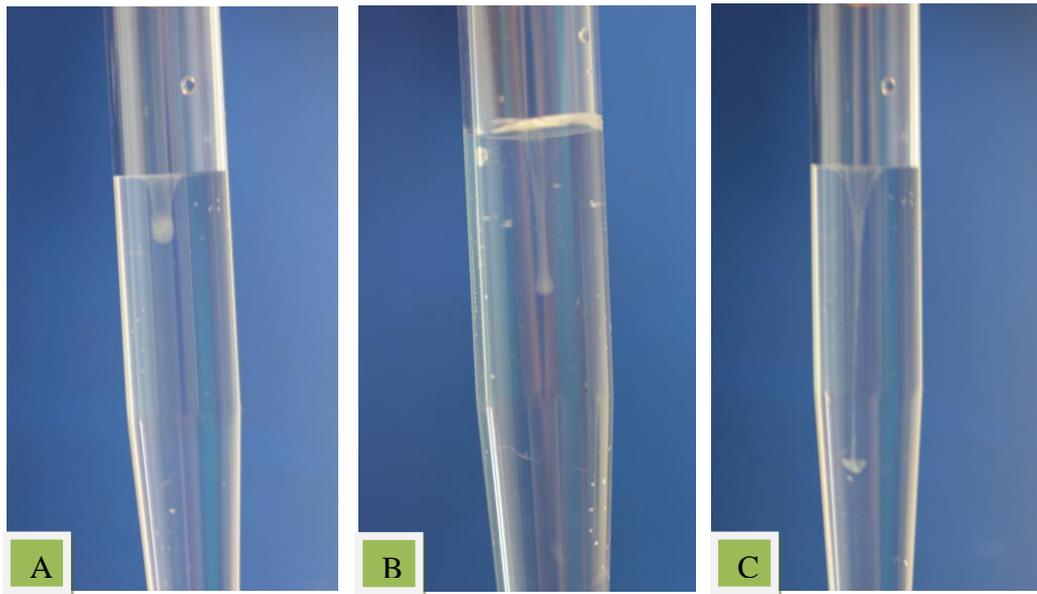


**Figure 3.** Population of cats younger than two years of age used for assessing the prevalence of feline infectious peritonitis (FIP), and the diagnostic accuracy (sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value) of the Rivalta's test to diagnose feline infectious peritonitis<sup>14-15</sup>.



**Figure 4.** Cats used for investigation of the correlation of the Rivalta's test and blood or effusion variables in the Mann Whitney U test and in the multivariate logistic regression model, and for classification in transudate, modified transudate, and exudate<sup>14-15</sup>.

TP, total protein; SG, specific gravity; WBC, white blood cells



**Figure 5.** Positive Rivalta's test

Drop attached to the solution surface and slowly floating down to the bottom of the reaction tube (A after 1 second, B after 3 seconds, C after 7 seconds)

## **IV. STUDIE II**

### **The Rivalta's Test as a Diagnostic Variable in Feline Effusions – Evaluation of Optimum Reaction and Storage Condition**

**Yvonne Fischer**<sup>1</sup>

**Karin Weber**, Dr. med. vet.<sup>1</sup>

**Carola Sauter-Louis**, Dr. med. vet., PhD (epidemiology), Dipl. ECVPH<sup>2</sup>

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

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

<sup>2</sup> Clinic for Ruminants, LMU University of Munich, Germany

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

## **The Rivalta's Test as a Diagnostic Variable in Feline Effusions – Evaluation of Optimum Reaction and Storage Condition**

Yvonne Fischer, Karin Weber, Carola Sauter-Louis, and Katrin Hartmann

### **Abstract:**

**Background:** The Rivalta's test is used to diagnose feline infectious peritonitis (FIP) in cats with effusion. However, not much information on storage and optimum reaction conditions is available in the literature, and diagnostic sensitivity and specificity to diagnose FIP vary considerably between the few available studies.

**Objectives:** The objectives of this study were to (1) examine the influence of different storage conditions on the outcome of the test, (2) evaluate interobserver variation, and (3) investigate optimum reaction conditions.

**Methods:** To determine influence of storage, the Rivalta's test was repeated up to 21 days after storage at room temperature, in the refrigerator, or in the freezer. To determine interobserver variation, the test was performed by two independent blinded investigators. To determine optimum reaction conditions, the test was performed with different volumes of acetic acid, with different acids as well as with water.

**Results:** Even after storage of 21 days the test results were comparable; best reproducibility was seen when effusion was stored in the refrigerator. While interobserver variation revealed a relative high degree of disagreement, different acids, different volumes of acetic acid, different kinds of water, and different tubes for effusion collection showed no major influence on the outcome.

**Conclusions:** The Rivalta's test seems to be a very robust test. Storage up to 21 days has no remarkable influence of the outcome of the test. Modifications in reaction condition also do not substantially influence outcome of the test. However, the test is subjective and depends on the experience of the investigator.

**Introduction:**

The Rivalta's test is an old test that is still used commonly in many European countries to diagnose feline infectious peritonitis (FIP) in cats with effusions. An Italian physician, named Fabio Rivalta, developed this test to differentiate exudates from transudates in human body cavity effusions<sup>1-2</sup>. The principle of the Rivalta's test is the creation of a drop if effusion is added to a slightly acetic solution. The Rivalta's test had a sensitivity of 98% and a specificity of 80% to diagnose FIP in cats in a large study in Germany<sup>3</sup>. Although commonly used in Germany in veterinary practice, there is only little information about its mode of action and the reasons, why the test is specifically useful to diagnose FIP. Most authors support the theory, that a positive Rivalta's reaction defines an effusion as an exudate and that the positive reaction is mostly dependant on a high total protein concentration in the effusion<sup>1, 4-6</sup>. However, others argue that not only a high total protein is responsible for a positive Rivalta's reaction, but also inflammatory mediators present in a "FIP-typical" exudate may play a role<sup>3, 7</sup>. Although commonly performed, there is also only little information available about optimization of reagents used for the Rivalta's test as well as optimum conditions for storage of the effusion to obtain reliable results. So far, no standardized protocol exists for this test<sup>6</sup>. The diagnostic values of the Rivalta's test to diagnose FIP vary considerably between different studies<sup>3, 8-9</sup>, and therefore, it also has been discussed, if the test outcome may depend on the performing persons and the test conditions. Therefore, the aims of this study were to (1) examine the influence of different storage conditions on the outcome of the test, (2) evaluate interobserver variation, and (3) investigate optimum reaction conditions.

## Materials and methods

### *(1) Collection of effusions for the evaluation of storage and reaction conditions*

To evaluate optimum storage and reaction conditions, 55 effusions of cats that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany, between January and July 2010 were collected. Each effusion was obtained by ultrasound-guided thoracocentesis or aspiration of ascites or pericardial fluid, using a 19- or 21-gauge butterfly needle connected to a closed system, fixed to a 10 ml syringe. Two to 4 ml of the effusions were filled into tubes containing EDTA as anticoagulant, and 0.5 to 2 ml were filled into a plain tube without anticoagulant for further evaluation.

Of the 55 cats, 17 cats had the final diagnosis of FIP, 38 had other underlying diseases. The diagnosis FIP was either confirmed by immunofluorescent staining of feline coronavirus (FCoV) antigen in macrophages in effusion<sup>3</sup>, by histopathological changes (if diagnostic for FIP)<sup>10-11</sup>, or immunohistochemical staining at postmortem examination<sup>12</sup>. Effusion due to heart disease (n = 14) was diagnosed using echocardiography<sup>13-14</sup>. Neoplasia (n = 12) was either diagnosed by cytology or, if not diagnostic, by histopathological examinations or necropsy<sup>15</sup>. Bacterial infections (n = 5) were confirmed by bacterial culture or detection of bacteria in cytology<sup>16-17</sup>. In seven cats, the reason for the effusion was unclear, but all seven cats recovered within a short period of time and were still healthy after four weeks. Therefore, FIP was considered extremely unlikely in these cats.

### *(2) Performance of the Rivalta's test*

The Rivalta's test (standard method) was performed as followed: a plastic test tube (volume 10 ml) was filled with 7 ml of distilled water. Twenty µl of acetic acid (100%) were added. The solution was thoroughly mixed. Twenty µl of the effusion was layered on the surface of this solution, and the behavior of this drop was observed. The test was evaluated as positive (+) if the drop stayed attached to the surface, or if the drop retained its shape and kept a connection to the surface or slowly floated down to the bottom. The test was also defined as (+), if the drop did not stay in shape, changed to an upside-down jelly fish, or dispensed in little cloudy pieces (that could be observed falling down to the bottom of the tube) (figure 1). If the drop disappeared and the solution remained clear, or if clear or

cloudy cords were falling down (which dissolved before reaching the bottom of the tube) but no drop or jelly fish was visible, the Rivalta's test was defined as negative (-).

The Rivalta's test was performed with 55 effusion within one hour after aspiration of the fluid. Of these 27 were defined as (+), 28 were defined as (-).

*(3) Influence of different storage conditions on the outcome of the Rivalta's test*

To evaluate optimum storage conditions, 2 to 4 ml of each of the 55 effusions filled in tubes containing EDTA as anticoagulant were used. Of each of the 55 collected effusions, 200 µl were stored in the refrigerator at a temperature of 4 °C (39.2 °F) for a maximum of 21 days. Another 200 µl were stored at room temperature at 20 °C (68 °F) for a maximum of 21 days. Nine eppendorf tubes containing 30 µl of effusion each were frozen at a temperature of -20 °C (-4°F) for a maximum of 21 days. To examine the influence of different storage conditions on the outcome of the test, the Rivalta's test was performed on day 0, day 1 to 7, day 14, and day 21 with the effusions stored at the different temperatures.

*(4) Interobserver variations*

To evaluate interobserver variations, the 55 effusions collected as described above were used. The test was performed independently by two persons (one experienced and one inexperienced) with all 55 effusions. Both investigators performed the test within one hour after collection. Both were blinded to the results of the other investigator.

*(5) Optimization of the reaction conditions*

To evaluate optimum reaction conditions, 2 to 4 ml of the 55 effusions collected as described above were filled in tubes containing EDTA as anticoagulant. In addition, 0.5 to 2.0 ml were filled in a plain tube without anticoagulant. The Rivalta's test was performed within one hour after collection using different conditions (see table 1). A "standard tube" (tube (S)), in which the standard protocol (as described) above was used, served as control.

First, the influence of different kinds of acid was investigated. In tube (S), 20 µl of acetic acid (100%), in tube (A2) 20 µl of distilled white vinegar (25%), and in

tube (A3) 20 µl of wine vinegar (5%) were added to the 7 ml of distilled water.

Second, to examine the influence of the amount of acids and therefore, the influence of the acidity on the outcome of the Rivalta's test, the test was performed with different volumes of acetic acid (100%); in tube (S) 20 µl (pH 3.00), and in tube (V2) 200 µl (pH 2.50) of acetic acid (100%) were added to the 7 ml of distilled water.

Third, the influence of the collection tubes and preparation of the effusion was investigated. In tube (S) the Rivalta's test was performed with 20 µl native effusion collected in a tube with EDTA, in tube (C2) the test was performed with 20 µl supernatant after centrifugation at 1500 revolutions per minute for 5 minutes and removal of the sediment of the effusion collected in a tube with EDTA, and in tube (C3) the test was performed with 20 µl native effusion collected in a plain tube without anticoagulant (serum tube).

Fourth, the influence of the kind of fluid was evaluated. Therefore, in tube (S) the Rivalta's test was performed using distilled water (tube (S)), and in tube (W) using 7 ml of normal tap water.

#### *(6) Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using statistical software SPSS version 17.0 (<http://www.spss.com>). To determine influence of different storage conditions on the outcome of the Rivalta's test, the results of the tests on day 0 were compared with the results on day 1 to day 7, day 14, and day 21 performed with effusions stored at different temperatures using a 2-way-mixed effect intraclass correlation coefficient (ICC) together with the confidence interval. The ICC is a descriptive statistic that can be used to assess the consistency or reproducibility of quantitative measurements of the same test performed at different points in time. High levels of agreement (ICC = 1) were obtained when the amount of variation caused by the method was smaller than the variability resulting from all other sources of variation. According to Landis and Koch (1977), an ICC value of less than 0.40 was considered as representing poor to slight agreement, 0.40 – 0.80 as fair to good agreement, and more than 0.80 as excellent agreement<sup>18</sup>.

To determine interobserver variation, the agreement of the results of the two persons performing the Rivalta's test was also assessed using the ICC<sup>18</sup>.

To assess the agreement of the different reaction conditions with the standard method, also the ICC was used as well<sup>18</sup>. In addition, the diagnostic sensitivity of the tests performed with different reaction conditions compared to the standard method (proportion of the different tests, which were true-positive (TP) or false-negative (FN) compared to tube (S)), and the specificity (proportion of the different tests, which were false-positive (FP) or true-negative (TN) compared to the results of the standard method (tube (S))) were evaluated when performing the Rivalta's test under different conditions<sup>18</sup>. To examine, if different reaction conditions other than the standard method showed better diagnostic values to diagnose FIP, the number of TP, FP, TN, FN results, as well as the diagnostic sensitivity to diagnose FIP (here proportion of cats that show Rivalta-positive test results among all cats with FIP), and the diagnostic specificity to diagnose FIP (proportion of cats that show Rivalta-negative test results among all cats with other diseases than FIP) were investigated.

## Results

### *(1) Influence of different storage conditions on the outcome of the Rivalta's test*

Comparison of ICC values of the Rivalta's test performed directly after obtaining the effusion with the results of the Rivalta's tests after storage at room temperature (20 °C/68 °F), in the refrigerator (4 °C/39.2 °F), or in the freezer (-20 °C/-4 °F) for up to 21 days are shown in table 2. All values showed almost perfect (or at least substantial) agreement with the result on day 0, meaning, that storage of effusions did not change the outcome of the Rivalta's test. There were only minimal differences in ICC values between the different storage options. The best values with always almost perfect agreement on all individually days were obtained when effusions were stored in the refrigerator (table 2).

### *(2) Interobserver variations*

Table 3 shows the interobserver variations as well as sensitivity and specificity to diagnose FIP of the Rivalta's test performed by the inexperienced and the experienced person. In 47/55 (85.5%) of the results, an agreement between the two persons was obtained leading to an ICC of 0.710 (confidence interval 95%: 0.550 - 0.820).

### *(3) Optimization of the reaction conditions*

Table 4 shows the results of the Rivalta's test performed with different reaction conditions compared to the standard method (tube (S)) as well as the diagnostic value of the different conditions to diagnosis FIP. The best agreement with the standard method was seen with the tube using 200 µl acetic acid (100%) (ICC = 0.927). The tube with 40 µl of distilled white vinegar showed the best sensitivity and specificity to diagnose FIP.

## Discussion

An important practical aspect of the present study that has not been addressed before was the question, if storage of the effusion has an influence on the positivity or negativity of the Rivalta's test. This study proved, that the outcome of the Rivalta's test does not change, when effusion is stored for up to three weeks at room temperature, in the refrigerator, or in the freezer. As storage in the refrigerator in general showed the best ICC values ( $\geq 0.82$ ), refrigerator storage should be recommended. But also storage in the freezer or at room temperature showed on most days almost perfect ( $ICC > 0.79$ ) (or at least substantial ( $ICC 0.60 - 0.79$ )) agreement with the results obtained on the day of tapping the effusion (table 2). Therefore, storage of effusion up to 21 days is possible without problems before performing the Rivalta's test, and effusion fluids can easily be send by regular mail to a commercial laboratory without loss of information.

However, sensitivity and specificity of the Rivalta's test to diagnose FIP vary considerably between the few available publications. Some years ago, two studies in Germany were performed, in which the Rivalta's test showed a sensitivity of 98 - 100% and a specificity of 80 - 82%<sup>3,9</sup>. Recently, two new studies in Germany were performed. In the first, the sensitivity of the Rivalta's test only reached 39% (with 8/13 false-negative results), but the specificity reached 100%<sup>8</sup>. In the other study, the sensitivity was 91% and the specificity was 66%<sup>19</sup>. Therefore it has been discussed, if these differences may depend on the performing persons and their experience. To evaluate an influence of the investigator, the Rivalta's test in the present study was performed by the two different persons under identical conditions that were blinded to the results obtained by the other person. In 8/55 (14.5%) effusions, different results between the experienced and the inexperienced persons ( $ICC 0.71$ ) were obtained, which is not a very good agreement. If the test was performed by an inexperienced person, the value of the Rivalta's test to diagnose FIP was worse (sensitivity 64.7%, specificity 63.2%) than the values of the experienced person (sensitivity 88.2%, specificity 68.4%). Therefore, the interpretation of the Rivalta's test seems to be very subjective. This may be due to the absence of clear definitions on how to interpret Rivalta's test results. As the appearance of a drop can be influenced when the test is performed manually, e. g. by the angle or fall velocity of the effusion drop, not every drop will have the same form, and the outcome can be interpreted falsely. Therefore,

more clear descriptions on how a positive Rivalta's reaction is defined might be helpful.

The recipes of the Rivalta's test and explanation, how it should be performed differ in the literature, e. g. concerning details about the volumes of distilled water (e. g., 5 ml, 7-8 ml,  $\frac{3}{4}$  of the reagent tube)<sup>3, 7, 20</sup>. As "one drop" (in most descriptions "one drop of acetic " is added to the distilled water, and "one drop of effusion" is then added to the reaction tube) is also a very imprecise instruction. Therefore, because there is no standardized method in literature<sup>6</sup>, a standardized method was first defined in the paper. Instead of " $\frac{3}{4}$  of the reagent tube"<sup>7</sup>, 7 ml were used. Instead of "one drop", 20  $\mu$ l were used. However, as shown in table 4, different reaction conditions did hardly change the outcome and still had an almost perfect agreement with the standard method (tube (S)).

Acetic acid obviously can be used as well as commercial acid (in this study distilled white vinegar or vine vinegar was chosen). In this study, the amount of the lower concentrated vinegars was increased, so that approximately the same pH value was achieved as if using a smaller amount of acetic acid (100%). Using 40  $\mu$ l distilled white vinegar even leads to better sensitivity and specificity to diagnose FIP. In an older study with human body fluids, diagnostic value of the Rivalta's test the use of other acids (hydrochloric acid (35-37%) and nitric acid (60-62%)) was also investigated. In that study, however, results obtained with different kinds of acid were actually quite different; of 39 samples, 32 were judged as positive when using acetic acid. With hydrochloric acid, only 29 and with nitric acid, 34 of the 39 samples were positive. It was not described in detail which amounts of each acid were used, but the tests were performed within the same pH range (3.0 – 5.0)<sup>6</sup>. Maybe, it is not important which kind of acetic acid is used, but it should be some type of vinegar, and no any other source of acid. In the present study, no other acid was examined, but it did not seem to be very important which type of vinegar is used.

