

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
aus der Medizinischen Kleintierklinik

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

# **Untersuchungen zur Diagnose und zum Verlauf feline Retrovirusinfektionen**

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

von  
Christina Sand  
aus Aalen

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>10</b>
<b>1.</b>	<b>Diagnose der feline Immunschwächevirusinfektion .....</b>	<b>10</b>
1.1.	Direkter Erregernachweis.....	11
1.1.1.	Virusisolierung .....	11
1.1.2.	Antigennachweis .....	12
1.1.3.	Nachweis des Virus-Genoms .....	13
1.1.3.1.	Herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion .....	14
1.1.3.2.	„Nested“ Polymerase-Kettenreaktion .....	14
1.1.3.3.	Kompetitive Polymerase-Kettenreaktion .....	14
1.1.3.4.	Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion .....	15
1.1.3.4.1.	Bedeutung von Provirus- und Virus-Load in der Humanmedizin .....	17
1.1.3.4.2.	Bedeutung von Provirus- und Virus-Load in der Tiermedizin .....	17
1.2.	Indirekter Erregernachweis .....	18
1.2.1.	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	19
1.2.2.	Immunochromatografietest .....	22
1.2.3.	Western Blot.....	23
1.2.4.	Radioimmunopräzipitationstest.....	24
1.2.5.	Immunfluoreszenztest .....	25
1.2.6.	Hämagglutinationstest.....	25
<b>2.</b>	<b>Diagnose der feline Leukämievirusinfektion.....</b>	<b>27</b>
2.1.	Direkter Erregernachweis.....	27
2.1.1.	Virusisolierung .....	28
2.1.2.	Antigennachweis .....	29
2.1.2.1.	Nachweis von Freiem Antigen .....	29
2.1.2.1.1.	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	29
2.1.2.2.	Nachweis von intrazellulärem Antigen .....	31
2.1.2.2.1.	Immunfluoreszenztest .....	32
2.1.2.2.2.	Immunhistochemie .....	33
2.1.3.	Nachweis des viralen Genoms .....	34
2.1.3.1.	Herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion .....	34
2.1.3.2.	„Nested“ Polymerase-Kettenreaktion .....	35

2.1.3.3.	Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion .....	36
2.2.	Indirekter Erregernachweis .....	38
2.2.1.	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	39
2.2.2.	Virusneutralisationstest .....	39
<b>III.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>Studie 1 .....</b>	<b>41</b>
<b>2.</b>	<b>Studie 2.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>70</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>72</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>98</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCD Guidelines	advisory board on cat diseases guidelines
AC	asymptomatic carrier (asymptomatischer Träger)
AAFP	American Association of Feline Practitioners
Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency syndrom (erworbenes Immunschwäche Syndrom)
AP	acute phase (Akute Phase)
ARC	AIDS related complex (AIDS assoziiertes Krankheitsgeschehen)
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	capsid protein (Kapselprotein)
ca.	circa
CCD-Kamera	Charge-coupled-device-Kamera
CD4 <sup>+</sup> -Zelle	CD4-Rezeptor-tragende Zelle
CrFK-Zellen	Crandell-Feline-Kidney-Zellen
c <sub>T</sub> -Wert	threshold cycle (Schwellenwert)
D	Dalton
d. h.	das heißt
Dipl. ECVIM-CA	Diplomate des European College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetramintetraazetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>env</i>	envelope (Hülle)
et al.	et alii (und andere)
evtl.	eventuell
Fc-Fragment	fragment crystalline (kristalines Fragment der Immunglobuline)
FeLV	feline leukemia virus (Felines Leukämievirus)
FIV	feline immunodeficiency virus

(Felines Immunschwächevirus)

<i>g</i>	Gramm
<i>gag</i>	group specific antigen (Gruppen-spezifisches Antigen)
<i>gp</i>	Glykoprotein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	human immunodeficiency virus (Humanes Immunschwächevirus)
HRPO	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IFT	Immunfluoreszenztest
IU	international unit (Internationale Einheit)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Log-Stufen	logarithmische Einteilung nach Zehnerpotenzen
LTR	Long Terminal Repeat
mg	Miligramm
MG	Molekulargewicht
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MULV	murines Leukämievirus
MSV	murines Leukämievirus
nm	Nanometer
p	Schwellenwert
<i>p24</i>	virales Antigen des Kapsidprotein
PAC-RT	poly A-linked colorimetric Reverse Transkriptase Assay
PBL	peripheral blood lymphocytes (periphere Blutlymphozyten)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>pol</i>	polymerase (Polymerase)