It was also investigated whether the amount of acid and/or the pH value play a role. There was no major difference in outcome using 20  $\mu$ l (pH 3.00) or with 200  $\mu$ l (pH 3.06) of acetic acid (100%) in this study. Interestingly, this is contrary to an investigation of Sakai et al. (2004), who found, that the percentage of positive results in human effusions rapidly changes when pH value is  $< 3.8$ <sup>6</sup>. As nearly all Rivalta's tests in the present study were performed in solutions with pH

values much less than 3.8 (see table 1; only the performance with tap water had a pH value of 3.84), it can be speculated, that in feline effusions other substances (e. g., different proteins) in the effusion may be responsible for a positive outcome and the reaction may not be influenced by the lower pH<sup>6</sup>.

The influence of collection tubes and preparation of the effusion was also assessed. The type of tube in which the effusion was collected after aspiration did not seem to be important (table 4). It can be either a tube with EDTA, or a serum tube. Even the supernatant of an effusion can be used, if the effusion, for example, was already centrifuged for cytology. This actually shows that the inflammatory cells themselves cannot be responsible for a positive Rivalta's reaction, as those had been removed when supernatant was used.

The Influence of the type of water for the Rivalta's test was also investigated. Interestingly, outcome of the Rivalta's test did not change when tap water was used instead of distilled water. The solution with tap water had a much higher pH value (pH 3.84) than the solutions with distilled water (pH 3.00), at least using Munich tap water, as pH values differ from region to region. But even when performing the test using solutions of different pH, the outcome did not change.

There are some limitations in this study. One limitation is the subjectivity of this test. As shown with the high interobserver variation, it cannot be excluded that even when the experienced person performed the test, other factors (e. g., distance and fall velocity of the effusion-drop) influenced outcome. As the test is always performed manually and judged visually, the results remain somehow subjective to individual interpretation.

In conclusion, this study shows, that the Rivalta's test is a very robust test. It can be performed without any problems after a storage period of up to 21 days. The best method of storage is in the refrigerator. It more or less makes no difference, which type of acetic acid and which water is used or in which tubes the effusion is collected. The results hardly change with some modifications of the standard protocol. The interobserver variation, however, showed, that the Rivalta's test remains a very subjective test, and that a standardization of the interpretation criteria would be useful to increase the sensitivity and specificity of the Rivalta's test to diagnose FIP.

## References

1. Berti-Bock G, Vial F, Premuda L, Rulliere R. [Exudates, transudates and the Rivalta reaction (1895). Current status and historical premises]. *Minerva Med.* 1979;70:3573-3580.
2. Rivalta F. Su di una nuova reazione per la diagnosi chimica differenziale fra gli essudati sierosi e i semplici trasudati. *La Riforma Medica.* 1895;242.
3. 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.
4. Staehelin R. Ueber den durch Essigsäure fällbaren Eiweisskörper der Exsudate und des Urins. *Munch Med Wochenschr.* 1902;34:1413-1415.
5. Matraccia S, Campo G, Titone C. [Interaction between globin and Rivalta-positive colloids.]. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1963;39:148-149.
6. Sakai N, Iijima S, Shiba K. Reinvestigation of clinical value of Rivalta reaction of puncture fluid. *Rinsho Byori.* 2004;52:877-882.
7. Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;35:39-79.
8. Held S, König, M., Hamann, H.-P., Neiger, R. *Evaluierung diagnostischer Tests für feline infektiöse Peritonitis (FIP) bei Katzen mit Aszites (abstract).* Leipzig: InnLab DVG;2011.
9. Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, Frost J, Lutz H, Kraft W. [Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis]. *Tierarztl Prax.* 1995;23:92-99.
10. Addie DD, Paltrinieri S, Pedersen NC. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J Feline Med Surg.* 2004;6:125-130.
11. 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;129:209-212.
12. 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;49:177-182.
13. Bonagura JD. Feline echocardiography. *J Feline Med Surg.* 2000;2:147-151.
14. Ferasin L. Feline myocardial disease 2: diagnosis, prognosis and clinical management. *J Feline Med Surg.* 2009;11:183-194.
15. Hirschberger J, DeNicola DB, Hermanns W, Kraft W. Sensitivity and specificity of cytologic evaluation in the diagnosis of neoplasia in body fluids from dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 1999;28:142-146.
16. Barrs VR, Beatty JA. Feline pyothorax - new insights into an old problem: part 1. Aetiopathogenesis and diagnostic investigation. *Vet J.* 2009;179:163-170.
17. Ottenjann M, Lubke-Becker A, Linzmann H, Brunnberg L, Kohn B. [Pyothorax in 26 cats: clinical signs, laboratory results and therapy (2000-2007)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2008;121:365-373.
18. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-174.
19. Fischer Y, Sauter-Louis, C., Hartmann, K. *Die Rivalta-Probe zur*

---

*Diagnose der feline infektiösen Peritonitis - retrospektive Auswertung von 782 Ergüssen (abstract). Leipzig: InnLab DVG;2011.*

20. 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.

**Table 1.** Tube preparation for the Rivalta's test to examine the optimum reaction conditions. Each tube was prepared with distilled (or tap) water, and a drop of a defined volume of acids (in different concentrations) was added; the solution was mixed; a drop of 20  $\mu\text{l}$  of the effusion was layered on the surface of this solution and the creation of a drop was observed;

	preparation of the reagent tube				pH values**
	distilled water	tap water	acetic acid (100%)	distilled white vinegar (25%)	
<b>acids</b>					
tube (S)*	7 ml		20 $\mu\text{l}$		3.00
tube (A2)	7 ml		40 $\mu\text{l}$		2.99
tube (A3)	7 ml		200 $\mu\text{l}$		3.06
<b>volumes of acid</b>					
tube (V2)	7 ml		200 $\mu\text{l}$		2.50
<b>collection method</b>					
tube (C2)	7 ml		20 $\mu\text{l}$		3.00
tube (C3)	7 ml		20 $\mu\text{l}$		3.00
<b>performance with tap water</b>					
tube (W)		7 ml	20 $\mu\text{l}$		3.84

	added substances	
	native effusion (EDTA tube)	supernatant (EDTA tube)
	20 $\mu\text{l}$	native effusion (serum tube)
	20 $\mu\text{l}$	
	20 $\mu\text{l}$	
	20 $\mu\text{l}$	
	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
	20 $\mu\text{l}$	

\* tube (S) = standard method; \*\* these pH values are the mean values of 6 measurements

**Table 2.** Comparison of intraclass correlation coefficient (ICC) of the Rivalta's test results performed directly after obtaining the effusion with the results after storage at room temperature (20 °C/68 °F), in the refrigerator (4 °C/39.2 °F), or in the freezer (-20 °C/-4 °F); intraclass correlation coefficients > 0.79 show an almost perfect agreement; intraclass correlation coefficients > 0.59 show a substantial agreement; intraclass correlation coefficients < 0.60 are considered moderate to poor agreement.

Interclass correlation coefficient (confidence interval 95%)						
days after aspiration	room temperature (20 °C/68 °F)		refrigerator (4 °C/39.2 °F)		freezer (-20 °C/-4°F)	
day 1	0.857	(0.766 - 0.914)	0.891	(0.821 - 0.935)	0.854	(0.763 - 0.912)
day 2	0.857	(0.766 - 0.914)	0.857	(0.766 - 0.914)	0.819	(0.708 - 0.890)
day 3	0.857	(0.766 - 0.914)	0.857	(0.766 - 0.914)	0.819	(0.708 - 0.890)
day 4	0.823	(0.714 - 0.893)	0.857	(0.766 - 0.914)	0.819	(0.708 - 0.890)
day 5	0.784	(0.656 - 0.868)	0.891	(0.821 - 0.935)	0.854	(0.763 - 0.912)
day 6	0.823	(0.714 - 0.893)	0.857	(0.766 - 0.914)	0.854	(0.763 - 0.912)
day 7	0.863	(0.776 - 0.918)	0.863	(0.776 - 0.918)	0.854	(0.763 - 0.912)
day 14	0.790	(0.664 - 0.872)	0.819	(0.708 - 0.890)	0.819	(0.708 - 0.890)
day 21	0.823	(0.714 - 0.893)	0.857	(0.766 - 0.914)	0.782	(0.653 - 0.867)

°C, degree *Celsius*; °F, degree *Fahrenheit*

**Table 3.** Interobserver variation and ability to predict feline infectious peritonitis comparing an experienced and an inexperienced investigator performing the Rivalta's test.

	inexperienced person	experienced person	agreement
all effusions			47/55 (85.5%)
positive results	25/55 (45.5%)	27/55 (49.1%)	22/55 (40.0%)
negative results	30/55 (54.5%)	28/55 (50.9%)	25/55 (45.5%)
TP	11/17 (64.7%)	15/17 (88.2%)	11/55 (20.0%)
TN	24/38 (63.2%)	26/38 (68.4%)	17/55 (30.9%)
FP	12/38 (31.6%)	14/38 (36.8%)	14/55 (25.5%)
FN	2/17 (11.8%)	6/17 (35.3%)	2/55 (3.6%)
sensitivity	64.7%	88.2%	
specificity	63.2%	68.4%	

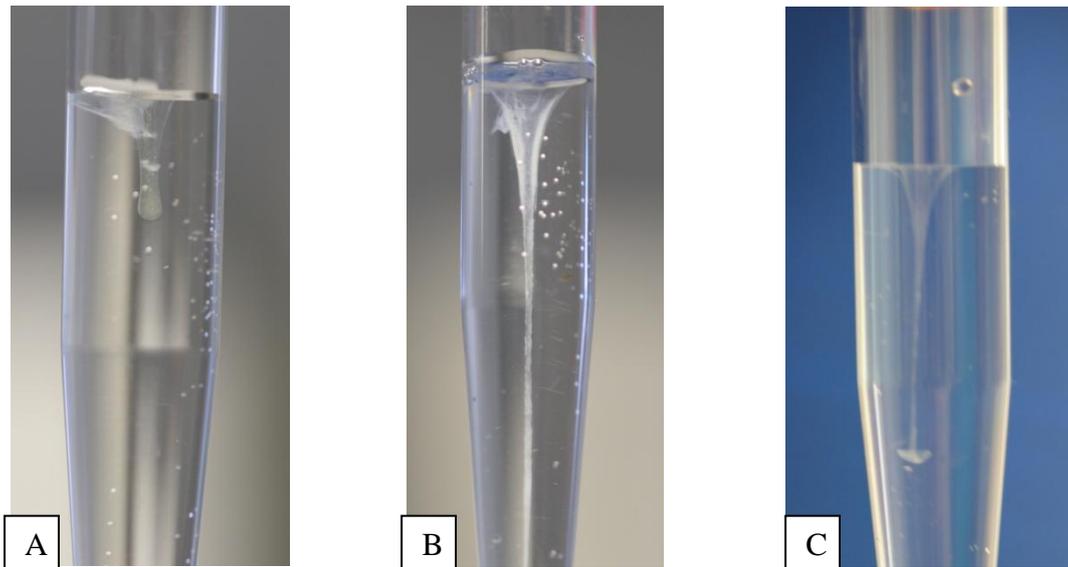
TP, true-positive; TN, true-negative; FP, false-positive; FN, false-negative

**Table 4.** Results of the performance of different reaction conditions compared to the standard method tube (S)), as well as diagnostic values of the different conditions to diagnose feline infectious peritonitis. The table shows the number of tests, that were positive (+) and negative (-), the number of true-positive (TP), false-positive (FP), true-negative (TN), false-negative (FN), and the diagnostic sensitivity (sens) and specificity (spec) in comparison with the standard method and with diagnosis feline infectious peritonitis.

Agreement with standard method (tube (S)*)													Agreement with diagnosis FIP				
total	(+)	(-)	TP	FP	TN	FN	sens	spec	ICC (CI 95%)	TP	FP	TN	FN	sens	spec		
<b>acids</b>																	
tube(S)	55	27	28	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a. (n.a.)	15	12	26	2	88.2	68.4		
tube(A2)	55	25	30	1	27	3	88.9	96.4	0.857 (0.766-0.914)	16	9	29	1	94.1	76.3		
tube(A3)	55	26	29	1	27	2	92.6	96.4	0.891 (0.821-0.935)	16	10	28	1	94.1	73.7		
<b>volumes of acid</b>																	
tube(V2)	55	27	28	1	27	1	96.3	96.4	0.927 (0.878-0.957)	16	11	27	1	94.1	71.1		
<b>collection method</b>																	
tube(C2)	55	24	31	2	26	5	81.5	89.7	0.749 (0.606-0.846)	15	9	29	2	88.2	76.3		
tube(C3)	55	24	31	0	28	3	88.9	100.0	0.902 (0.839-0.941)	15	9	29	2	88.2	76.3		
<b>performance with tap water</b>																	
tube(W)	55	26	29	1	27	2	92.6	96.4	0.891 (0.821-0.935)	15	11	27	2	88.2	71.1		

---

(+), Rivalta´s test positive; (-), Rivalta´s test negative; TP, true-positive; FP, false-positive; TN, true-negative; FN, false-negative; sens, sensitivity; spec, specificity; ICC, intraclass correlation coefficient; CI, confidence interval; n. a., not applicable;



**Figure 1.** Positive Rivalta's tests

A. drop retaining its shape; B. drop keeping connection to the surface; C. drop floating down to the bottom like a jelly fish

**V. STUDIE III****Randomized, Placebo Controlled Study of the Effect of Propentofylline on Survival Time and Quality of Life of Cats with Feline Infectious Peritonitis****Yvonne Fischer**<sup>1</sup>**Susanne Ritz**, Dr. med. vet.<sup>1</sup>**Karin Weber**, Dr. med. vet.<sup>1</sup>**Carola Sauter-Louis**, Dr. med. vet., PhD (epidemiology), Dipl. ECVPH<sup>2</sup>**Katrin Hartmann**, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA<sup>1</sup><sup>1</sup> Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany<sup>2</sup> Clinic for Ruminants, LMU University of Munich, Germany**Journal of Veterinary Internal Medicine, veröffentlicht*****J Vet Intern Med* 2011;25:1270–1276**

*J Vet Intern Med* 2011;25:1270–1276

## Randomized, Placebo Controlled Study of the Effect of Propentofylline on Survival Time and Quality of Life of Cats with Feline Infectious Peritonitis

Y. Fischer, S. Ritz, K. Weber, C. Sauter-Louis, and K. Hartmann

**Background:** Currently there is no drug proven to effectively treat cats with feline infectious peritonitis (FIP).

**Hypothesis:** Propentofylline (PPF) can decrease vasculitis, and therefore prolong survival time in cats with FIP, and increase their quality of life.

**Animals:** Twenty-three privately owned cats with FIP.

**Methods:** Placebo-controlled double-blind trial. FIP was confirmed by histology or immunostaining of feline coronavirus (FCoV) antigen in effusion or tissue macrophages or both. The cats were randomly selected for treatment with either PPF or placebo. All cats received additional treatment with glucocorticoids, antibiotics, and low molecular weight heparin according to methods.

**Results:** There was no statistically significant difference in the survival time of cats treated with PPF (8 days, 95% CI 5.4–10.6) versus placebo (7.5 days, 95% CI 4.4–9.6). The median survival time of all cats was 8 days (4–36 days). There was neither a difference in quality of life (day 7,  $P = .892$ ), in the amount of effusion (day 7,  $P = .710$ ), the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) concentration (day 7,  $P = .355$ ), nor in any other variable investigated in this study, including a complete blood count, and a small animal biochemistry profile.

**Conclusions and Clinical Importance:** This study did not detect an effect of PPF on the survival time, the quality of life, or any clinical or laboratory parameter in cats with FIP. Therefore, PPF does not appear to be an effective treatment option in cats with a late stage of the disease FIP.

**Key words:** FIP; Feline corona virus; Methylxanthine derivative; Vasculitis.

Feline infectious peritonitis (FIP) is one of the most frequent causes of death in young cats.<sup>1–2</sup> There is no proven record of cats with a confirmed diagnosis having recovered from FIP.<sup>3</sup> Thus, FIP is usually lethal; no controlled study has verified the success of any treatment used to date.<sup>1,4–6</sup> Therefore, providing objective evidence of the effectiveness of any treatment against this disease is important.

Several case reports can be found in the online Veterinary Information Network (<http://www.VIN.com>) that describe a positive effect of the methylxanthine derivative pentoxifylline (PTX) (Trental<sup>®</sup>) on the survival time in cats with FIP. Several veterinarians and well-known specialists in feline medicine have suggested that the use of PTX can be effective in treating cats with FIP.<sup>4,6–8</sup> According to those reports, PTX does not cure but is suggested to prolong the life of these cats.<sup>4–5,8</sup> In these reports it has been suggested that PTX is likely to decrease vasculitis, which is responsible for the majority of clinicopathological findings of FIP.<sup>1</sup> The mode of action of the methylxanthine derivatives is not fully understood, and the mechanism remains unknown.<sup>9–10</sup> The PTX inhibits

### Abbreviations:

ALT	alanine aminotransferase
AP	alkaline phosphatase
CI	confidence interval
FCoV	feline coronavirus
FeLV	feline leukemia virus
FIP	feline infectious peritonitis
FIPV	feline infectious peritonitis virus
FIV	feline immunodeficiency virus
IFAT	immunofluorescent antibody technique
PPF	propentofylline
PTX	pentoxifylline
RBC	red blood cells
SPSS	statistical package for the social sciences
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TP	total protein
WBC	white blood cells

several cytokines, such as interleukines and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).<sup>9</sup> There are studies in rats and humans (in vivo and in vitro) describing the inhibition of cytokines by PTX,<sup>11–15</sup> and PTX and other methylxanthine derivatives seem to suppress TNF- $\alpha$  synthesis.<sup>15</sup> These proinflammatory cytokines play a major role in the pathogenesis of vasculitis.<sup>16</sup> Therefore, it has been suggested that vasculitis may be effectively controlled with PTX because of its effect in neutralizing or suppressing these cytokines.<sup>11–15</sup> Propentofylline (PPF) and PTX have mainly been trialed for use in people with peripheral vascular diseases,<sup>17–20</sup> cerebrovascular diseases (such as Alzheimer's disease, brain ischemia, or cerebrovascular insufficiency),<sup>9,20–22</sup> endotoxemia,<sup>14,23</sup> and ischemic heart disease.<sup>20,24</sup> TNF- $\alpha$  also induces fibrinogen synthesis,<sup>25–27</sup> and is responsible for an increased production of free radicals

*From the Clinic of Small Animal Medicine (Fischer, Ritz, Weber, Hartmann) and the Clinic for Ruminants LMU (Sauter-Louis), University of Munich, Munich, Germany. This study was performed at the Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Munich, Germany.*

*Corresponding author: Katrin Hartmann, Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany; e-mail: hartmann@lmu.de*

*Submitted April 20, 2011; Revised June 14, 2011; Accepted August 15, 2011.*

*Copyright © 2011 by the American College of Veterinary Internal Medicine*

*10.1111/j.1939-1676.2011.00806.x*

which cause endothelial cell damage.<sup>28</sup> By inhibiting the synthesis of TNF- $\alpha$  by activated monocytes, PTX can probably decrease fibrinogen levels, a common component of the effusion in cats with FIP.<sup>10,19</sup> It was previously postulated that high fibrinogen levels could be an index of TNF- $\alpha$  levels. This finding is supported by a close correlation between decreased fibrinogen levels and clinical improvement.<sup>19</sup> A study into geriatric cachexia in humans additionally showed that PTX may decrease cachexia by down-regulating proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , interleukin 1 and 6, serotonin, and interferon- $\gamma$ . Because cats with FIP are often anorectic, this was considered to be another positive effect of the methylxanthine derivatives on the well-being of cats with FIP.<sup>24,29</sup>

PPF, another methylxanthine derivative, is licensed in several European countries (including Germany) for veterinary use in dogs. It is very similar to PTX (which is not licensed in Germany for veterinary use) in its chemical structure as well as in its pharmacological effects.<sup>30-31</sup> Both PTX and PPF inhibit several cytokines, such as interleukins and TNF- $\alpha$ .<sup>9</sup> Furthermore, PPF has already been applied securely and effectively to cats with feline asthma.<sup>32</sup> Therefore, PPF instead of PTX was used in this study.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of PPF on the survival time and quality of life in cats with a confirmed diagnosis of FIP in a placebo-controlled double-blind trial.