RIPA	Radioimmunpräzipitationstest
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transcriptase (Reverse Transkriptase)
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfat polyacrylamid gel electrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SU protein	surface protein (Oberflächenprotein)
Tab.	Tabelle
TM	transmembrane protein (Transmembranprotein)
U	units (Einheiten)
U/min	Umdrehung pro Minute
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

## I. EINLEITUNG

Das feline Immunschwächevirus (FIV) und das feline Leukämievirus (FeLV) sind Erreger, deren Infektionen bei Katzen vielfältige unspezifische Symptome hervorrufen. Sie gehen mit unterschiedlichen Verlaufsformen einher, die teilweise schwerwiegende Folgen für die infizierte Katze haben. Da die klinischen Symptome bei beiden Infektionskrankheiten meist durch eine Schwächung des Immunsystems und die dadurch resultierenden Sekundärinfektionen hervorgerufen werden, ist es nicht möglich, eine Diagnose klinisch zu stellen. Aus diesem Grund sollte jede Katze auf eine evtl. vorliegende FIV- und FeLV-Infektion getestet werden. Als bevorzugte Screeningtests werden Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) und Immunochromatografie-Testsysteme verwendet, von denen sich eine Vielzahl auf dem Markt befinden.

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) werden nicht nur zur Diagnose verwendet sondern auch, um den Verlauf der Infektion zu beurteilen. Der Verlauf des Virus-Loads bei experimentell FIV-infizierten Katzen entspricht dem von Menschen, die mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert sind. Zusätzlich stellt der Virus Load einen Marker für den prognostischen Ausgang der HIV-Infektion dar.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Diagnose der FIV- und FeLV-Infektion. In diesem Rahmen wurden zwei Studien durchgeführt. In der ersten Studie galt es, einen neuen Schnelltest mit dem in Europa im Moment am häufigsten verwendeten Test im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität sowie positive und negative prädikative Werte zu vergleichen. Der Zusammenhang zwischen Provirus- und Virus-Load und dem Gesundheitszustand bei natürlich FIV-infizierten Katzen wurde in der zweiten Studie untersucht. Dazu wurden bei 49 natürlich infizierten Katzen das Wohlbefinden und die Lebensqualität mit dem modifizierten Karnofsky-Index bestimmt und dieses durch quantitative TaqMan real-time PCR ermittelten Provirus- und Virus-Load verglichen

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Diagnose der felines Immunschwächevirusinfektion**

Das feline Immunschwächevirus (FIV) wurde 1986 erstmals von PEDERSEN und Mitarbeitern in Petaluma, Kalifornien isoliert (PEDERSEN et al., 1987). In einer Kolonie von 43 Katzen verstarben in einem Zeitraum von vier Jahren (1982 bis 1986) elf dieser Tiere. Aus den kranken Katzen wurde ein Virus isoliert, das zunächst aufgrund seiner Fähigkeit, Lymphozyten zu infizieren, als T-lymphotropes Lentivirus bezeichnet wurde. Später wurde es aufgrund seiner Eigenschaft, das Immunsystem zu schwächen und seiner Übereinstimmungen mit dem humanen Immunschwächevirus (HIV) in „felines Immunschwächevirus“ umbenannt. Bald nach seiner Entdeckung wurde das Virus auch in anderen amerikanischen Bundesstaaten sowie in Kanada und in Europa gefunden (GRUFFYDD-JONES et al., 1988; HARBOUR et al., 1988; LUTZ et al., 1988; YAMAMOTO et al., 1989). Inzwischen ist bekannt, dass FIV in Hauskatzen weltweit endemisch ist. Antikörperprävalenzen schwanken dabei stark, abhängig von Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand der Katzen und geografischer Region, mit Prävalenzen von 1 % bis 40 % (PEDERSEN et al., 1987; HARTMANN, 1998).