## Materials and Methods

### Sample Population

The study included 23 client-owned cats. Inclusion criterion to enter the study was the definitive diagnosis of FIP. All cats were presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine, LMU University of Munich, Germany. An informed consent of participation signed by the owners was obtained for all cats. This study fulfilled the general German guidelines for prospective studies with owners' consents and was approved by the ethics committee and the animal protection officials of the Regierung von Oberbayern, Germany (permission no. 55.2-1-54-2531-127-09). Consecutive cases of cats with confirmed FIP that had owners willing to participate in the study, presented to the clinic between April 2009 and December 2010, were entered into the study.

Diagnosis of FIP was either confirmed by detection of feline coronavirus (FCoV) antigen in macrophages in the effusion using direct immunofluorescence<sup>33</sup> (n = 9), by histopathological examination of tissue, positive immunohistochemical staining of FCoV antigen in macrophages<sup>34</sup> (n = 22), or by both. Cats with feline immunodeficiency virus (FIV) or progressive feline leukemia virus (FeLV) infection were not included in the study (SNAP FeLV/FIV test<sup>®</sup>). Cats with severe clinical signs (Karnofsky's score<sup>35</sup> <30%) or a survival time less than 72 hours after treatment initiation were retrospectively excluded (2 cats). One cat had to be excluded in retrospect because of a lack of owner compliance.

Seventeen of the 23 cats (74%) were European Shorthair cats, 2 (9%) were British Shorthair cats, and there was one (4%) of each of the following breeds: Birman, Persian, Norwegian Forest cat, and Persian crossbred. The youngest cat was 13 weeks old and the oldest cat 2.8 years (mean, 0.9 years; median, 0.7 years; interquartile range, 0.42–1.25 years). Fifteen (65%) cats were

younger than 12 months; 20 (87%) cats were younger than 2 years. Seventeen (74%) cats were male (5 neutered), and 6 (26%) female (2 neutered).

### Study Design

The study was designed as a placebo-controlled, double-blind randomized trial. Cats were randomly assigned to the PPF (n = 7) or placebo group (n = 16). The dosage of PPF was based on the dosage used of PTX to treat cats with FIP in the literature and anecdotal case reports of different authors. In those reports, 10–15 mg/kg or 100 mg/cat every 12 hours was given PO.<sup>6</sup> According to studies in humans, PPF and PTX are used at the same dosage.<sup>36</sup> Cats in this study therefore received a median dosage of 18–25 mg/kg PPF<sup>c,d</sup> during the whole study period. Alternatively, cats received the similar amount of tablets of placebo<sup>e</sup> (containing lactose, magnesium stearate, and cellulose) every 12 hours PO. The PPF and the placebo pills were coded. Therefore, veterinarians and owners giving the pills were blinded to identity of the treatment. The code was broken after 23 cats had been treated. All results (including survival time, Karnofsky's score, blood and effusions variables, and volume of collected effusion) were obtained blinded.

All cats were also treated with glucocorticoids. In case of effusion at day of presentation (n = 21), dexamethasone<sup>f</sup> (1 mg/kg) was given intraperitoneally or intrathoracically (depending on the location of effusion) every 24 hours for 6 days after thoraco- or abdominocentesis. Cats without effusion (n = 2) received dexamethasone<sup>f</sup> (1 mg/kg) SC for 6 days. After this period, all cats were treated with oral prednisolone<sup>g,h</sup> (2 mg/kg) every 24 hours until death. In addition, cats received amoxicillin/clavulanic acid<sup>i</sup> (12.5 mg/kg IV every 12 hours) for 7 days; dalteparin sodium<sup>j</sup> (75 IU/kg SC every 12 hours) for 5 days, which was gradually tapered within the next 2 days (day 6: 36 IU/kg, day 7: 18 IU/kg); as well as fluid and nutritional treatment if necessary during the hospitalization. If the cats were not properly vaccinated, they were treated SC with one dose (4 mL) of immunglobulins<sup>k</sup> (a product containing antibodies against feline panleukopeniavirus, feline herpesvirus, and feline calicivirus). This product was given to decrease the risk of acquiring an infectious disease because of immune suppression by glucocorticoid treatment and hospitalization. Glucocorticoids were given, because it is currently the only treatment thought to have a beneficial effect on cats with FIP although there are no controlled studies.<sup>3,37</sup> Antibiotics were administered to minimize the risk of bacterial infection because paracentesis was performed daily (if effusion was present), and because of the high dosage of glucocorticoid treatment. Cats also received low molecular weight heparin (dalteparin sodium) to minimize the risk of a disseminated intravascular coagulation (DIC), which is often observed in cats with FIP.<sup>1,38-39</sup>

### Examination Schedule

All cats were either hospitalized during the 1st 7 days after treatment initiation or had to be presented to the clinic daily. Physical and ultrasound examinations were performed daily. The general condition was characterized by the Karnofsky's score. The index enables judgment of quality of life and well-being in cats by means of a score of 0% (dead) to 100% (absolutely healthy and happy).<sup>35</sup> On day 0 (day of inclusion in the study) as well as on the control days (day 7, 14, and 28), a complete physical examination was performed, and blood was collected. A CBC was performed with an automatic analyzer (Cell-Dyn<sup>®</sup>), the small animal biochemistry profile (see Table 1) was examined using an automatic analyzer (Hitachi<sup>®</sup>). Aliquots of the serum samples were preserved at -80°C for detection of TNF- $\alpha$ . If present,

**Table 1.** Variables on day 0 and *P*-values of all parameters showing or denying a significant difference between the cats of the propentofylline and the placebo group on days 0, 7, and 14.

Parameter	(RR)	Unit	Day 0		Day 0		Day 0	Day 7	Day 14
			Median	(1–3 quartile)	Median	(1–3 quartile)	PPF vs	PPF vs	PPF vs
							Placebo	Placebo	Placebo
Karnofsky's score		%	70	(55–80)	70	(70–80)	.405	.892	n.d.
Amount of effusion		Code*	2*	(1–4)*	2*	(1–4)*	.536	.710	.237
RBC	(5.00–1.00)	$\times 10^{12}/L$	8.83	(6.72–9.42)	7.38	(5.78–7.81)	.181	.572	.699
Hemoglobin	(5.60–9.30)	mM	5.88	(5.40–7.88)	5.94	(5.32–6.44)	.825	.396	1.000
Hematocrit	(0.30–.44)	L/L	0.31	(0.28–.40)	0.29	(0.20–.32)	.160	.570	.051
Platelets	(180–550)	$\times 10^9/L$	255	(220–310)	230	(154–311)	.673	.357	.076
WBC	(6.00–11.00)	$\times 10^9/L$	9.98	(8.16–19.80)	13.75	(11.73–17.70)	.316	.777	.245
Monocytes	(0.04–0.50)	$\times 10^9/L$	0.29	(0.14–.31)	0.37	(0.09–.59)	.786	.260	.683
Lymphocytes	(1.00–4.00)	$\times 10^9/L$	1.06	(0.53–1.54)	1.18	(0.70–1.68)	.504	.396	.053
Band neutrophils	(0.00–.60)	$\times 10^9/L$	0.56	(0.07–2.39)	0.80	(0.24–1.05)	.905	.089	.245
Mature neutrophils	(3.00–11.00)	$\times 10^9/L$	7.39	(6.31–16.11)	11.53	(8.93–15.13)	.316	.888	.439
ALT	(0–114)	U/L	27	(26–65)	35	(23–55)	.640	.537	.348
AP	(0–94)	U/L	14	(12–23)	13	(9–18)	.402	.535	.100
Bilirubin	(0.0–4.7)	$\mu M$	13.5	(3.1–27.2)	15.5	(8.5–45.7)	.385	.877	.064
TP	(57.0–94.0)	g/L	82.5	(71.7–93.1)	69.6	(61.8–82.1)	.229	.758	.064
Albumin	(26.0–56.0)	g/L	24.6	(20.9–25.4)	22.5	(19.7–23.9)	.423	.439	.643
Alb/glob ratio	n.r.	n.r.	0.46	(0.29–.57)	0.43	(0.35–.51)	.789	.279	1.000
Urea	(5.0–11.3)	mM	6.1	(5.1–6.7)	6.3	(5.5–7.9)	.815	.589	.165
Creatinine	(0.0–169.0)	$\mu M$	61.9	(51.5–68.0)	56.8	(38.8–82.0)	.947	.938	.355
Glucose	(3.7–6.9)	mM	6.1	(4.9–6.5)	5.5	(5.2–6.8)	.947	.643	.355
TNF- $\alpha$ in the serum	n.r.	pg/mL	8.48	(0.00–24.77)	15.09	(4.91–26.31)	.093	.355	n.d.

PPF, propentofylline; vs, versus; RR, reference range, n. d., not done; Karnofsky, Karnofsky's score, RBC, red blood cells; WBC, white blood cells; ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; TP, total protein; n. r., no reference values available.

\*Code: 1 = 0–30 mL; 2 = 31–60 mL; 4 = >150 mL.

effusion was aspirated, and the amount was recorded. Depending on their health status, cats were returned to their owners after day 7. The owners were asked to fill in a provided diary recording temperature, respiratory rate, weight, general condition (duration of sleeping time, eating, playing, and grooming behavior) every day, as well as any problem noticed by the owners. Follow-up examinations in the clinic were scheduled on days 7, 14, and 28, including physical examination, examination of a CBC, a small animal biochemistry profile, and ultrasound to detect the presence of effusion.

#### Measurement of TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  was measured in the serum (on day 0, 7, 14, and 28) using an ELISA.<sup>8</sup> Because the ELISA is only validated for cell culture supernatants, a spiking experiment using serum samples was performed. Serum components can impact the accuracy of ELISA results and may interfere with antibody binding or show cross-reactivity. To assess recovery of serum samples and to assess accuracy of measured values, 200 pg TNF- $\alpha$  were spiked into a serum sample of a healthy cat. The sample was diluted in sample diluent (PBS<sup>9</sup> + 10% fetal calf serum<sup>9</sup>) 2-fold to yield samples containing 100, 50, and 25 pg. As a control, sample diluent was spiked and diluted accordingly. The spiked undiluted control yielded results in the expected range (89%). The spiked undiluted serum sample showed recovery of 65%, indicating inhibitors of detection in the serum. The serum at a 1 : 2 dilution showed recovery of 73% compared to 88% of the diluted con-

trol. The recovery loss of 15% was considered acceptable, and interference of inhibiting components appeared to be not severe; all serum samples were therefore diluted 1 : 2 for detection of TNF- $\alpha$ . The ELISA was performed according to the manufacturer's instructions. A 96-well microplate<sup>10</sup> was coated with capture antibody by overnight incubation. The next day, the wells were washed and samples (diluted 1 : 2) and standards<sup>11</sup> were incubated for 2 hours at room temperature. After washing, the detection antibody<sup>12</sup> was added and incubated for another 2 hours at room temperature. For detection, streptavidin-HRP<sup>13</sup> was used with tetramethylbenzidine<sup>14</sup> as a substrate solution. The reaction was stopped after 10 minutes with 0.5 M sulfuric acid.<sup>15</sup> The ELISA was measured with a Bio Tek Reader,<sup>16</sup> and the data analysis was performed using Gen5 Data Analysis software.<sup>17</sup>

#### Statistical Evaluation

All cats were randomly assigned to 2 groups, the PPF group and the placebo group. A power analysis had been performed before starting the study (using PASS, 2008; <http://www.ncss.com/pass>). For this analysis, a clinical relevant difference in median survival time was set at 21 days, assuming that animals treated with PPF would survive at least 21 days longer than animals receiving placebo. These differences could have been detected with 18 animals per group, using a power of 80% and a significance level of 5%. However, an interim analysis on the survival time was performed after 23 cats had been treated, because most cats in the study at that time point have survived for less than

29 days, and the median survival time was not significantly different between the groups (median survival time PPF: 8.0 days; placebo: 7.5 days). Therefore, it was decided to terminate the study prematurely for reasons of animal welfare, as the expected clinical relevant differences and the difference of the survival time were clearly not achievable.

Statistical analysis was performed using statistical software SPSS version 17.0 (<http://www.spss.com>). Variables compared between both groups (PPF or placebo group) included survival time, Karnofsky's score, red blood cells (RBC), hemoglobin, hematocrit, platelets, white blood cells (WBC), monocytes, lymphocytes, banded neutrophils, mature neutrophils, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), bilirubin, total protein (TP), albumin, albumin to globulin ratio, urea, creatinine, glucose, and the volume of effusion. A difference in the survival time between both groups was evaluated using a log-rank test. Differences between the parameters of the 2 groups at day 0, day 7, and day 14 were investigated using a Mann Whitney *U* test. *P*-values <.05 were considered significant. A Bonferroni correction was performed to rule out multiple test interference. A 5% significance level was assumed for all variables, and thus the *P*-value of .05 was divided through the number of tests performed ( $n = 20$ ). Therefore, a final value of  $P \leq .0025$  for each variable was considered significant.

### Results

There was no statistically significant difference in any blood parameter or in the amount of effusion at any time point between cats treated with PPF, and those that received placebo (Table 1). The Karnofsky's score of both groups also showed no statistically significant difference at the start of the study.

Cats survived between 4 and 36 days (median, 8 days). The median survival time of cats in the PPF group was 8 days (range 4–36; 95% confidence interval [CI] 5.4–10.6), and of cats in the placebo group the median survival time was 7.5 days (range 4–22; 95% CI 4.4–9.6). The difference in survival time between the 2 groups was not significantly different ( $P = .665$ ) (Fig 1). Twenty-two of 23 (96%) cats survived less than 29 days. These 29 days were preset as expected minimum survival time in cats receiving PPF. In a previous study, a median survival time of 8 days was detected in cats with FIP.<sup>3</sup> In the present study, it was assumed that cats treated with PPF would live at least 21 days longer than those receiving placebo (with a median survival of 8 days), as this makes a relevant difference for the owners.<sup>3</sup>

No statistically significant differences of any blood parameter or of effusion were apparent after the 7 and 14 day period of treatment between the PPF group and the placebo group. The Karnofsky's score of both groups on the evaluated control days (day 7 and day 14) also showed no significant difference. On day 7, only 14 cats remained in the study. Two of them improved 10% in the Karnofsky's score, 5 cats showed no difference and the Karnofsky's score of 7 cats deteriorated for at least 70%. On day 14, only 4 cats remained in the study and the Karnofsky's score of all these cats had deteriorated for at least 80% compared to day 0. No statistical evaluation was performed after day 14 because only 1 cat was alive at day 28 (next control day).

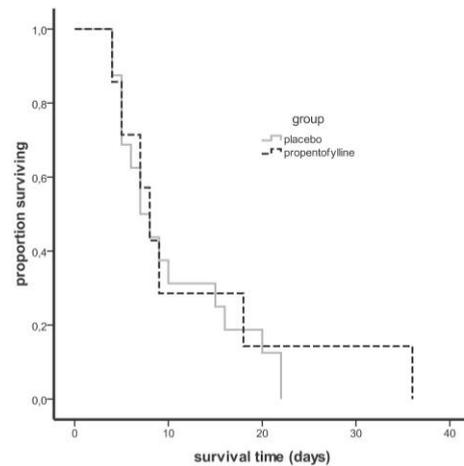


Fig 1. Kaplan-Meier survival curve of cats treated with propentofylline and cats treated with placebo;  $P = .665$ .

Only in 6 cats (4 of the PPF group, 2 of the placebo group) serum samples of more than one time point were available for the comparison of the TNF- $\alpha$  concentration during treatment with PPF. A significant decrease was not found in any of these cats; conversely, most cats even showed increased TNF- $\alpha$  serum levels during the study period.

### Discussion

In this study, there was no statistically significant difference in the survival time of cats treated with PPF versus placebo. There was also no statistically significant difference in any other variable evaluated between both groups, including the CBC and a small animal biochemistry profile (as shown in Table 1).

The median survival time (8 days) of cats with FIP after definitive diagnosis in this study was nearly identical to the median survival of the study of Ritz et al.<sup>3</sup> There are no other reports on median survival times of cats after FIP was confirmed. However, in the study of Ritz et al.,<sup>3</sup> several cats survived longer than 4 weeks, which was not the case in the present study.

Unfortunately, the desired effect of PPF was not observed. It has been proposed that PPF may decrease the volume of effusion, by inhibiting cytokines (particularly TNF- $\alpha$ ) and thereby reducing resulting vasculitis. There was neither a significant difference in the amount of effusion between the PPF and the placebo group, nor a decrease in TNF- $\alpha$  in any of the cats in which serial measurement was performed. A cure was never the ultimate goal in the use of PPF in cats with FIP, because it is not an antiviral drug. However, because of the pharmacological features it was

assumed to have positive effects on the well-being of the cats and the survival time. PPF was meant to inhibit the TNF- $\alpha$  production,<sup>9</sup> which is involved in the development of vasculitis.<sup>11–15</sup> The TNF- $\alpha$  concentration, however, did not decrease in the cats treated with PPF, but increased instead. Most likely, PPF was not even able to exhibit its function within this short period of time, and the TNF- $\alpha$  increase mainly reflected severe progression of the disease.

Reasons for the lack of efficiency can be multifaceted. The most probable reason is that treatment may have been initiated too late. If signs of vasculitis were apparent, the immune-mediated process in cats with FIP might have been progressed too far to be delayed by PPF. In the present study, 21 of the 23 cats already showed effusion at the day of presentation. As shown in an experimental trial, signs of FIP become apparent 1–2 weeks after inoculation of the mutated feline infectious peritonitis virus (FIPV).<sup>40</sup> As the effect of PTX is described by the manufacturer information<sup>3</sup> to be seen after 2–4 weeks after treatment initiation, and it is an assumption that the same time frame would apply to PPF, most of the cats were already dead before an effect could be reached. A further reason for lack of PPF efficiency in this study could be that the treatment intervals could have been too long. An application of PPF every 12 hours was used in this trial following the anecdotal reports describing an effect of PTX in cats.<sup>4,6,32,41</sup> The manufacturer instruction recommends administration of PTX 3 times daily in human medicine,<sup>20</sup> because of a relatively short plasma half-life of 0.4–0.8 hours of the drug. A pharmacokinetic study in dogs indicated that PTX be administered every 8 hours.<sup>42</sup>

The reasons behind the reported beneficial effects of PTX described in case reports (<http://www.VIN.com>) are currently unknown. Treatment might have been initiated earlier in these cats. Alternatively, FIP was not confirmed by histopathology or immunofluorescent antibody technique (IFAT) in most of these cases; so, these cats could have suffered from other diseases. Some of the cats might have had a “non-effusive” form of FIP, which is considered to have longer survival times than in cats with effusion.<sup>43</sup>

Drug interactions between PPF and the other medications (especially the glucocorticoids) in this study are a possibility, but are not reported. In addition, in a recent study in cats with asthma, glucocorticoids and PPF were safely used in combination with no adverse interactions. The glucocorticoid dose can be reduced by addition of PPF to treatment.<sup>32</sup> Therefore, no adverse effects were expected with the combination PPF and glucocorticoids in the present study. Glucocorticoids are routinely used in cats with FIP,<sup>1,3,44–47</sup> as it is not the virus itself that causes major damage but the cat’s own immune reaction that leads to the fatal consequences. There are no evidence based studies that glucocorticoids have a positive effect in cats with FIP.<sup>37</sup> The cats of the present study received an immunosuppressive dose of glucocorticoids (2 mg/kg). Together with the stress caused by hospitalization and

daily paracentesis, glucocorticoids might be a more confounding factor.<sup>48–49</sup> Potentially, a lower dose of glucocorticoids, or no glucocorticoids at all, might be better for “long-term” treatment. The beneficial effects of glucocorticoids in the treatment of FIP must be questioned given the median survival time is 8–9 days in the present and in the previous study,<sup>3</sup> both in treatment and placebo groups.<sup>3</sup> Therefore, future treatment study protocols should include a 3rd group of cats that receive no glucocorticoids. Alternatively a double-blinded study just evaluating glucocorticoids as treatment option for FIP could be performed.

There was no statistically significant difference in the Karnofsky’s score during the treatment period between the two groups. Few cats showed an increased well-being shortly after participating in the study. This was most likely induced by the corticosteroids and was not the effect of PPF, because this phenomenon could be observed in both groups. However, the improvement in the general condition was not long-lasting, and cats deteriorated rapidly between 4 and 21 days after treatment initiation.

This study had several limitations. The 1st limitation is the unequal distribution of cats to the PPF and the placebo group. As this was a blinded, randomized trial, the distribution could not be influenced. Another limitation might be the small number of cats (only 2) without initial effusion. Definitive diagnosis in cats without effusion, however, is much more difficult to obtain.<sup>33</sup> The PPF might be more useful in cats without effusion, as it may have a chance to prevent vasculitis and therefore effusions

## Footnotes

- <sup>a</sup> Sanofi-aventis US, Bridgewater, NJ  
<sup>b</sup> Feline Leukemia Virus Antigen/Feline Immunodeficiency Virus Antibody Test Kit; IDEXX, Wörstadt, Germany  
<sup>c</sup> Karsivan, 50 mg; Intervet, Unterschleissheim, Germany  
<sup>d</sup> Karsivan, 100 mg; Intervet  
<sup>e</sup> P-Tabletten, weiß, 7 mm; Lichtenstein, Winthrop, Fürstenfeldbruck, Germany  
<sup>f</sup> Hexadreson; Intervet  
<sup>g</sup> Prednisolon, 2 mg; GALENpharma GmbH, Kiel, Germany  
<sup>h</sup> Prednisolon, 5 mg; CP-Pharma, Burgdorf, Germany  
<sup>i</sup> Augmentan; Glaxo Smithkline, München, Germany  
<sup>j</sup> Fragmin; Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Germany  
<sup>k</sup> Feliserin PRC; IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlan, Germany  
<sup>l</sup> Cell-Dyn 3500; Abbott Laboratories, IL  
<sup>m</sup> Hitachi 911; Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Germany  
<sup>n</sup> DuoSet ELISA for feline TNF- $\alpha$ /TNFSF1A; R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN  
<sup>o</sup> PBS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany  
<sup>p</sup> Fetal Calf Serum; PAA Laboratories, Pasching, Austria  
<sup>q</sup> Bio Tek Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader; Bio Tek Germany, Bad Friedrichshall, Germany  
<sup>r</sup> Gen5 Data Analysis Software; Bio Tek Germany

### Acknowledgments

We thank the Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany, for partial support of this study.

### References

- Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005;35:39–79.
- Pedersen NC. Feline infectious peritonitis and feline enteric coronavirus infections. Part 1. *Feline Pract* 1983;13:13–19.
- 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;21:1193–1197.
- Scherk M. Feline infectious peritonitis: What's new? In Atlantic Coast Veterinary Conference, Vancouver, BC, Canada: 2007:62–65.
- Norris J. Feline infectious peritonitis (FIP): update 2007. University of Sydney;2007. Available at: [www.ancats.com.au/PDF/Files/Feline Infectious Peritonitis summary August 2007 - for cat-teries.pdf](http://www.ancats.com.au/PDF/Files/Feline%20Infectious%20Peritonitis%20summary%20August%202007%20-%20for%20cat%20teries.pdf). Accessed August 2007.
- Little S. Diagnosis and treatment of FIP in the real world. Western Veterinary Conference, Ottawa, ON, Canada; 2005. Available from <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=wvc2005&PID=pr07963&O=VIN> (password protected).
- Norris JM, Bosward KL, White JD, et al. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990–2002). *Aust Vet J* 2005;83:666–673.
- Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J Feline Med Surg* 2009;11:225–258.
- Meiners I, Hauschildt S, Nieber K, et al. Pentoxifylline and propentofylline are inhibitors of TNF-alpha release in monocytes activated by advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 2004;111:441–447.
- Bachet P, Lancrenon S, Chassoux G. Fibrinogen and pentoxifylline. *Thromb Res* 1989;55:161–163.
- Marton J, Farkas G, Takacs T, et al. Beneficial effects of pentoxifylline treatment of experimental acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl)* 1998;197:293–299.
- Arias-Diaz J, Vara E, Garcia C, et al. Pentoxifylline partially reverts the effect of tumor necrosis factor on human islets. *Transplant Proc* 1994;26:698–700.
- Neuner P, Klosner G, Schauer E, et al. Pentoxifylline *in vivo* down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 1994;83:262–267.
- Zabel P, Wolter DT, Schonharting MM, et al. Oxpentifylline in endotoxaemia. *Lancet* 1989;2:1474–1477.
- Strieter RM, Remick DG, Ward PA, et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:1230–1236.
- Sullivan GW, Carper HT, Novick WJ, Jr, et al. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect Immun* 1988;56:1722–1729.
- Wahba-Yahav AV. Chronic leukocytoclastic vasculitis associated with polycythemia vera: Effective control with pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:1006–1007.
- Gross WL. New developments in the treatment of systemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1994;6:11–19.
- Soria J, Giovannangeli ML, Jolchine IE, et al. Pentoxifylline, fibrinogen and leukocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990;1:485–487.
- Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987;34:50–97.
- Ott E, Lechner H, Fazekas F. Hemorheological effects of pentoxifylline on disturbed flow behavior of blood in patients with cerebrovascular insufficiency. *Eur Neurol* 1983;22(Suppl 1):105–107.
- Schneider R, Schmid-Schonbein H, Kiesewetter H. The rheological efficiency of parenteral pentoxifylline (Trental) in patients with ischemic brain lesions. Preliminary results. *Eur Neurol* 1983;22(Suppl 1):98–104.
- Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiology* 1993;187:447–463.
- Shaw SM, Shah MK, Williams SG, et al. Immunological mechanisms of pentoxifylline in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009;11:113–118.
- Gresser I, Delers F, Tran Quangs N, et al. Tumor necrosis factor induces acute phase proteins in rats. *J Biol Regul Homeost Agents* 1987;1:173–176.
- Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, et al. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8667–8671.
- Pohlman TH, Stanness KA, Beatty PG, et al. An endothelial cell surface factor(s) induced *in vitro* by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol* 1986;136:4548–4553.
- Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987;80:1550–1560.
- Yeh SS, Schuster MW. Geriatric cachexia: The role of cytokines. *Am J Clin Nutr* 1999;70:183–197.
- Summary of product characteristics, Karsivan (propentofylline). In: Unterschleißheim, Germany: Intervet; 2006.
- Summary of product characteristics, Trental (pentoxifylline). In: Bridgewater, NJ: Sanofi-aventis; 2010.
- Stursberg U, Zenker I, Hecht S, et al. Use of propentofylline in feline bronchial disease: Prospective, randomized, positive-controlled study. *J Am Anim Hosp Assoc* 2010;46:318–326.
- 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.
- Tammer R, Evensen O, Lutz H, et al. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;49:177–182.
- Hartmann K, Kuffer M. Karnofsky's score modified for cats. *Eur J Med Res* 1998;3:95–98.
- Torigoe R, Hayashi T, Anegawa S, et al. Effect of propentofylline and pentoxifylline on cerebral blood flow using 123I-IMP SPECT in patients with cerebral arteriosclerosis. *Clin Ther* 1994;16:65–73.
- 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.
- Weiss RC, Dodds WJ, Scott FW. Disseminated intravascular coagulation in experimentally induced feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1980;41:663–671.
- Peterson JL, Couto CG, Wellman ML. Hemostatic disorders in cats: A retrospective study and review of the literature. *J Vet Intern Med* 1995;9:298–303.
- 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;43:666–670.

41. Nichols PR, Morris DO, Beale KM. A retrospective study of canine and feline cutaneous vasculitis. *Vet Dermatol* 2001;12:255–264.

42. Marsella R, Nicklin CF, Munson JW, et al. Pharmacokinetics of pentoxifylline in dogs after oral and intravenous administration. *Am J Vet Res* 2000;61:631–637.

43. Tsai HY, Chueh LL, Lin CN, et al. 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.

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

45. Bilkei G. Beitrag zur Therapie der FIP. *Tierärztl Umschau* 1988;43:192–196.

46. Watari T, Kaneshima T, Tsujimoto H, et al. Effect of thromboxane synthetase inhibitor on feline infectious peritonitis in cats. *J Vet Med Sci* 1998;60:657–659.

47. Ishida T, Shibana A, Tanaka S, et al. Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2004;6:107–109.

48. Foley JE, Poland A, Carlson J, et al. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210:1313–1318.

49. Rohrer C. Die Diagnostik der feline infektiösen Peritonitis (FIP): Retrospektive und prospektive Untersuchungen. *Kleintierpraxis* 1993;38:379–389.

## **VI. STUDIE IV**

### **Perikarderguss bei einer Katze mit Feliner Infektiöser Peritonitis**

**Yvonne Fischer**<sup>1</sup>

**Gerhard Wess**, Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine), Dipl. ECVIM-CA + ACVIM (Cardiology)<sup>1</sup>

**Katrin Hartmann**, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)<sup>1</sup>

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

**Schweizer Archiv für Tierheilkunde, veröffentlicht**

***Schweiz. Arch. Tierheilk.* Band 154, Heft 1, Januar 2012, 27 – 31**

## Perikarderguss bei einer Katze mit feliner infektiöser Peritonitis

Y. Fischer, G. Wess, K. Hartmann

Medizinische Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Zusammenfassung

In diesem Fallbericht wird der Krankheitsverlauf eines Katers mit hochgradigem Perikarderguss beschrieben. Die klinischen Symptome (Dyspnoe, Apathie und Schwäche) traten sehr akut auf. In der initialen Laboruntersuchung war als einzige Abnormität eine Aktivitätserhöhung der Alanin-Aminotransferase auffallend. Durch bildgebende Diagnostik konnte ein Perikarderguss diagnostiziert werden. Die Ergussdiagnostik ergab ein Rivalta-positives, modifiziertes Transsudat. Der Nachweis von felinem Coronavirus-Antigen in Makrophagen war negativ. Das Allgemeinbefinden sowie die Laborwerte verschlechterten sich dramatisch innerhalb von sieben Tagen. Daher entschieden sich die Besitzer zur Euthanasie. Trotz makroskopisch und mikroskopisch verdächtiger Ergusscharakteristika konnte die definitive Diagnose FIP erst histologisch (inklusive Immunhistochemie) gesichert werden.

Schlüsselwörter: FIP, Dyspnoe, modifiziertes Transsudat, gedämpfte Herztöne

### Pericardial effusion in a cat with feline infectious peritonitis

This case report describes the disease progression of a male cat with pericardial effusion. Clinical signs (dyspnea, lethargy, and weakness) started very acutely. The initial laboratory profile showed only an increase in alanine aminotransferase enzyme activity. Diagnostic imaging revealed pericardial effusion. Effusion analysis showed a Rivalta-positive, modified transudate. Detection of feline coronavirus antigen in macrophages was negative. General condition and laboratory parameters dramatically worsened within seven days. Therefore, the owners decided to euthanize the cat. Even if effusion variables are macroscopically and microscopically suspicious for FIP, a definitive diagnosis of FIP could only be made by histology (including immunohistochemical staining).

Keywords: FIP, dyspnea, modified transudate, muffled heart sounds

### Einleitung

Perikardergüsse bei Katzen sind selten. Die häufigsten Gründe sind kongestives Herzversagen (meist infolge hypertropher Kardiomyopathie (HCM), Neoplasien oder FIP (Rush, 1990; Hall et al., 2007; Davidson et al., 2008)). Bei einem durch FIP verursachten Perikarderguss sind die Veränderungen am Perikard gekennzeichnet durch Vaskulitis und Pyogranulome, ähnlich den Befunden, die auch auf den anderen serösen Oberflächen bei Katzen mit FIP zu finden sind. Wenn Flüssigkeit durch die durch Vaskulitis erhöhte Gefäßpermeabilität sehr schnell aus den betroffenen Gefäßen in das Perikard austritt, steigt der intraperikardiale Druck und kann sogar zu einer Herz tamponade führen (Rush, 1990). Ziel dieses Be-

richtes ist es, einen Kater mit sehr akuten Krankheitssymptomen und weitgehend unauffälligen Laborparametern inklusive der diagnostischen Aufarbeitung eines Perikardergusses vorzustellen, sowie die schnelle Progression einer FIP zu verdeutlichen.

### Anamnese und klinische Symptome

Ein 10-Monate alter, nicht kastrierter Europäisch-Kurzhaar-Kater wurde in der Medizinischen Kleintierklinik München wegen akuter Apathie, Schwäche und angestrengter Atmung seit einem Tag vorgestellt. Bis zum Tag der Vorstellung in der Klinik war die Futteraufnahme unauffällig, und es lag kein Gewichtsverlust vor. Im Haushalt

## 28 Fallberichte

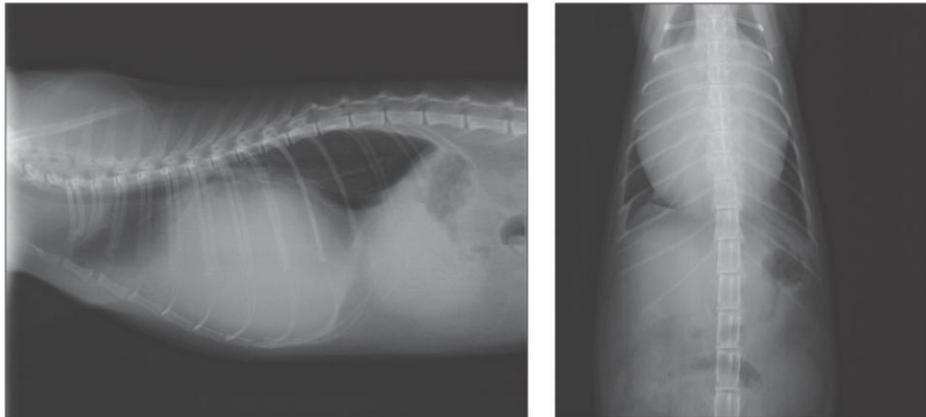


Abbildung 1: Latero-laterales (rechtsanliegend) und ventro-dorsales Röntgenbild der 10-Monate alten Katze mit Perikarderguss. Der Herzschatten ist stark vergrößert (vertebral heart score ca. 13.8 (normal  $\leq 8.2$ )), Herzsilhouette nicht gut abgrenzbar, Verdacht auf wenig Pleuralexerguss.

befand sich noch eine andere Katze, deren Allgemeinbefinden ungestört war. Vorerkrankungen wurden nicht berichtet. Der Kater war noch nie geimpft worden, er war Freigänger und war noch nie außerhalb Deutschlands.

Bei der allgemeinen klinischen Untersuchung wurde ein mittelgradig reduziertes Allgemeinbefinden festgestellt. Der Ernährungszustand war gut (Körpergewicht 3.26 kg), der Pflegezustand sehr gut, das Fell weich und glänzend. Die Schleimhäute waren rosa, die kapilläre Füllungszeit lag unter zwei Sekunden. Das Tier war leicht dehydriert (ca. 6%), die rektale Körpertemperatur betrug 35.9 °C und die Lymphknoten waren nicht verändert. Das Abdomen war bei der Palpation weich und nicht druckdolent. Bei der speziellen Untersuchung des Herz-Kreislauf-Systems wurde eine Herzfrequenz von 170 Schlägen/min gezählt. Bei der Herzauskultation wurden gedämpfte Herztöne festgestellt. Der Puls war schwach. Die Atemfrequenz betrug 56/min. Es fielen eine angestrenzte, kostoabdominale Atmung und ein geringgradig expiratorisches Atemgeräusch bei der Auskultation auf.

### Laboruntersuchungen

Das Blutbild mit Differentialblutbild, sowie die Elektrolyte und Substrate waren unauffällig. Die Serumchemie zeigte bis auf eine erhöhte Aktivität des Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) von 359 U/l (normal 0–114 U/l) keine Auffälligkeiten. Der durchgeführte Test zum Nachweis feliner Leukämievirus-Antigene (FeLV-AG) und feliner Immunschwächenvirus-Antikörper (FIV-AK) (IDEXX GmbH, Wörstadt, Deutschland) verlief negativ.