Die sichere Diagnose einer FIV-Infektion spielt eine wichtige Rolle, da die Identifizierung und Trennung von FIV-positiven Katzen als die effektivste Methode gilt, um Neuinfektionen zu verhindern (LEVY et al., 2008b). Eine Vielzahl von direkten und indirekten Nachweisverfahren stehen zur Diagnose zur Verfügung. Empfohlene Screening-Tests, die in der Praxis direkt angewandt werden können, sind Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) oder ELISA-ähnliche Immunochromatografietests (LEVY et al., 2001). Als weitere indirekte Nachweismethoden stehen Western Blot und der Immunfluoreszenztest (IFT) zur Verfügung. Der Western Blot gilt als Goldstandard zum Nachweis von Antikörpern gegen FIV und wird als Referenzmethode eingesetzt (LUTZ et al., 1988; EGBERINK et al., 1992).

Die Virusisolation und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gehören zu den direkten Nachweisverfahren. Die Virusisolation ermöglicht den Nachweis von vermehrungsfähigem Virus in der Zellkultur, ist aber sehr zeit- und

arbeitsaufwändig und wird deshalb nicht mehr in der Routinediagnostik eingesetzt (LEVY et al., 2008b). Die PCR stellt eine sehr sensitive und spezifische Methode dar, kann aber ebenfalls nicht in der Praxis durchgeführt werden (CRAWFORD & LEVY, 2007b). Durch die Einführung von real-time PCR wurde es möglich, FIV-Provirus und Virus zu quantifizieren (PISTELLO et al., 1994; DIEHL et al., 1995; VAHLENKAMP et al., 1995).

### **1.1. Direkter Erregernachweis**

Seit in einigen Ländern FIV-Impfstoffe eingeführt wurden, gewinnen direkte Erregernachweisverfahren, wie PCR und Virusisolierung, große Bedeutung, da ein positives Testergebnis nur durch eine Infektion und nicht durch eine Impfung hervorgerufen werden kann. Diese Verfahren ermöglichen den Nachweis von infektiösem Virusgenom bzw. Virus und sind daher sehr spezifisch (CRAWFORD & LEVY, 2007b).

#### **1.1.1. Virusisolierung**

Nach einer Infektion persistiert FIV lebenslang im Körper einer infizierten Katze und kann mittels Virusisolierung nachgewiesen werden (ISHIDA et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989). Unter Laborbedingungen gilt dieses Verfahren noch immer als Goldstandard des direkten Erregernachweises, obwohl es zeit- und kostenintensiv und kommerziell nicht erhältlich ist (LEVY et al., 2008b). In der asymptomatischen Phase der FIV-Infektion können bei geringer Virusmenge falsch negative Ergebnisse auftreten. Jedoch kann oft in der frühen Phase der Infektion bereits Virus nachgewiesen werden, noch bevor Antikörper vorhanden sind (HOSIE et al., 1989; PEDERSEN et al., 1989; DANDEKAR et al., 1992).

Um Virus in der Zellkultur nachzuweisen, werden periphere Blutlymphozyten (PBL) mit Lymphozyten von gesunden Katzen in einem Medium kultiviert. Nach sechs bis vierzehn Tagen tritt, bei Anwesenheit von Virus, in der Kultur ein zytopathischer Effekt auf, und anschließend der Zelltod ein (HOSIE et al., 1989). Weitere Hinweise auf eine FIV-Infektion sind das Auftreten von ballonierender Degeneration, Riesenzell- und Synzytiumbildung (PEDERSEN et al., 1987). Die Viruspräsenz kann durch Messung der Reversen Transkriptase-Aktivität (PEDERSEN et al., 1987), durch Nachweis von *p24*-Antigen im ELISA (TILTON et al., 1990), durch Nachweis von intrazellulärem *p24* im IFT oder mittels optischer Darstellung von FIV unter dem Elektronenmikroskop bestätigt werden

(LUTZ et al., 1980; HOSIE & JARRETT, 1990; HARDY & ZUCKERMAN, 1991; HOSIE et al., 2009).