### Bildgebende Diagnostik und Ergussdiagnostik

Auf den Röntgenbildern (latero-laterale und ventro-dorsale Ebene) wurde ein stark vergrößertes Herz ersichtlich (vertebral heart score 13.8, normal  $\leq 8.2$ ) (Litster and Buchanan, 2000). Die Herzsilhouette war nicht gut abgrenzbar, und es bestand Verdacht auf Thoraxerguss (Abb. 1). Die Ultraschalluntersuchung mit einem 7.5-mHz-Ultraschallkopf ergab einen massiven Perikarderguss (Abb. 2) wie auch einen geringgradigen Thoraxerguss. Die Herzdimensionen befanden sich im Referenzbereich; auch der linke Vorhof war nicht vergrößert. Mittels Perikardiozentese wurden 120 ml gelblich-klebrige Flüssigkeit (Abb. 3) abgezogen. Die Ergussdiagnostik ergab ein modifiziertes Transsudat mit einem hohen Gesamteiweiß von 65.1 g/l, einer sehr niedrigen Zellzahl von 470/ $\mu$ l und einem hohen spezifischen Gewicht von 1.036. Die Rivalta-Probe verlief positiv. In der zytologischen Untersuchung fielen hauptsächlich nicht-degenerierte Neutrophile und Makrophagen auf. Es konnten keine Bakterien oder Tumorzellen nachgewiesen werden. Aufgrund der Ergebnisse der Ergussdiagnostik wurde der Verdacht auf FIP gestellt. Der Nachweis von felinem Coronavirus- (FCoV-) Antigen in den Ergussmakrophagen mittels Immunfluoreszenz brachte jedoch ein negatives Ergebnis.

### Therapie

Nach der Perikardiozentese (120 ml) wurde der Kater stationär aufgenommen. Er bekam einen Venenverweilka-

## Perikarderguss bei einer Katze mit feliner infektiöser Peritonitis 29

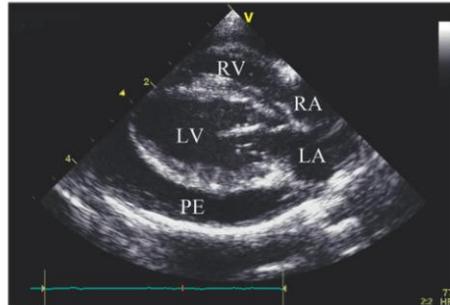


Abbildung 2: Rechts parasternale Längsachse der Katze mit Perikarderguss (PE). Linkes Atrium (LA), linker Ventrikel (LV), rechtes Atrium (RA) und rechter Ventrikel (RV) von normaler Dimension



Abbildung 3: Punktierte Flüssigkeit aus dem Perikard am Tag der Vorstellung.

theter in die Vena cephalica gelegt. Als Therapie erhielt er Dexamethason (Hexadreson®, 1 mg/kg, 1 x täglich, s. c.).

### Weiterer Krankheitsverlauf

An den ersten beiden Tagen nach stationärer Aufnahme verbesserte sich das Allgemeinbefinden des Katers deutlich. Er fraß mit Appetit und es bildete sich kein neuer Erguss. An Tag 3 war der Appetit reduziert, der Kater erschien schwächer und die Maulschleimhaut blasser als an den Vortagen. Da wieder Flüssigkeit im Perikard vorhanden war, wurde diese erneut abgezogen (30 ml) und Dexamethason (Hexadreson®, 1 mg/kg) wurde einmalig intraperikardial (anstelle der subkutanen Injektion) injiziert. Das Allgemeinbefinden besserte sich jedoch nicht. Da das Tier an Tag 5 erbrach, wurde der Therapieplan um Maropitant (Cerenia®, 0.05 ml/kg, q24h, s. c.) und Ranitidin (Sostiril®, 1 mg/kg, q8h, i. v.) erweitert. Daraufhin trat kein erneutes Erbrechen auf.

Am 6. Tag wurde bei der Ultraschallkontrolle ein Pleuralerguss festgestellt. Nach dem Abziehen von 40 ml gelblich klebriger Flüssigkeit wurde Dexamethason (Hexadreson®, 1 mg/kg) intrathorakal (anstelle der subkutanen Gabe) verabreicht. Am Tag 7 fraß der Kater kaum noch, das Allgemeinbefinden war hochgradig reduziert. Im Ultraschall wurde nun auch Aszites festgestellt. Das Blutbild mit Differentialblutbild zeigte eine Anämie mit einem Hämatokrit von 0.26 l/l (normal 0.30–0.44 l/l), eine Thrombozytopenie von  $95 \times 10^9/l$  Thrombozyten (normal  $180–550 \times 10^9/l$ ) und eine Neutropenie mit  $0.41 \times 10^9/l$  neutrophilen Granulozyten (normal  $6–1 \times 10^9/l$ ). Die Aktivität der ALT, welche an Tag 0 erhöht war, lag im Normalbereich, jedoch lagen eine starke Hyperbilirubinämie ( $38.44 \mu\text{mol/l}$ , normal  $0–4.74 \mu\text{mol/l}$ ) und ein erniedrigtes Albumin ( $22.86 \text{ g/l}$ , normal  $26–56 \text{ g/l}$ ), zudem geringgradig erhöhte Glukose ( $7.14 \text{ mmol/l}$ , normal  $3.7–6.9 \text{ mmol/l}$ ) vor. Der Kater hatte zu keiner Zeit seiner Erkrankung Fieber.

Am Abend von Tag 7 trafen die Besitzer die Entscheidung, das Tier zu euthanasieren.

In der Sektion bestand Verdacht auf FIP. Die pathologisch-anatomischen Befunde am Herzen waren eine fibrinöse Epi- und Perikarditis, sowie eine hochgradige Ödematisierung des Perikards. Zusätzlich lag eine fibrinöse Perihepatitis vor, und die linke Niere wies einzelne helle Herde in der Nierenrinde auf. Histologisch wurden Nekroseherde, Fibrininsudation, entzündliche Infiltration unter Beteiligung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen und Lymphozyten in verschiedenen Organen dargestellt. Die Verdachtsdiagnose FIP wurde durch den immunhistochemischen Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen aus Gewebeproben bestätigt.

### Diskussion

Die meistens Katzen mit durch FIP verursachten Erguss werden mit einer Anamnese von mehreren Wochen bis Monaten beim Tierarzt vorgestellt, in denen sie intermittierende Krankheitsphasen mit Antibiotika-resistentem Fieber, Inappetenz und Gewichtsverlust aufweisen (Norris et al., 2005; Addie et al., 2009; Pedersen N. C., 2009). Dieser Fallbericht schildert im Gegensatz dazu den Krankheitsverlauf einer Katze mit sehr akuter Symptomatik und dem primären Befund Perikarderguss.

Nach der Anamnese und der klinischen Untersuchung des Katers wurde die erste Problemliste aufgestellt. Als wichtigste Probleme wurden die Dyspnoe, die gedämpften Herztöne und der schwache Puls angesehen. Um die Ursachen weiter abzuklären, wurden als nächste diagnostische Schritte eine Blut- und eine Röntgenuntersuchung durchgeführt. Die Blutuntersuchung war (bis auf eine erhöhte ALT-Aktivität) unauffällig und das Blutbild ergab keine Hinweise auf infektiöse Ursachen für die Dyspnoe. Bei den Röntgenaufnahmen wurde das stark vergrößerte Herz ersichtlich. Es lagen keine Hinweise auf pulmonäre

## 30 Fallberichte

Erkrankungen vor. Mittels Sonographie konnte ein Perikarderguss verifiziert werden. Hierfür kommen differentialdiagnostisch myokardiale und valvuläre Erkrankungen am Herzen mit Folge einer kongestiven Herzinsuffizienz, Neoplasien (in diesem jungen Alter hauptsächlich ein malignes Lymphom), FIP oder eine bakterielle Infektion (Liu et al., 1970; Rush, 1990; Davidson et al., 2008) in Frage. Myokardiale und valvuläre Ursachen konnten aufgrund der normalen Herzdimensionen ausgeschlossen werden. Weitere Hinweise auf die zugrunde liegende Ursache sollte die Untersuchung des punktierten Ergusses geben. Die Untersuchung des Perikardergusses ergab ein modifiziertes Transsudat (zellarm, Eiweiß-reich, hohes spezifisches Gewicht) mit pyogranulomatösem Charakter. Für ein modifiziertes Transsudat mit niedrigem Zellgehalt im Perikard kommen wiederum eine Neoplasie, FIP und eine kongestive Herzinsuffizienz in Frage. Die zytologische Untersuchung des Ergusses ergab keinen Hinweis auf Bakterien oder Tumorzellen.

Die Verdachtsdiagnose lautete daher FIP. Der FCoV-Antigen-Nachweis in den Makrophagen des Ergusses fiel jedoch negativ aus. Ein negatives Ergebnis, trotz vorliegender FIP, könnte an der zu geringen Zellzahl und somit zu wenigen Makrophagen zum Nachweis von intrazellulären FCoV-Antigenen liegen. Es ist auch möglich, dass die Antigene durch kompetitive Bindung von FCoV-Antikörpern im Erguss maskiert sind und eine Bindung von fluoreszierenden Antikörpern verhindert wird. Der momentane «Goldstandard» zur Diagnose von FIP ist, neben dem Nachweis in Ergussmakrophagen, der immunhistochemische Nachweis von FCoV-Antigen in Gewebebiopsien (Barlough and Stoddart, 1988; Pedersen N. C., 1995). Post mortem wurde die Diagnose FIP bei dieser Katze durch die pathologische Untersuchung und die Immunhistochemie aus Gewebeproben gesichert.

Eine Therapie mit Glukokortikoiden wird häufig bei Katzen mit FIP eingesetzt (Madewell et al., 1978; Wataru et al., 1998; Ishida et al., 2004; Hartmann, 2005; Ritz et al., 2007), obwohl es keine wissenschaftlichen Studien zu deren Wirksamkeit gibt (Addie et al., 2009). Glukokortikoide werden bei FIP gegeben, da man davon ausgeht, dass sie die katzeneigene Immunantwort auf FCoV hemmen und daher zur Besserung der Symptome führen, da FIP eine immun-vermittelte Erkrankung ist (Hartmann, 2005). Eine Injektion von Glukokortikoiden in die jeweilige Ergusshöhle (falls Erguss vorhanden) anstatt unter die Haut wurde durchgeführt, da von einer gezielteren Wirkung auf die jeweilig betroffenen Gefäße ausgegangen wurde (Ritz et al., 2007; Hartmann and Ritz, 2008).

Beachtenswert in diesem Fallbericht war der sehr akute Verlauf. An Tag 0 waren keine für FIP typischen Laborwerte vorhanden. Die Blutwerte an Tag 7 jedoch können dagegen als relativ «FIP-typisch» bezeichnet werden. Es lag eine Hyperbilirubinämie vor, welche bei FIP oft ohne eine Erhöhung der Leberenzyme einhergeht (Roh-

rer, 1994; Hartmann, 2005; Addie et al., 2009). Der Kater hatte auch eine Hypoalbuminämie, wie sie häufig bei FIP beschrieben wird. Meistens ist daneben das Gesamteiweiß bei Katzen mit FIP aufgrund einer Hyperglobulinämie erhöht (Hartmann, 2005; Norris et al., 2005; Pedersen N. C., 2009). Bei diesem Kater war dies nicht der Fall; bei ihm war an Tag 7 das Gesamteiweiß sogar etwas erniedrigt. Doch auch dies ist bei Katzen mit FIP beschrieben (Norris et al., 2005). Die Veränderungen des Katers im Blutbild an Tag 7 waren durch eine Anämie, eine Leukopenie, sowie eine Thrombozytopenie charakterisiert. Bei FIP wird häufig eine milde bis moderate, regenerative oder aregenerative Anämie beschrieben. Weiter kommen bei Katzen mit FIP sowohl eine Leukozytose mit Lymphopenie (bekannt als «Stressleukogramm») oder auch eine Leukopenie (Hirschberger et al., 1995; Hartmann et al., 2003; Hartmann, 2005; Norris et al., 2005; Addie et al., 2009; Pedersen N. C., 2009) vor. Der Kater wies an Tag 7 eine Leukopenie auf. Die Thrombozytopenie ist wahrscheinlich, wie bei vielen Katzen mit FIP, eine Folge einer intravasalen disseminierten Gerinnung (Boudreaux et al., 1990; Hartmann, 2005).

Antibiotika-resistentes Fieber, häufig über Wochen bis Monate immer wiederkehrend, ist eines der häufigsten Symptome bei Katzen mit FIP (Norris et al., 2005; Addie et al., 2009; Pedersen N. C., 2009). Der Kater zeigte weder vor, noch während des klinischen Aufenthaltes Fieber und auch sein Allgemeinbefinden war bis einen Tag vor der Vorstellung in der Klinik komplett unauffällig. Auch ist bemerkenswert in diesem Fall, dass mit der großen Menge Perikarderguss (120 ml) nicht früher klinisch Symptome auftraten. Es kann angenommen werden, dass der Erguss innerhalb kurzer Zeit entstanden ist. Nach wenigen Tagen waren jedoch zusätzlich auch Pleuralerguss und Aszites vorhanden, was auf eine generalisierte Vasculitis durch FIP hinwies.

FIP muss also auch bei isoliertem Erguss im Perikard differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden.

## Literatur

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

Barlough J.E., Stoddart C.A.: Cats and coronaviruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988, 193: 796–800.

Boudreaux M.K., Weiss R.C., Toivio-Kinnucan M., Cox N., Spano J.S.: Enhanced platelet reactivity in cats experimentally infected with feline infectious peritonitis virus. *Vet. Pathol.* 1990, 27: 269–273.

Davidson B.J., Paling A.C., Lahmers S.L., Nelson O.L.: Disease association and clinical assessment of feline pericardial effusion. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2008, 44: 5–9.

## Perikarderguss bei einer Katze mit feline infektiöser Peritonitis 31

- Hall D.J., Shofer F., Meier C.K., Sleeper M.M.: Pericardial effusion in cats: a retrospective study of clinical findings and outcome in 146 cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, 21: 1002–1007.
- Hartmann K.: Feline infectious peritonitis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2005, 35: 39–79.
- 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: 781–790.
- Hartmann K., Ritz S.: Treatment of cats with feline infectious peritonitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008, 123: 172–175.
- Hirschberger J., Hartmann K., Wilhelm N., Frost J., Lutz H., Kraft W.: [Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis]. *Tierarztl. Prax.* 1995, 23: 92–99.
- Ishida T., Shibanaï A., Tanaka S., Uchida K., Mochizuki M.: Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. *J. Feline Med. Surg.* 2004, 6: 107–109.
- Litster A.L., Buchanan J.W.: Vertebral scale system to measure heart size in radiographs of cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000, 216: 210–214.
- Liu S.K., Tashjian R.J., Patnaik A.K.: Congestive heart failure in the cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1970, 156: 1319–1330.
- Madewell B.R., Crow S.E., Nickerson T.R.: Infectious peritonitis in a cat that subsequently developed a myeloproliferative disorder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978, 172: 169–172.
- Norris J.M., Bosward K.L., White J.D., Baral R.M., Catt M.J., Malik R.: Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990–2002). *Aust. Vet. J.* 2005, 83: 666–673.
- Pedersen N.C.: An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Feline Pract.* 1995, 23: 7–20.
- Pedersen N.C.: A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J. Feline. Med. Surg.* 2009, 11: 225–258.
- 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: 1193–1197.
- Rohrer C., Suter, P.F., Lutz, H.: The diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP): retrospective and prospective study. *Europ. J. Comp. Anim. Pract.* 1994, 4: 23–29.
- Rush J.: Pericardial disease in the cat: a retrospective evaluation of 66 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1990, 26: 39–46.
- Watari T., Kaneshima T., Tsujimoto H., Ono K., Hasegawa A.: Effect of thromboxane synthetase inhibitor on feline infectious peritonitis in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 1998, 60: 657–659.

## Korrespondenz

Yvonne Fischer  
Medizinische Kleintierklinik, Zentrum für klinische  
Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Veterinärstrasse 13  
DE-80539 München  
Fax: + 49 (0) 89 21 80–2650  
y.fischer@medizinische-kleintierklinik.de

Manuskripteingang: 9. März 2011  
Angenommen: 22. Juli 2011

## VII. DISKUSSION

Noch immer sind die Möglichkeiten zur Diagnose einer FIP am lebenden Tier sehr beschränkt. Bei Katzen mit Erguss gibt es die Möglichkeit, FCoV-Antigen in den Makrophagen im Erguss nachzuweisen und damit die Diagnose zu sichern (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). Diese Methode ist im positiven Fall beweisend für eine FIP. Leider jedoch dauert es meist mehrere Tage bis ein Ergebnis vorliegt. Vielen Katzen geht es sehr schlecht und ein Warten auf das Ergebnis verzögert eine möglicherweise einzuleitende immunsuppressive Therapie. Eine andere Untersuchungsmethode von Erguss, die Rivalta-Probe, zeigte in früheren Studien sehr gute diagnostische Werte (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). Die Rivalta-Probe kann schnell und einfach durchgeführt werden. Der Fokus des ersten Teils dieser Arbeit lag auf einer genauen Betrachtung der Rivalta-Probe durch eine retrospektive Auswertung mit einer großen Patientenzahl. Eine weitere Studie über die Rivalta-Probe beschäftigte sich mit den optimalen Reaktions- und Lagerungsbedingungen, die das Ergebnis der Rivalta-Probe beeinflussen könnten.

In der ersten Studie wurden Körperhöhlenergüsse bei Katzen ausgewertet. Die Prävalenz von FIP (35 %) unter allen Katzen mit Erguss war in dieser Untersuchung niedriger als in früheren Studien (41 % (HIRSCHBERGER et al., 1995) und 51 % (HARTMANN et al., 2003)). Eine mögliche Begründung dafür ist, dass die Prävalenz von FIP in den letzten 15 Jahren tatsächlich gesunken ist. Katzen, bei denen der Verdacht auf FIP sehr hoch war, könnten auch weniger häufig zur weiteren Abklärung an die Ludwig-Maximilians-Universität München überwiesen worden sein und statt dessen, aufgrund der infausten Prognose, bereits in der Privatpraxis euthanasiert worden sein. Die Prävalenz könnte in dieser Studie auch niedriger ausfallen, da in der Studie nur Katzen mit einer definitiven Diagnose in die statistische Auswertung der Prävalenz eingeschlossen wurden. Bei vielen der ausgeschlossenen Katzen lag ein hochgradiger Verdacht von FIP vor, aber die Diagnose konnte nicht gesichert werden. Aufgrund der schlechten Prognose beinahe aller Ursachen von Ergüssen bei Katzen, hatten sich viele Besitzer gegen weitere diagnostische Tests entschieden. Die Besitzer lehnten in den letzten Jahren, aufgrund einer immer engeren Beziehung zu ihren Haustieren, eine Sektion ab. Viele möchten ihre tote Katze zu Hause begraben oder einäschern

lassen. Auch erklärt sich die niedrigere Prävalenz von FIP unter den Katzen mit Ergüssen in dieser Studie dadurch, dass andere Krankheiten, wie Neoplasien (welche eine der häufigsten Differentialdiagnosen zu FIP darstellen), Pankreatitiden oder Herzerkrankungen heutzutage häufiger diagnostiziert werden. Durch einen Anstieg der Zucht- und Rassekatzen, könnten alternativ genetisch bedingte Krankheiten die zu Erguss führen, wie z. B. die hypertrophe Kardiomyopathien (HCM), durch enge Zuchtlinien häufiger vorkommen als früher. Bessere Möglichkeiten, verschiedene Krankheiten (wie Herzerkrankungen und Tumoren) durch bessere Geräte und Techniken mittels Zytologie, Ultraschall und anderer bildgebender Verfahren zu diagnostizieren, kommen als weitere mögliche Erklärung in Frage. Es können heutzutage also andere Krankheiten besser diagnostiziert werden als früher. Deshalb könnte die Prävalenz von FIP unter den Katzen mit definitiven Diagnosen heute niedriger sein. Die Prävalenz von FIP bei Subpopulationen von Katzen, die jünger als ein oder zwei Jahre waren, lag viel höher (87 % bzw. 81 %). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die meisten Katzen, welche an FIP erkranken, jünger als zwei Jahre sind (HIRSCHBERGER et al., 1995; FOLEY et al., 1997a; ROHRBACH et al., 2001; MARIONI-HENRY et al., 2004; HARTMANN, 2005). In diesem Alter sind auch andere Ursachen für Ergüsse bei Katzen selten. Der Kater aus dem Fallbericht (Studie 4) war ebenfalls erst zehn Monate alt.

Die Rivalta-Probe wird bei der Ergussdiagnostik bei Katzen (zumindest in Deutschland) häufig angewendet. In der retrospektiven Studie dieser Arbeit war die Wahrscheinlichkeit von FIP als Ursache des Ergusses bei einer positiven Rivalta-Probe 58 % (PPW). Dieser Wert ist viel niedriger als in früheren Studien, in denen der PPW 86 % (HARTMANN et al., 2003) und 84 % (HIRSCHBERGER et al., 1995) erreichte. In diesen früheren Studien waren, wie oben beschrieben, aber auch andere Krankheiten als Ursache für einen Rivalta-positiven Erguss selten. Eine noch nicht beendete, aktuelle Studie zeigte jedoch auch nur einen PPW der Rivalta-Probe von 17 %. Diese Studie beinhaltete aber nur 29 Katzen und sollte weiter fortgeführt werden. Die Diagnose FIP war bei den Katzen letztendlich nicht (immunhistochemisch) gesichert (HELD et al., 2011). In der Studie von HIRSCHBERGER und Mitarbeitern (1995) hatten 84 % der Katzen FIP, wenn die Rivalta-Probe positiv ausfiel. Im Gegensatz dazu wurde in der aktuellen Studie ein wesentlich höherer Anteil der Rivalta-positiven Ergüsse

durch andere Krankheiten als FIP verursacht. Eine mögliche Erklärung hierfür (neben der niedrigeren Prävalenz von FIP in der aktuellen Studie) könnte sein, dass einige Ergüsse bereits länger in den Körperhöhlen vorhanden waren, bevor sie aspiriert wurden, und sich dadurch sekundär eine Entzündung in der jeweiligen Körperhöhle entwickelte. Dadurch könnten wiederum Entzündungsmediatoren und Zytokine produziert werden, die dann eine positive Rivalta-Probe hervorriefen. Eine weitere Erklärung wäre, dass Katzen mit einem positiven Rivalta-Test und einer anderen Diagnose als FIP (wie z. B. einer Herzerkrankung) theoretisch an zwei verschiedenen Krankheiten litten. Es ist bekannt, dass z. B. eine Pankreatitis durch FIP verursacht werden kann. Wurde jedoch eine Diagnose als Grund für den Erguss gefunden (wie Herzerkrankung oder Pankreatitis), wurde häufig nicht weiter nach anderen Krankheiten gesucht. Somit wäre eine FIP bei solchen Katzen unentdeckt geblieben. Der Erguss dieser Katzen könnte also theoretisch richtig-positiv aufgrund der (nicht diagnostizierten) FIP und nicht falsch-positiv aufgrund der anderen Krankheit gewesen sein. Aber auch wenn das eine theoretisch mögliche Erklärung darstellt, ist diese relativ unwahrscheinlich, da viele dieser Katzen länger als 14 Tage gelebt haben. In einer früheren Studie wurde eine mediane Überlebenszeit von nur acht Tagen bei Katzen mit FIP beschrieben (RITZ et al., 2007). Ein weiterer wichtiger Grund für den niedrigeren PPW im Vergleich zu früheren Studien ist, dass die prädiktiven Werte stark von der Prävalenz einer Krankheit abhängen. Damit kann auch die niedrige Prävalenz von FIP in dieser Studie (35 %) den niedrigen PPW der Rivalta-Probe erklären. In der jungen Katzenpopulation (jünger als ein oder zwei Jahre) lag die Wahrscheinlichkeit einer Katze mit einer positiver Rivalta-Probe FIP zu haben damit viel höher, bei 91 % und 88 % (bedingt durch die höhere Prävalenz von FIP in dieser Population) (HIRSCHBERGER et al., 1995; FOLEY et al., 1997a; ROHRBACH et al., 2001; MARIONI-HENRY et al., 2004; HARTMANN, 2005). Da nicht viele Krankheiten differentialdiagnostisch bei einer jungen Katze mit Erguss in Frage kommen, bleibt also die Wahrscheinlichkeit von FIP bei einer positiven Rivalta-Probe bei einer jungen Katze sehr hoch.

Obwohl auch die Sensitivität der Rivalta-Probe zur Diagnose von FIP niedriger als in früheren Studien war (98 % (HARTMANN et al., 2003) und 100 % (HIRSCHBERGER et al., 1995)), kann sie mit 91 % in dieser Studie noch immer als sehr gut angesehen werden. Auch der negative prädiktive Wert (NPW) war

sehr hoch (93 %). Deshalb ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Katze mit Rivalta-negativem Erguss FIP hat sehr gering und andere Krankheiten sollten in Betracht gezogen werden. Eine aktuelle, bisher nur als Abstract veröffentlichte Studie aus Deutschland wies eine Sensitivität der Rivalta-Probe von nur 39 % auf (HELD et al., 2011).

Bezieht man die Ergebnisse der oben genannten Studie (HELD et al., 2011) mit ein, variieren die Angaben von Sensitivität und Spezifität in den wenigen, publizierten Studien zur Rivalta-Probe stark. In der vorliegenden Studie war die Spezifität mit 66 % ebenfalls niedriger als in den beiden früheren Studien (80 – 82 %) (HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003). Aufgrund der sehr unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Studien, wurde die Objektivität der Rivalta-Probe bei der Interpretation in Frage gestellt. Daher wurde in der prospektiven Studie dieser Arbeit untersucht, ob die diagnostischen Werte sich aufgrund der durchführenden und beurteilenden Person so stark unterscheiden. Es wurden insgesamt 55 Ergüsse unterschiedlicher Genese gesammelt und untersucht. FIP war bei 17 der Katzen die Ursache des Ergusses; 38 Katzen litten an anderen Krankheiten (wie z. B. Herzversagen, Neoplasien oder Pyothorax). Die Rivalta-Probe wurde aus allen 55 Ergüssen, sowohl von einer mit dem Test vertrauten Person, als auch von einer weniger geübten Person durchgeführt. Bei acht von 55 Ergüssen (15 %) unterschieden sich die Ergebnisse zwischen den beiden, durchführenden Personen. Dies stellt keine gute Übereinstimmung dar und bestätigt die vermutete Subjektivität der Rivalta-Probe. Diese schlechte Übereinstimmung könnte sowohl Folge des Fehlens von klaren Definitionen in der vorhandenen Literatur bei der Beschreibung der Durchführung sein, als auch in einer falschen Interpretation liegen (HARTMANN et al., 2003; HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009).

So sehr der Test auch von der durchführenden Person abhängt, so wenig scheinen Variationen bei den Reaktionsbedingungen (wie z. B. verschiedene Essigarten, pH-Werte, Probengefäße oder die Wasserart) einen Einfluss auf das Testergebnis zu haben. Auch eine Lagerung von bis zu drei Wochen ist sowohl im Kühlschrank, als auch bei Zimmertemperatur oder im Gefrierschrank möglich, ohne dass sich das Testergebnis signifikant verändert. Eine Lagerung im Kühlschrank wies dabei die minimal beste Übereinstimmung mit dem Testergebnis des Ergusses direkt nach Punktion auf. Die Modifikationen bei der

Durchführung der Rivalta-Probe hatten keinen großen Einfluss auf das Ergebnis.

In der retrospektiven Studie wurden Erguss- und Blutparameter von 782 Katzen mit dem Ergebnis der Rivalta-Probe verglichen, um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen einer positiven Rivalta-Probe und bestimmten Parametern besteht. Bei einer multivariaten Analyse waren vier Ergussparameter (Cholesterol, spezifisches Gewicht, Glukose und der Triglyzeridgehalt) sowie zwei Blutwerte (Albumin-Globulin-Quotient und Bilirubin) signifikant unterschiedlich zwischen Rivalta-positiven und Rivalta-negativen Ergüssen mit den höchsten Odds-Werten.

Die Vermutung, dass ein positiver Ausfall der Rivalta-Probe hauptsächlich vom Eiweißgehalt des Ergusses abhängt (MORITZ, 1902; STAEHELIN, 1902; MATRACIA et al., 1963; BERTI-BOCK et al., 1979) konnte damit in dieser Studie nicht bestätigt werden. Der Eiweißgehalt zwischen Rivalta-positiven und Rivalta-negativen Ergüssen war nicht signifikant unterschiedlich. Es gab Rivalta-negative Ergüsse mit sehr hohen und Rivalta-positive Ergüsse mit sehr niedrigen Eiweißgehalten. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen also, dass die Konzentration des Gesamteiweißes nicht sehr gut mit einem positiven Ausfall der Rivalta-Probe korreliert. Deshalb ist anzunehmen, dass eben nicht nur der Eiweißgehalt für ein positives Ergebnis verantwortlich ist, sondern noch andere Komponenten in den Ergüssen beteiligt sind. Der Cholesterolgehalt zeigte zwischen Rivalta-positiven und Rivalta-negativen Ergüssen einen statistisch signifikanten Unterschied. Cholesterol hat sich als nützlicher Parameter zur Unterscheidung von Transsudaten und Exsudaten in menschlichen Körperhöhlenergüssen erwiesen. Die Gründe für die höheren Konzentrationen in Exsudaten sind nicht genau bekannt (JENSS et al., 1989; GULERIA et al., 2003; VALDES et al., 2010). Eine mögliche Erklärung ist eine Bildung des Cholesterols im Erguss durch eine Degeneration von Ergusskomponenten (z. B. Leukozyten und Erythrozyten). Das Cholesterol könnte auch aufgrund einer erhöhten Gefäßpermeabilität bei einer Vaskulitis aus den Gefäßen austreten (VALDES et al., 1991; VALDES et al., 2010). Da in der retrospektiven Studie viel mehr Rivalta-positive Ergüsse als Exsudate klassifiziert wurden (und Exsudate höhere Cholesterolwerte aufweisen), erscheint es logisch, dass die Cholesterolwerte in diesen Rivalta-positiven Ergüssen höher waren. Ob jedoch das Cholesterol in Ergüssen tatsächlich für eine positive Rivalta-Probe mit verantwortlich ist, muss noch weiter untersucht werden. Interessanter Weise waren die Triglycerid-Konzentrationen in Rivalta-

positiven Ergüssen niedriger als in Rivalta-negativen Ergüssen. Eine ähnliche Verteilung der Konzentrationen von Triglycerid und Cholesterol wäre eigentlich zu erwarten gewesen. Es wurde jedoch in einer Studie mit Mäusen gezeigt, dass durch die Fütterung von Cholesterol die Produktion von Triglyceriden gesenkt werden kann (VAN DER VEEN et al., 2007). Somit könnten die niedrigen Triglycerid-Konzentrationen eine Folge der erhöhten Cholesterol-Werte darstellen. Ein anderer Grund hierfür könnte sein, dass sich bei einigen Ergüssen, die sich für eine längere Zeit in der Körperhöhle befanden, bevor sie punktiert werden, ein „Pseudochylus“ entwickelt. Für diesen ist eine hohe Cholesterol-Konzentration ohne ein Vorhandensein von Triglyceriden im Erguss typisch (HILLERDAL, 1997). Die Cholesterol-Konzentration erhöht sich in diesem Fall, weil Cholesterol entweder schlecht rückresorbiert werden kann (und sich somit langsam ansammelt), oder weil es von Serumlipoproteinen abgegeben wird (HAMM et al., 1991; HILLERDAL, 1997).

Die einzigen, statistisch und klinisch relevanten Unterschiede zwischen Rivalta-positiven und Rivalta-negativen Ergüssen im Blut zeigten der Albumin-Globulin-Quotient und die Bilirubin-Konzentration. Katzen mit einer positiven Rivalta-Probe hatten einen medianen Albumin-Globulin-Quotient von 0,56 im Blut, während Katzen mit Rivalta-negativem Erguss einen medianen Quotienten von 0,88 aufwiesen. Der niedrige Albumin-Globulin-Quotient hängt nicht nur von hohen Globulinwerten, sondern auch von einem niedrigen Albumingehalt ab. Das niedrige Albumin könnte durch eine eingeschränkte Produktion der Leber oder durch eine Vaskulitis verursacht worden sein, wodurch Protein und andere Blutkomponenten in den Erguss ausgetreten sein können und dadurch zu einer positiven Rivalta-Probe geführt haben. Der andere signifikante Blutparameter, welcher den besten Odds-Wert (1,019) in der multivariaten Analyse aufwies, war das Bilirubin. Dafür verantwortlich könnte der hohe Anteil an Katzen mit FIP in der Studie sein (NORRIS et al., 2005), da diese häufig eine Hyperbilirubinämie (meist ohne Erhöhung der Leberenzyme) aufweisen. Vermutet wird hierbei ein veränderter Bilirubin-Metabolismus und eine reduzierte Ausscheidung in das Gallengangsystem (HARTMANN, 2005). Zytokine können den Abbau von Bilirubin beeinflussen. Entweder verringern diese die Transporter-Gen-Expression, oder sie unterdrücken die Transport-Protein-Funktion in den Leberzellen. Als Folge erhöht sich das Bilirubin im Serum (ZOLLNER &

TRAUNER, 2006). Eine Hyperbilirubinämie bei FIP könnte auch durch Hämolyse (z. B. aufgrund von disseminierter intravasaler Gerinnung oder sekundärer autoimmunhämolytischer Anämie), Granulomen in der Leber oder durch eine Cholestase verursacht werden.

In einem Fallbericht wurde der sehr akute Verlauf eines Katers mit FIP vorgestellt. Einzige Ergusshöhle am Tag der Vorstellung war das Perikard. Auch im Blut wies der Kater zunächst keine Hinweise für FIP auf. Der Erguss war Rivalta-positiv. Dadurch lag der Verdacht auf FIP nahe. Der Antigen-Nachweis in den Ergussmakrophagen fiel jedoch negativ aus. Ein falsch-negatives Ergebnis kann durch eine zu geringe Zellzahl (und dadurch zu wenigen Makrophagen zum Nachweis von intrazellulären FCoV-Antigenen) auftreten. Durch kompetitive Bindung können die Antigene im Erguss, an FCoV-Antikörper binden. Damit werden die Antigene maskiert und die fluoreszierenden Antikörper können nicht mehr daran binden (BARLOUGH & STODDART, 1988; PEDERSEN, 1995). Trotzdem wurde die Diagnose FIP bei dem Kater nach dem Tod durch die pathologische Untersuchung gestellt.

Es gibt bis heute keine bestätigten Fälle von Katzen, bei denen die Diagnose FIP gesichert wurde, die durch Therapie geheilt werden konnten oder bei denen durch eine Therapie eine dauerhafte Verbesserung des Allgemeinbefindens oder einer Verlängerung der Überlebenszeit hätten nachgewiesen werden können (HARTMANN, 2005; LITTLE, 2005; NORRIS; RITZ et al., 2007; SCHERK). Aufgrund einzelner Fallberichte, in denen von einem positiven Effekt des Methylxanthinderivates PTX berichtet wird, wurde in der vorliegenden Studie ein Therapieversuch mit PPF (einem sehr ähnlichen Methylxanthinderivat) durchgeführt (<http://www.VIN.com>) (LITTLE, 2005; SCHERK; PEDERSEN, 2009). Den Berichten zur Folge kann PTX eine Katze mit FIP zwar nicht heilen, jedoch soll es die Überlebenszeit verlängern. Mit den Ergebnissen der aktuellen Studie kann dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Katzen aus der Placebo- und der PPF-Gruppe, weder bei der Überlebenszeit, noch bei irgendeinem Blutparameter (des Blutbildes und des durchgeführten Serumprofiles). Die Katzen überlebten durchschnittlich acht Tage. Dies stimmt mit der medianen Überlebenszeit einer früheren Studie überein (RITZ et al., 2007). Der erhoffte Effekt einer Reduktion der Ergussmenge durch Hemmung von Zytokinen (v. a. von TNF- $\alpha$ ) und dadurch

der Vaskulitis (STRIETER et al., 1988; MARTON et al., 1998; MEINERS et al., 2004) konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Weder die Ergussmenge, noch die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen konnten durch PPF bei den individuellen Katzen signifikant gesenkt werden. Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen stiegen teilweise sogar an. Sehr wahrscheinlich war PPF in der kurzen Zeit bis zum Tode der Katzen nicht in der Lage, seine vollständige Wirkung zu erreichen, da diese nach Herstellerangaben bei den Methylxanthinderivaten erst nach zwei bis vier Wochen Behandlungsdauer zu erwarten ist. Der Anstieg von TNF- $\alpha$  könnte das starke Fortschreiten der Erkrankung anzeigen. Auch wenn keine Heilung erwartet wurde, da PPF kein antivirales Arzneimittel ist, hätte man sich einen positiven Effekt auf das Allgemeinbefinden sowie auf die Überlebenszeit erhofft. Mögliche Gründe für das Versagen dieser Therapie sind vielfältig. Am wahrscheinlichsten ist, dass die Therapie zu spät begonnen wurde. Denn wenn die Katzen klinische Anzeichen einer Vaskulitis zeigen, ist die Krankheit vermutlich bereits zu weit fortgeschritten. Die Zytokinproduktion ist wahrscheinlich zu stark angeregt, um durch PPF noch inhibiert werden zu können. In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass die meisten Katzen ein bis zwei Wochen nach Inokulation mit dem mutierten FCoV klinische Symptome zeigen (JACOBSE-GEELS et al., 1982). Die Herstellerangaben von PTX beschreiben einen Wirkeintritt etwa zwei bis vier Wochen nach Therapiebeginn. Da für PPF eine ähnliche Anflutungsdauer angenommen werden kann, waren beinahe alle Katzen dieser Studie bereits tot, bevor PPF seine volle Wirkung entwickeln konnte. Eine andere Möglichkeit für die mangelnde Wirksamkeit könnte ein zu langes Zeitintervall zwischen den Behandlungen sein. Wie in den Fallberichten über PTX beschrieben, wurde PPF in dieser Studie alle zwölf Stunden oral verabreicht (NICHOLS et al., 2001; LITTLE, 2005; SCHERK; STURSBURG et al., 2010). Die Herstellerangaben empfehlen jedoch aufgrund einer relativ kurzen Halbwertszeit eine Eingabe dreimal täglich (also alle 8 Stunden) (WARD & CLISSOLD, 1987; MARSELLA et al., 2000).