Die Messung der Reversen Transkriptase- (RT-) Aktivität galt früher als Standardmethode, um die Vermehrung von Retroviren in der Zellkultur nachzuweisen (PEDERSEN et al., 1987). Das Prinzip basiert auf dem Einbau von radioaktiv markierten Nukleinsäuren in die von der Reversen Transkriptase synthetisierten Nukleotide, unter Verwendung von Mg-Ionen und Oligonukleotiden. Die Messung der dadurch entstandenen Radioaktivität erfolgt mithilfe eines Szintillationszählers; sie verhält sich proportional zur RT-Aktivität und damit zur Virusmenge. In den letzten Jahren wurden alternative Methoden zur RT-Aktivitätsmessung ohne Verwendung von radioaktiven Isotopen entwickelt (SUZUKI et al., 1993; SAITO et al., 1997). SUZUKI und Mitarbeiter (1993) erstellten für die HIV-Diagnostik einen poly A-linked colorimetric Reverse Transkriptase Assay (PAC-RT). Dieses Verfahren ist sensitiver als die Messung der RT-Aktivität und benötigt keine radioaktiven Isotope (SUZUKI et al., 1993). Für die FIV-Diagnostik wurde diese Methode von SAITO und Mitarbeitern (1997) modifiziert (SAITO et al., 1997).

Heute verwendet man für den Nachweis von FIV in der Zellkultur meist einen ELISA, in dem *p24*-Antigen mithilfe von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen wird. Das *core*-Protein *p24* wird bei der Virusvermehrung produziert und reichert sich sowohl in den Zellen als auch im Kulturmedium an. Bereits vier Tage nach Infektion einer Zellkultur mit FIV kann *p24* nachgewiesen werden (SIEBELINK et al., 1990). Der Nachweis von FIV mittels Antigen-ELISA ist sensitiver als der Nachweis der RT-Aktivität (TILTON et al., 1990).

Zusammenfassend zählt die Virusisolation zu den Referenztests in der FIV-Diagnostik und ermöglicht als einziges Verfahren den Nachweis von infektiösem Virus (CRAWFORD & LEVY, 2007b; HOSIE et al., 2009). Die Nachteile des Verfahrens liegen im hohen Zeit- und Kostenaufwand, so dass die Virusisolation heute nur noch als Goldstandard des direkten Erregernachweises unter Laborbedingungen eingesetzt wird (LEVY et al., 2008b).

### 1.1.2. Antigennachweis

Der FIV-Antigennachweis spielt eine untergeordnete Rolle in der Routinediagnostik der FIV-Infektion, da die Antigenmenge im Blut infizierter

Katzen sehr gering ist. Er wird hauptsächlich zum Nachweis von *p24*-Antigen in der Zellkultur und in Geweben eingesetzt (TILTON et al., 1990; LOMBARDI et al., 1994). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung von *p24*-Antigen aus Testseren an monoklonale Antikörper, die vorher auf einer Oberfläche fixiert wurden. Die dabei entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe können durch eine Antikörper-vermittelte Farbreaktion sichtbar gemacht werden (TILTON et al., 1990; LOMBARDI et al., 1994).

### 1.1.3. Nachweis des Virus-Genoms

Die PCR wurde von Kary Mullis entwickelt und erstmals im Jahre 1985 von SAIKI und Mitarbeitern beschrieben (SAIKI et al., 1985; MULLIS et al., 1986). Sie diente anfangs zur Amplifizierung von menschlichen  $\beta$ -Globin-DNA-Sequenzen zur pränatalen Diagnose der Sichelzellenanämie. Die PCR stellt heute eine wichtige Methode in der Infektionsdiagnostik dar und gilt auch in der FIV-Diagnostik als sehr sensitive und spezifische Methode, die den qualitativen und quantitativen Nachweis von FIV-infizierten Zellen im Blut ermöglicht (CRAWFORD et al., 2005; CRAWFORD & LEVY, 2007b; HOSIE et al., 2009). Bei manchen PCR-Assays liegt die Nachweisgrenze bei ein bis zehn viraler DNA-Fragmente. Damit ist die Methode sensitiver als andere diagnostische Tests (LEUTENEGGER et al., 1999). Die hohe Sensitivität kann allerdings auch durch Kontamination mit nur geringen DNA-Mengen zu falsch positiven Ergebnissen führen (HARTLEY & RASHTCHIAN, 1993; BASTIEN et al., 2003; BORST et al., 2004). Schlechte Probenqualität, Unterschiede in Primer- und Virussequenz und eine zu geringe Virusmenge können zu falsch negativen PCR-Ergebnissen führen (CRAWFORD & LEVY, 2007b).