In dieser Studie überlebte nur eine Katze länger als vier Wochen. Diese Katze war eine von zwei Katzen, die am Tag der Vorstellung in der Klinik noch keinen Erguss aufwiesen. Sie wurde mit PPF therapiert. Es ist möglich, dass bei dieser Katze die Vaskulitis noch nicht weit genug fortgeschritten war, um einen Erguss zu verursachen. So könnte PPF genug Zeit gehabt haben, um seine Wirkung zu

entfalten und zunächst durch Hemmung von TNF- $\alpha$  ein Fortschreiten der Vaskulitis zu unterdrücken. Diese Katze könnte auch in einem früheren Stadium der Erkrankung in der Klinik vorgestellt (und FIP damit in einem früheren Stadium diagnostiziert) worden sein als die anderen Katzen. Die relativ längere Überlebenszeit könnte also auch nur von einer früheren Aufnahme in die Studie herrühren, und unabhängig von der Therapie mit PPF sein. Möglicherweise wirkt PPF auch nur bei Katzen, die noch keinen Erguss haben.

Die Behandlung mit PPF ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, weder in der Überlebenszeit, im Allgemeinbefinden, noch bei den anderen untersuchten Parametern. Wenige Katzen zeigten kurz nach Aufnahme in die Studie eine Verbesserung des Allgemeinbefindens. Dieses ist aber wahrscheinlich auf die begleitende Anwendung von Glukokortikoiden zurückzuführen und stellt keinen Effekt von PPF dar, da diese Verbesserung in beiden Gruppen beobachtet werden konnte. Jedoch hielt dieses bessere Allgemeinbefinden nicht lange an, und der Allgemeinzustand der Katzen verschlechterte sich schnell zwischen Tag vier und 21 nach Therapiebeginn.

Zu diskutieren ist auch die Behandlung mit Glukokortikoiden von Katzen mit FIP. Glukokortikoide werden häufig eingesetzt, da es nicht das Virus selbst zu sein scheint, sondern das eigene Immunsystem der an FIP erkrankten Katzen, welches die fatalen Schäden im Tier verursacht (MADEWELL et al., 1978; BILKEI, 1988; WATARI et al., 1998; ISHIDA et al., 2004; HARTMANN, 2005; RITZ et al., 2007). Es existieren jedoch bis heute keine evidenz-basierten Studien, dass Glukokortikoide tatsächlich einen positiven Effekt bei Katzen mit FIP haben (ADDIE et al., 2009). Auch Vor- und Nachteile der Injektion in die jeweilige Ergusshöhle sollten überdacht werden. Diese Applikationsart wird aufgrund besserer und schnellerer lokaler Wirkung am Ort der vorherrschenden Vaskulitis empfohlen (HARTMANN, 2005). Sie ist jedoch deutlich invasiver und vermutlich auch mit mehr Stress für die Katzen verbunden als eine subkutane oder orale Applikation (welche auch zu Hause durchgeführt werden könnte). Die eine Katze dieser Studie, die länger als vier Wochen lebte, hatte am Tag der Vorstellung noch keinen Erguss gebildet und erhielt daher die Glukokortikoide subkutan. Ob diese Katze nun eine längere Überlebenszeit als die anderen Katzen aufwies, weil sie das Studienmedikament PPF erhalten hatte, weil sie nicht täglich

Kortison in eine Körperhöhle injiziert bekam oder aus ganz anderen Gründen etwas länger überlebte, bleibt Spekulation. Der Kater aus dem Fallbericht erhielt ebenfalls intrathorakale und sogar intraperikardiale Injektionen mit Dexamethason. Auch dieser Kater verstarb relativ schnell (nach sieben Tagen) und es kann somit nicht von einem positiven Effekt des Kortisons bei dieser an FIP erkrankten Katze gesprochen werden. Letztendlich muss überlegt werden, ob die Gabe von immunsuppressiven Dosen von Glukokortikoiden bei Katzen mit FIP, entgegen der bisherigen Empfehlungen, eher einen potentiellen Negativfaktor darstellt (ROHRER, 1993; FOLEY et al., 1997a). Eine Verabreichung von niedrigeren Dosen (oder überhaupt keinen Glukokortikoiden) sollten als „Langzeittherapie“ in Betracht gezogen werden.

Im Moment existiert also noch immer keine wirksame Therapieform zur Heilung einer an FIP erkrankten Katze. Es gibt noch nicht einmal ein Medikament, das einen nachgewiesenen positiven Effekt auf das Wohlbefinden von Katzen mit FIP aufweist. Eine kürzlich publizierte Fallserie mit Polyprenyl-Immunostimulant berichtet zumindest von einer längeren Überlebenszeit und Verbesserung der klinischen Symptome bei der „eher granulomatösen“ Form von FIP. Jedoch bestand diese Studie aus nur drei Katzen (von denen zwei Katzen eine definitive Diagnose von FIP hatten). Es gab keine Kontrollgruppe und der Autor selbst beschreibt, dass das Medikament bei der „eher feuchten Form“ bisher keinen Effekt erzielen konnte (LEGENDRE & BARTGES, 2009).

## VIII. ZUSAMMENFASSUNG

### **Untersuchungen zur Diagnose und Therapie der felines infektiösen Peritonitis**

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Doktorarbeit, welche vier Publikationen umfasst. Die ersten beiden Publikationen beschäftigen sich mit der Rivalta-Probe. Diese wird als Labortest bei Verdacht auf feline infektiöse Peritonitis genutzt. In der ersten Studie wurde eine retrospektive Auswertung von 782 Ergüssen von Katzen durchgeführt, die in den Jahren 1999 bis 2010 in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt wurden. Ziel der Arbeit war eine Auswertung der Daten dieser Katzen in Bezug auf den diagnostischen Nutzen der Rivalta-Probe sowie die Untersuchung einer Korrelation des Ergebnisses zu bestimmten Erguss- oder Blutparametern. Gesammelte Daten waren Alter der Katzen, Erguss- und Blutparameter und die Diagnose, die für den Erguss verantwortlich war. Die Prävalenz der felines infektiösen Peritonitis unter den Katzen mit Erguss in dieser Studie lag bei 34,6 %. Die Rivalta-Probe zeigte eine Sensitivität von 91,3 %, eine Spezifität von 65,5 %, einen positiven prädiktiven Wert von 58,4 % und einen negativen prädiktiven Wert von 93,4 % für die Diagnose einer felines infektiösen Peritonitis. In der multivariaten Analyse waren die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Rivalta-positiven und Rivalta-negativen Ergüssen in der Cholesteroll-Konzentration und dem spezifisches Gewicht im Erguss sowie beim Albumin-Globulin-Quotient und dem Bilirubin im Blut ersichtlich. Das Ergebnis dieser Studie zeigt, dass die Rivalta-Probe als nützlicher Test bei der Diagnosefindung einer felines infektiösen Peritonitis anzusehen ist, aber die Sensitivität und die Spezifität nicht so hoch sind wie bisher angenommen. Der stets postulierte Eiweißgehalt eines Ergusses konnte in dieser Studie nicht als Ursache für eine Rivalta-positive Probe bestätigt werden. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, welche Parameter im Erguss von Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis zu einem positiven Ausfall der Rivalta-Probe führen.

Ziel der zweiten Studie war es, die optimalen Lager- und Reaktionsbedingungen

der Rivalta-Probe sowie das Ausmaß der Subjektivität des Testes zu erforschen. Um die optimalen Lagerbedingungen zu untersuchen, wurde die Rivalta-Probe bei 55 Ergüssen täglich bis zum Tag 21 nach Entnahme des Ergusses und nach Lagerung bei Raumtemperatur, im Kühlschrank und in der Gefriertruhe wiederholt. Für die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen wurde die Rivalta-Probe mit verschiedenen Mengen an Eisessig sowie mit verschiedenen Essig- und Wasserarten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit denen einer standardisierten Methode verglichen. Der Test wurde zudem von zwei unterschiedlichen, gegenseitig geblindeten Personen durchgeführt. Die Lagerung bis zu 21 Tagen hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis der Rivalta-Probe. Die Aufbewahrung im Kühlschrank zeigte die besten (jedoch nicht signifikanten) Werte und kann deshalb empfohlen werden. Auch die Modifikationen bei der Durchführung führten zu keinen signifikanten Unterschieden bei den Ergebnissen. Jedoch gab es Unterschiede bei der Auswertung zwischen verschiedenen Personen. Dies klassifiziert die Rivalta-Probe als einen robusten, aber sehr subjektiven Test, dessen Beurteilung eine gewisse Erfahrung erfordert.

In der dritten Studie wurde der Einfluss von Propentofyllin auf die Überlebenszeit und die Lebensqualität bei Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis ermittelt. In der randomisierten Doppelblindstudie wurden 23 Katzen mit einer bestätigten feline infektiösen Peritonitis zwischen April 2009 und Dezember 2010 mit Propentofyllin oder Placebo behandelt. Alle Katzen erhielten zusätzlich Glukokortikoide, Antibiotika und symptomatische Therapie. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit, der Lebensqualität, bei den klinischen Symptomen und den Laborparametern (Blutbild, Serumprofil) zwischen den Katzen, die mit Propentofyllin oder Placebo behandelt wurden. Zudem konnte weder die TNF- $\alpha$ -Konzentration noch die Ergussmenge durch Propentofyllin signifikant gesenkt werden. Die Überlebenszeit der Katzen lag zwischen vier und 36 Tagen.

Die vierte Publikation stellt einen Fallbericht eines Katers mit Perikarderguss dar. Bei diesem Kater traten die Symptome sehr akut auf und initial lagen im Blut keine „FIP-typischen“ Veränderungen vor. Erguss war bei Vorstellung der Katze beinahe ausschließlich im Perikard (nicht im Abdomen und nur geringstgradig im Thorax) vorhanden. Dieser Fallbericht verdeutlicht, neben einer eher außergewöhnlichen Manifestation, den oft progressiven Verlauf von FIP.

## **IX. SUMMARY**

### **Studies on diagnosis and treatment of feline infectious peritonitis**

This doctoral thesis is a cumulative publication, containing 4 studies. Subject of the first and the second study is the Rivalta's test that is used as a laboratory test in cats with effusion in which feline infectious peritonitis is suspected. In the first study, a retrospective analysis was performed including 782 effusions of cats that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig Maximilian University of Munich, Germany, between 1999 and 2010. The objectives of this study were to determine the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the Rivalta's test to diagnose FIP, using a large cohort of cats with a definitive diagnosis, and to investigate its correlation with effusion and blood variables. Information collected on the cats with effusion included the age of the cats, effusion and blood parameters, and a definitive diagnosis responsible for the effusion. The prevalence of feline infectious peritonitis in cats with effusion was 34.6%. The Rivalta's test showed a sensitivity of 91.3%, a specificity of 65.5%, a positive predictive value of 58.4%, and a negative predictive value of 93.4% for the diagnosis of feline infectious peritonitis. In the multivariate analysis the statistically significant differences between Rivalta-positive and -negative effusions were apparent in the concentration of cholesterol and the specific gravity in the effusion, as in the albumin to globulin ratio and the bilirubin in the blood. The findings of this study suggest that the Rivalta's test in general is an easy and cheap test to diagnose feline infectious peritonitis, but its sensitivity and specificity are not as high as previously assumed. The total protein content of effusions as causative agent for a positive Rivalta's test, as it was always postulated, could not be confirmed in this study. It still could not be clarified which components, however, in the effusion of cats with feline infectious peritonitis lead to a positive test result.

Aim of the second study was to determine optimum storage and reaction conditions of the Rivalta's test as well as interobserver variation and subjectivity

of the test. To examine the influence of storage, the Rivalta's test was repeated with 55 effusions daily, up to 21 days after paracentesis, with storage of the effusion at room temperature, in the refrigerator, or in the freezer. To determine optimum reaction conditions, the test was performed with different volumes of acetic acid, with different acids, as well as with different kinds of water. The results were compared to those of a standardized method. To determine interobserver variation, the test was performed by two independent blinded investigators. Storage up to 21 days had no influence on the outcome of the Rivalta's test. Storage in the refrigerator showed the slightly (but not significantly different) best results; therefore, storage in the refrigerator can be recommended. Modifications of test conditions showed no significant differences between the results. However, there were differences in the interpretation between the two different persons. Therefore, the Rivalta's test appears to be a very robust, but also very subjective test. The assessment of the test requires some experience.

In the third study, the influence of propentofylline on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis was evaluated. In the randomized, double-blinded study, 23 cats with confirmed feline infectious peritonitis were treated with either propentofylline or placebo between April 2009 and December 2010. Additionally, glucocorticoids, antibiotics, and symptomatic treatment were given to all cats. There was no significant difference in survival time, quality of life, or between any other clinical or laboratory parameters (including complete blood count and serum biochemistry profile) between cats treated with propentofylline and cats treated with placebo. Neither the TNF- $\alpha$  concentration, nor the amount of effusion could be reduced by treatment with propentofylline. Cats survived between 4 and 36 days.

The fourth publication is a case report about a cat with pericardial effusion. In this cat, the clinical symptoms were very acute and initially, no "FIP-typical" changes were apparent in the blood. At the day the cat was presented to the clinic, effusion was almost exclusively present in the pericard (not yet in the abdomen, and just very little in the thorax). Besides the unusual presentation, this case report illustrates the often progressive process of FIP once effusion is present.

**X. LITERATURVERZEICHNIS**

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

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

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

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

Addie DD, Toth S, Thompson H, Greenwood N, Jarrett JO. Detection of feline parvovirus in dying pedigree kittens. *Vet Rec* 1998; 142: 353-6.

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

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

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

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

Addie DD, Jarret O. Feline coronavirus infections. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd edn. Green CE, ed. St. Louis: Saunders Elsevier 2006: 88-102.

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.

Alleman AR. Abdominal, thoracic, and pericardial effusions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 89-118.

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

Arias-Diaz J, Vara E, Garcia C, Torres-Melero J, Rodriguez JM, Balibrea JL. Pentoxifylline partially reverts the effect of tumor necrosis factor on human islets. *Transplant Proc* 1994; 26: 698-700.

Bachet P, Lancrenon S, Chassoux G. Fibrinogen and pentoxifylline. *Thromb Res* 1989; 55: 161-3.

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

Beatty J, Barrs V. Pleural effusion in the cat: a practical approach to determining aetiology. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 693-707.

Benbaccer L, Kut E, Besnardeau L, Laude H, Delmas B. Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 1997; 71: 734-7.

Bence LM, Addie DD, Eckersall PD. An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 335-41.

Berti-Bock G, Vial F, Premuda L, Rulliere R. Exudates, transudates and the Rivalta reaction (1895). Current status and historical premises. *Minerva Med* 1979; 70: 3573-80.

Bilkei G. Beitrag zur Therapie der FIP. *Tierärztl Umschau* 1988; 43: 192-6.

Bölskei A, Bilkei G. Langzeitstudie über behandelte FIP-verdächtige Katzen. *Tierärztl Umschau* 1995; 50: 721-8.

Breuer W, Stahr K, Majzoub M, Hermanns W. Bone-marrow changes in infectious diseases and lymphohaemopoietic neoplasias in dogs and cats - a retrospective study. *J Comp Pathol* 1998; 119: 57-66.

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

Brown MA. Genetic determinants of pathogenesis by feline infectious peritonitis virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 143: 265-8.

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

Chanas AC, Ellis DS, Stamford S, Gould EA. The interaction of monoclonal antibodies directed against envelope glycoprotein E1 of Sindbis virus with virus-infected cells. *Antiviral Res* 1982; 2: 191-201.

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.

Claudy A. Pathogenesis of leukocytoclastic vasculitis. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 75-9.

Corapi WV, Olsen CW, Scott FW. Monoclonal antibody analysis of neutralization and antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus. *J Virol* 1992; 66: 6695-705.

Corapi WV, Darteil RJ, Audonnet JC, Chappuis GE. Localization of antigenic sites of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus involved in neutralization and antibody-dependent enhancement. *J Virol* 1995; 69: 2858-62.

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

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

De La Fuente M, Miquel J, Catalan MP, Victor VM, Guayerbas N. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res* 2002; 36: 119-26.

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

Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Feline infectious peritonitis virus-

infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition. *J Gen Virol* 2006; 87: 1685-90.

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

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

Egberink HF, Herrewegh AP, Schuurman NM, van der Linde-Sipman JS, Horzinek MC, de Groot RJ. FIP, easy to diagnose? *Vet Q* 1995; 17 Suppl 1: S24-5.

Eisenack W. Untersuchungen über Exsudat und Transsudat (Dissertation). Veterinär-Medizinische Fakultät der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen; 1951.

Evermann JF, Henry CJ, Marks SL. Feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 1130-4.

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

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* 1997b; 210: 1307-12.

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

Ford RB. Biological response modifiers in the management of viral infection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1986; 16: 1191-204.

Fratelli L. In memoria del Prof. Fabio Rivalta: La "reazione di Rivalta." scritti medici in suo onore. Società-medico chirurgica di Romagna. 1939; 50: 398.

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.

Gargano F, Brusca EA. Reduction of the positivity of the Rivalta exudate reaction induced by electropositive proteins. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1960; 36: 445-6.

Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, Paltrinieri S. Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J* 2004; 167: 38-44.

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.

Gollins SW, Porterfield JS. Flavivirus infection enhancement in macrophages: radioactive and biological studies on the effect of antibody on viral fate. *J Gen Virol* 1984; 65: 1261-72.

Gollins SW, Porterfield JS. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. *J Gen Virol* 1985; 66: 1969-82.

Goodson T, Randell S, Moore L. Feline infectious peritonitis. *Compend Contin Educ Vet* 2009; 31: 1-9.

Gross WL. New developments in the treatment of systemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6: 11-9.

Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, de la Fuente M. Improvement of the macrophage functions in prematurely ageing mice by a diet supplemented with

thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2004; 50: 677-81.

Guleria R, Agarwal SR, Sinha S, Pande JN, Misra A. Role of pleural fluid cholesterol in differentiating transudative from exudative pleural effusion. *Natl Med J India* 2003; 16: 64-9.

Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 1998; 62: 193-205.

Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977; 146: 201-17.

Hamm H, Pfalzer B, Fabel H. Lipoprotein analysis in a chyloform pleural effusion: implications for pathogenesis and diagnosis. *Respiration* 1991; 58: 294-300.

Hammerschmidt DE, Kotasek D, McCarthy T, Huh PW, Freyburger G, Vercellotti GM. Pentoxifylline inhibits granulocyte and platelet function, including granulocyte priming by platelet activating factor. *J Lab Clin Med* 1988; 112: 254-63.

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

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

Hartmann K. Feline infektiöse Peritonitis. In: *Infektionskrankheiten der Katze*. Hartmann K, Hein J, eds. München: Schlütersche 2008: 42-61.