Durch die Einführung von FIV-Vollvirusvakzinen in einigen Ländern hat die PCR in der FIV-Diagnostik an Bedeutung gewonnen. Bei geimpften Katzen kommt es zu einer raschen und persistierenden Antikörper-Produktion. Kommerziell erhältliche ELISA und Western Blot können diese Antikörper nicht von Antikörpern differenzieren, die nach einer Infektion gebildet wurden (CRAWFORD et al., 2005). Die PCR dagegen ermöglicht den Nachweis von DNA-Sequenzen aus dem Virusgenom, die nur bei FIV-infizierten und nicht bei geimpften Katzen vorhanden sind (LUTZ et al., 1999; LEVY et al., 2008b).

### 1.1.3.1. Herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der PCR ist die wiederholte Synthese eines DNA-Bereichs zur exponentiellen Vervielfachung einer spezifischen Sequenz. Diese sogenannte Amplifizierung erfolgt mithilfe einer hitzestabilen Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, der Taq-Polymerase. Die zur Amplifizierung ausgewählte DNA-Sequenz wird durch ein Primerpaar flankiert und davon ausgehend abgeschrieben (LOTTSPREICH et al., 2006).

### 1.1.3.2. „Nestet“ Polymerase-Kettenreaktion

Das PCR-Verfahren wurde in den letzten Jahren kontinuierlich verbessert und modifiziert. Die Methode der „single“ PCR (HOHDATSU et al., 1992) wurde durch ein zweites Primerpaar erweitert, indem das innere Primerpaar nur an das erste Amplifikationsprodukt bindet, wenn das äußere Primerpaar die korrekte Sequenz amplifiziert hat. Dadurch wird die Ausgangs-DNA in zwei unabhängigen PCR-Abläufen sukzessive amplifiziert. Dieses Verfahren wird als „nested“ (verschachtelte) PCR bezeichnet (LOTTSPREICH et al., 2006). Durch den Einsatz von zwei Primerpaaren ist die Spezifität des Verfahrens verbessert (KEMP et al., 1989; ALBERT & FENYO, 1990; RIMSTAD et al., 1990; RIMSTAD & UELAND, 1992).

### 1.1.3.3. Kompetitive Polymerase-Kettenreaktion

Der erste Schritt zur Quantifizierung von proviraler FIV-DNA wurde mit Einführung der kompetitiven PCR gelegt (PISTELLO et al., 1994; DIEHL et al., 1995; VAHLENKAMP et al., 1995). Bei dieser Methode wird der zu quantifizierende Abschnitt des FIV-Genoms mit einem sogenannten Kompetitor, einem artifiziellen klonierten Standard in bekannter Ausgangskonzentration, in einem PCR-Röhrchen koamplifiziert. Damit wird sichergestellt, dass beide DNA-Abschnitte unter den gleichen thermodynamischen Verhältnissen und Amplifizierungsmöglichkeiten vervielfältigt werden (MENZO et al., 1992; SIEBERT & LARRICK, 1992). Da der zusätzlich verwendete Standard mit demselben Primer wie die Zielsequenz koamplifiziert wird und somit das eigentliche Target „mimt“, wird er auch als „mimic“-Fragment bezeichnet. Das „mimic“-Fragment wird *in vitro* synthetisiert und besitzt idealerweise die identische Länge wie die Zielsequenz. Im Anschluss an die Amplifikation ist die Auftrennung und Analysierung mittels differenzieller Hybridisierung oder durch

unterschiedliche Restriktionsschnittstellen möglich (LOTTTSPEICH et al., 2006).

Aufgrund der unterschiedlichen DNA-Ausgangsmengen kommt es durch die Amplifizierung zu unterschiedlichen Verhältnissen zwischen „mimic“-Fragment und zu untersuchender Probe. Konkurrenzen beider Zielsequenzen treten vor allem dann auf, wenn sich die eingesetzten Probenmengen um mehr als drei bis vier Größenordnungen unterscheiden. Die zu untersuchende Probe wird in etwa vier gleiche Aliquots aufgeteilt und in jedes dieser Aliquots wird eine zunehmende, bekannte Menge an „mimic“-Fragment zugegeben. Im Anschluss an die Amplifikation werden gleiche Teile des Amplikons mit der jeweils spezifischen Sonde hybridisiert und deren Signale gegen die bekannte Ausgangskonzentration des „mimic“-Fragments aufgetragen. Am dadurch entstandenen Schnittpunkt beider Kurven (point of equivalence) ist die Ausgangskonzentration der untersuchten Probe ablesbar (LOTTTSPEICH et al., 2006).