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

Hayashi T, Ishida T, Fujiwara K. Glomerulonephritis associated with feline infectious peritonitis. *Nippon Juigaku Zasshi* 1982; 44: 909-16.

Held S, König M, Hamann H-P, Neiger R. Evaluierung diagnostischer Tests für feline infektiöse Peritonitis (FIP) bei Katzen mit Aszites (Abstract). *Tierärztl Prax* 2011; 1: 11.

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.

Hillerdal G. Chylothorax and pseudochylothorax. *Eur Respir J* 1997; 10: 1157-62.

Hiraku S, Taniguchi K, Wakitani K, Omawari N, Kira H, Miyamoto T, Okegawa T, Kawasaki A, Ujiie A. Pharmacological studies on the TXA<sub>2</sub> synthetase inhibitor (E)-3-[p-(1H-imidazol-1-ylmethyl)phenyl]-2-propenoic acid (OKY-046). *Jpn J Pharmacol* 1986; 41: 393-401.

Hirschberger J. Körperhöhlenergüsse beim Kleintier, Ätiologie - Diagnostik - Therapie. *Tierärztliche Umschau* 1992; 47: 571.

Hirschberger J. Klinisch-chemische und zytologische Differenzierung von

Körperhöhlenergüssen bei Hund und Katze (Habilitation). Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München; 1994.

Hirschberger J. Cytology of body cavity effusions. Tierarztl Prax 1995; 23: 192-9.

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

Hohdatsu T, Nakamura M, Ishizuka Y, Yamada H, Koyama H. A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. Arch Virol 1991; 120: 207-17.

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

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

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

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

Ishida T, Shibana A, Tanaka S, Uchida K, Mochizuki M. Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. J Feline Med Surg 2004; 6: 107-9.

Jacobse-Geels HE, Daha MR, Horzinek MC. Isolation and characterization of

feline C3 and evidence for the immune complex pathogenesis of feline infectious peritonitis. *J Immunol* 1980; 125: 1606-10.

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

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

Janowski W. Über die Entscheidung der Transsudate von Exudate mittels einer Probe mit stark verdünnten Esigsäure (Probe von Rivalta). *Berl klin Wochenschr* 1907; 44: 1412.

Jennette JC, Falk RJ. Update on the pathobiology of vasculitis. *Monogr Pathol* 1995; 37: 156-72.

Jennette JC, Thomas DB, Falk RJ. Microscopic polyangiitis (microscopic polyarteritis). *Semin Diagn Pathol* 2001; 18: 3-13.

Jenss U, Towe D, Diwok K. Determination of individual lipid parameters in non-chylous pleural effusions. *Z Erkr Atmungsorgane* 1989; 173: 161-5.

Joachim J. Ueber die Eiweissvertheilung in menschlichen und thierischen Körperflüssigkeiten. *Pflügers Arch Europ J Physiol* 1903; 93: 558-604.

Kasbohm C. Effusions of body cavities in the dog (2). Clinical and diagnostic study with special reference to punctate cytology. *Tierarztl Prax* 1976; 4: 85-94.

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.

Kent M. The cat with neurological manifestations of systemic disease. Key conditions impacting on the CNS. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 395-407.

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

Kipar A, Boretti FS, Meli MM, Failing K, Reinacher M, Lutz H. Reduced constitutive cytokine transcription in isolated monocytes of clinically healthy cats, infected with an FIV strain of low pathogenicity. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 98: 215-21.

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.

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

Lega F. In Memoria del Prof. Fabio Rivalta: La "reazione de Rivalta". *J Am Med Assoc* 1939; 114: 915-6.

Legendre AM, Bartges JW. Effect of Polyprenyl Immunostimulant on the survival times of three cats with the dry form of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 624-6.

Liggitt HD, DeMartini JC. The pathomorphology of malignant catarrhal fever. I. Generalized lymphoid vasculitis. *Vet Pathol* 1980; 17: 58-72.

Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WCJ. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-13.

Little S. Diagnosis and treatment of FIP in the real world. In: *Western Veterinary Conference 2005: S7D*.

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

Marioni-Henry K, Vite CH, Newton AL, Van Winkle TJ. Prevalence of diseases of the spinal cord of cats. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 851-8.

Marsella R, Nicklin CF, Munson JW, Roberts SM. Pharmacokinetics of pentoxifylline in dogs after oral and intravenous administration. *Am J Vet Res* 2000; 61: 631-7.

Marton J, Farkas G, Takacs T, Nagy Z, Szasz Z, Varga J, Jarmay K, Balogh A,

Lonovics J. Beneficial effects of pentoxifylline treatment of experimental acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 197: 293-9.

Matracia S, Campo G, Titone C. Interaction between globin and Rivalta-positive colloids. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1963; 39: 148-9.

McKeirnan AJ, Evermann JF, Davis EV, Ott RL. Comparative properties of feline coronaviruses *in vitro*. *Can J Vet Res* 1987; 51: 212-6.

McReynolds C. Feline Infectious Peritonitis. Part I. Etiology and Diagnosis. *Comp Cont Educ Pract Vet* 1997; 19: 1007-16.

Meiners I, Hauschildt S, Nieber K, Munch G. Pentoxifylline and propentofylline are inhibitors of TNF- $\alpha$  release in monocytes activated by advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 2004; 111: 441-7.

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.

Meyers DG, Meyers RE, Prendergast TW. The usefulness of diagnostic tests on pericardial fluid. *Chest* 1997; 111: 1213-21.

Mochizuki M, Mitsutake Y, Miyanohara Y, Higashihara T, Shimizu T, Hohdatsu T. Antigenic and plaque variations of serotype II feline infectious peritonitis coronaviruses. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 253-8.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenichitsomanus PT, McMichael A, Malasit P, Screaton G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic

fever. *Nat Med* 2003; 9: 921-7.

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

Moritz F. Beiträge zur Lehre von den Exsudaten und Transsudaten (Dissertation). Hohe Medicinische Facultät der königl. Ludwig-Maximilians-Universität zu München 1886.

Moritz F. Ueber den durch Essigsäure fällbaren Eiweisskörper in Exsudaten. *Munch Med Wochenschr* 1902; 42: 1748-9.

Movat HZ. Tumor necrosis factor and interleukin-1: role in acute inflammation and microvascular injury. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 668-81.

Movat HZ, Cybulsky MI, Colditz IG, Chan MK, Dinarello CA. Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils. *Fed Proc* 1987; 46: 97-104.

Neuner P, Klosner G, Schauer E, Pourmojib M, Macheiner W, Grunwald C, Knobler R, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. Pentoxifylline *in vivo* down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 1994; 83: 262-7.

Nichols PR, Morris DO, Beale KM. A retrospective study of canine and feline cutaneous vasculitis. *Vet Dermatol* 2001; 12: 255-64.

Norris J. Feline infectious peritonitis (FIP): update 2007 [Internet]. University of Sydney 2007; <http://www.ancats.com.au/PDF%20Files/Feline%20Infectious%20Peritonitis%20summary%20August%202007%20-%20for%20catteries.pdf>

Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R.

Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). *Aust Vet J* 2005; 83: 666-73.

O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, Colly L, Evermann JF, Bush M, Wildt DE. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 1985; 227: 1428-34.

Olsen CW, Corapi WV, Ngichabe CK, Baines JD, Scott FW. Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages. *J Virol* 1992; 66: 956-65.

Olsen CW. A review of feline infectious peritonitis virus: molecular biology, immunopathogenesis, clinical aspects, and vaccination. *Vet Microbiol* 1993; 36: 1-37.

Olsen CW, Corapi WV, Jacobson RH, Simkins RA, Saif LJ, Scott FW. Identification of antigenic sites mediating antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infectivity. *J Gen Virol* 1993; 74: 745-9.

Onouchi Z, Kawasaki T. Overview of pharmacological treatment of Kawasaki disease. *Drugs* 1999; 58: 813-22.

Ota S, Kasahara A, Yamada T, Tanimoto M. Dermatomyositis with massive ascites. *Rheumatol Int* 2007; 27: 877-9.

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

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

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

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

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

Pedersen NC, Boyle JF. Immunologic Phenomena in the Effusive Form of Feline Infectious Peritonitis. *Am J Vet Res* 1980; 41: 868-76.

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

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

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

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

Pedersen NC. An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Feline Pract.* 1995; 23: 7-20.

Pedersen NC, Hawkins KF. Mechanisms for persistence of acute and chronic

feline calicivirus infections in the face of vaccination. *Vet Microbiol* 1995; 47: 141-56.

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.

Peiris JS, Porterfield JS. Antibody-mediated enhancement of Flavivirus replication in macrophage-like cell lines. *Nature* 1979; 282: 509-11.

Peiris JS, Porterfield JS. Antibody-dependent enhancement of plaque formation on cell lines of macrophage origin - a sensitive assay for antiviral antibody. *J Gen Virol* 1981; 57: 119-25.

Pesteanu-Somogyi LD, Radzai C, Pressler BM. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *J Feline Med Surg* 2006; 8: 1-5.

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

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

Porter DD, Larsen AE, Porter HG. The pathogenesis of Aleutian disease of mink. 3. Immune complex arteritis. *Am J Pathol* 1973; 71: 331-44.

Porterfield JS. Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. *Adv Virus Res* 1986; 31: 335-55.

Rahman NM, Chapman SJ, Davies RJ. Pleural effusion: a structured approach to care. *Br Med Bull* 2004; 72: 31-47.

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

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.

Rivalta F. Su di una nuova reazione per la diagnosi chimica differenziale fra gli essudati sierosi e i semplici trasudati. *La Riforma Medica* 1895: 242.

Robison RL, Holzworth J, Gilmore CE. Naturally occurring feline infectious peritonitis: signs and clinical diagnosis. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158: Suppl 2: 981-6.

Rohrbach BW, Legendre AM, Baldwin CA, Lein DH, Reed WM, Wilson RB. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1111-5.

Rohrer C. Die Diagnostik der feline infektiösen Peritonitis (FIP): Retrospektive und prospektive Untersuchungen. *Kleintierpraxis* 1993; 38: 379-89.

Rottier PJ. The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Vet Microbiol* 1999; 69: 117-25.

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.

Sakai N, Iijima S, Shiba K. Reinvestigation of clinical value of Rivalta reaction of puncture fluid. *Rinsho Byori* 2004; 52: 877-82.

Savary KC, Sellon RK, Law JM. Chylous abdominal effusion in a cat with feline infectious peritonitis. *J AM Anim Hosp Assoc* 2001; 37: 35-40.

Scherk M. Feline infectious peritonitis: what's new? In: Atlantic Coast Veterinary Conference 2007: 62-5.

Scott FW, Olsen CW, Corapi WV. Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection. *Feline Pract.* 1995; 23: 77-80.

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

Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA, Alazawy A. Diagnostic methods for feline coronavirus: a review. *Vet Med Int* 2010: 1-7.

Sherding RG. The cat diseases and clinical management. In: *Feline Infectious Peritonitis and other Coronaviruses*, 2nd edn. Weiss RC, ed. New York: Churchill Livingstone 1994: 449-77.

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.

Soria J, Giovannangeli ML, Jolchine IE, Chassoux G. Pentoxifylline, fibrinogen

and leukocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990; 1: 485-7.

Stahelin R. Ueber den durch Essigsäure fällbaren Eiweisskörper der Exsudate und des Urins. *Munch Med Wochenschr* 1902; 34: 1413-15.

Stoddart CA, Scott FW. Isolation and identification of feline peritoneal macrophages for in vitro studies of coronavirus-macrophage interactions. *J Leukoc Biol* 1988; 44: 319-28.

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

Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch JP, 3rd, Larrick J, Kunkel SL. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155: 1230-6.

Stursberg U, Zenker I, Hecht S, Hartmann K, Schulz BS. Use of propentofylline in feline bronchial disease: prospective, randomized, positive-controlled study. *J AM Anim Hosp Assoc* 2010; 46: 318-26.

Sullivan GW, Carper HT, Novick WJ, Jr., Mandell GL. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect Immun* 1988; 56: 1722-9.

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

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

Takeda A, Ikegame K, Kimura Y, Ogawa H, Kanazawa S, Nakamura H. Pleural effusion during interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1431-5.

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.

Taylor SS, Tappin SW, Dodkin SJ, Papasouliotis K, Casamian-Sorrosal D, Tasker S. Serum protein electrophoresis in 155 cats. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 643-53.

Thibault S, Drolet R, Germain MC, D'Allaire S, Larochelle R, Magar R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 1998; 35: 108-16.

Tizard JR. In: *Veterinary Immunology: An Introduction*, 7th edn. Tizard JR, ed. St. Louis: Saunders Elsevier 2004: 332-42.

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

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

Umber F. Ueber autolytische Vorgänge in Exsudaten. *Munch Med Wochenschr*

1902; 28: 1169-71.

Valdes L, Pose A, Suarez J, Gonzalez-Juanatey JR, Sarandeses A, San Jose E, Alvarez Dobana JM, Salgueiro M, Rodriguez Suarez JR. Cholesterol: a useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. *Chest* 1991; 99: 1097-102.

Valdes L, San-Jose E, Estevez JC, Gonzalez-Barcala FJ, Alvarez-Dobano JM, Golpe A, Valle JM, Penela P, Vizcaino L, Pose A. Cholesterol in pleural exudates depends mainly on increased capillary permeability. *Transl Res* 2010; 155: 178-84.

Van der Veen JN, Havinga R, Bloks VW, Groen AK, Kuipers F. Cholesterol feeding strongly reduces hepatic VLDL-triglyceride production in mice lacking the liver X receptor alpha. *J Lipid Res* 2007; 48: 337-47.

Van Hamme E, Desmarets L, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. *Virus Res* 2011;

Vennema H, de Groot RJ, Harbour DA, Dalderup M, Gruffydd-Jones T, Horzinek MC, Spaan WJ. Immunogenicity of recombinant feline infectious peritonitis virus spike protein in mice and kittens. *Adv Exp Med Biol* 1990; 276: 217-22.

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.

Vives M, Porcel JM, Vicente de Vera M, Ribelles E, Rubio M. A study of Light's criteria and possible modifications for distinguishing exudative from transudative pleural effusions. *Chest* 1996; 109: 1503-7.

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.

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

Walter JH, Rudolph R. The frequency and pathogenesis of feline infectious peritonitis (FIP). *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1989; 96: 194-6, 201.

Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987; 34: 50-97.

Ward JM. Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis. *Virology* 1970; 41: 191-4.

Watari T, Kaneshima T, Tsujimoto H, Ono K, Hasegawa A. Effect of thromboxane synthetase inhibitor on feline infectious peritonitis in cats. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 657-9.

Weber HU, Fleming JF, Miquel J. Thiazolidine-4-carboxylic acid, a physiologic sulfhydryl antioxidant with potential value in geriatric medicine. *Arch Gerontol Geriatr* 1982; 1: 299-310.

Weingartl H, Czub M, Czub S, Neufeld J, Marszal P, Gren J, Smith G, Jones S, Proulx R, Deschambault Y, Grudeski E, Andonov A, He R, Li Y, Copps J, Grolla A, Dick D, Berry J, Ganske S, Manning L, Cao J. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *J Virol* 2004; 78: 12672-6.

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

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

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

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

Weiss RC, Toivio-Kinnucan M. Inhibition of feline infectious peritonitis virus replication by recombinant human leukocyte (alpha) interferon and feline fibroblastic (beta) interferon. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1329-35.

Wolfe LG, Griesemer RA. Feline infectious peritonitis. *Pathol Vet* 1966; 3: 255-70.

Zabel P, Wolter DT, Schonharting MM, Schade UF. Oxpentifylline in endotoxaemia. *Lancet* 1989; 2: 1474-7.

Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiology* 1993; 187: 447-63.

Zhou QT, Zhu H, He B. Clinical analysis of lymphoma with chest involvement: report of 25 cases. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2009; 48: 846-9.

Zoia A, Slater LA, Heller J, Connolly DJ, Church DB. A new approach to pleural effusion in cats: markers for distinguishing transudates from exudates. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 847-55.

Zollner G, Trauner M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr* 2006; 156: 380-5.

## **XI. DANKSAGUNG**

Mein erster Dank geht an Frau **Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann** für all Ihre Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit. Ich bedanke mich für die Unterstützung in allen anfallenden Fragen und Problemen. Ihrem Engagement und Ihrer Flexibilität auch außerhalb jeglicher normaler Arbeitszeiten sowie Ihrer außergewöhnlichen Motivationsfähigkeiten verdanke ich das schnelle Gelingen meiner Dissertation.

Den **Kollegen und Freunden aus der Medizinischen Kleintierklinik**, welche mir alle sehr ans Herz gewachsen sind, möchte ich herzlich für die schöne Zeit und die hervorragende Zusammenarbeit danken. Wir hatten wahnsinnig viel Spaß und haben viel gelernt. Unser Team war einzig- sowie großartig und ich werde an diese Zeit immer sehr gerne zurückdenken.

Großer Dank geht auch an Frau **Dr. Susanne Ritz**, die mir die Daten aus Ihrer Studie zur Verfügung gestellt hat.

An dieser Stelle auch vielen Dank an Frau **Dr. Carola Sauter-Louis** für die große Hilfestellung bei der statistischen Auswertung und an Frau **Dr. Karin Weber** für die Geduld und Hilfestellung bei den Laborarbeiten.

Danke an alle **Mitarbeiter**, die trotz Klinikstress immer an mich gedacht und mir somit zu Patienten und Proben für meine Studien verholfen haben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen **Eltern** bedanken. Nur Ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung haben mir mein Studium und die Doktorarbeit ermöglicht. Sie haben niemals an mir gezweifelt und mich immer bestärkt, meinen eigenen Weg zu gehen. Ich bedanke mich bei meinem Bruder **Andi**, bei dem ich immer weiß, dass er mir zur Seite steht. Es ist schön, einen großen Bruder zu haben. Großer Dank geht auch an **Walter, Patricia** und meine **Oma**, die mich ebenso während der ganzen Zeit wahnsinnig unterstützt haben.

Nicht genug danken kann ich meinem Freund **Markus**, der immer für mich da ist. Auch seinem unglaubliches Vertrauen in mich und seiner Liebe verdanke ich das Gelingen dieser Arbeit. Sein Beistand hat mich immer wieder motiviert und in meiner Überzeugung bestärkt, den richtigen Weg zu gehen. Er hat mir oft die Leviten gelesen, damit ich trotzdem nicht den Blick für das Wesentliche im Leben verliere.

Bei meiner Freundin und Kollegin **Sabine** möchte ich mich ganz besonders bedanken. Schon während des Studiums haben wir viele Wege gemeinsam beschritten und vor zwei Jahren auch die Doktorarbeit zusammen begonnen. Sie war immer mein Ansprechpartner und manchmal die Einzige, die meine Sorgen und Probleme so wirklich verstanden hat.

Vielen lieben Dank auch an meine Freunde **Claudia, Miri, Yvonne** und **Katha**, die mir seit vielen Jahren gute Freunde sind und mich in so manchen stressigen Zeiten abgelenkt, und mein Selbstbewusstsein wieder aufgebaut haben.