Die kompetitive PCR besteht aus vielen einzelnen Reaktionsschritten, die zum einen aufwändig sind und zum anderen eine hohe Gefahr der Kontamination und Ungenauigkeit mit sich bringen. Zudem ist nur die Untersuchung einer geringen Probenanzahl möglich (CLEMENTI et al., 1993). Die kompetitive PCR wurde heute von der quantitativen „real-time“ PCR abgelöst.

#### **1.1.3.4. Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion**

Die quantitative „real-time“ PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, aber zusätzlich, wie die kompetitive PCR, die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Das Verfahren wird als „real-time“ Verfahren bezeichnet, da die Anzahl der Amplifizierungen noch während des Reaktionsablaufes (in „Echtzeit“) bestimmt werden kann und keine weiteren Reaktionsschritte zur Quantifizierung nach Ablauf benötigt werden. Zudem entfällt die arbeitsaufwendige Gel-Auftrennung der PCR-Produkte (LOTTTSPEICH et al., 2006).

Zusätzlich zu den beiden Primern, einem vorwärts- und einem rückwärtsgerichtetem, befindet sich eine fluoreszenzmarkierte Sonde im PCR-Gefäß, die sogenannte „TaqMan-Sonde“, die sich an die Zielsequenz zwischen den beiden Primern anlagert. Bei der Sonde handelt es sich um kurzes DNA-Fragment, die an einem Ende mit einer Fluoreszenzmarkierung und am anderen

Ende mit einem Quencher (z. B. Rhodaminderivat) markiert ist. Die Lokalisation der beiden Markierungen ist so gewählt, dass bei der freien Sonde das emittierte Licht vom Fluoreszenzfarbstoff durch den Quencher absorbiert wird. Liegt die Sonde im ungebundenen Zustand vor, kann kein Signal gemessen werden. Sie binden während der Amplifizierungsschritte an die zu kopierende Sequenz zwischen den beiden Primern. Ein Quencher hat die Fähigkeit, die Fluoreszenzaktivität des Reporterfarbstoffes abzufangen, solange er mit ihm verbunden ist. Dies erfolgt in der freien Form durch die 5'-Nucleaseaktivität-katalysierte Abspaltung des Quenchers. Im Verlauf der Amplifizierung werden beide Primer mittels Taq-Polymerase so weit verlängert, bis sie auf die Sonde treffen. Das Verfahren nutzt an dieser Stelle die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase, die Sonden bei der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende zu trennen; dabei entfernen sich Quencher und Reporterfarbstoff voneinander. Bei diesem Schritt kann ein Reporterfluoreszenzsignal am Ende der Elongation in jedem Zyklus gemessen werden. Mit diesem Schritt ist sichergestellt, dass ein Fluoreszenzsignal nur entsteht, wenn es zur Vervielfältigung der DNA-Sequenz gekommen ist. Das heißt, bei diesem Verfahren wird nicht mehr das Amplifikationsprodukt nach der Amplifikationsreaktion gemessen (Endproduktbestimmung), sondern die kontinuierliche Bildung der Amplifikationsprodukte während aller PCR-Zyklen (Echtzeitbestimmung). Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt von der ursprünglichen DNA-Menge abhängig und kann mithilfe eines Fluorometer gemessen werden. Die dabei ermittelte Messgröße, der  $c_T$ -Wert, gibt an, von welchem PCR-Zyklus an sich ein messbares Signal oberhalb des Schwellenwertes (threshold) befand. Zur quantitativen Bestimmung der Kopienzahl in der untersuchten Probe werden Koamplifikationen der Zielsequenz mit internen Standards bekannter Kopienzahl oder entsprechende Eichkurven mit externen Standards verwendet (LOTTSPREICH et al., 2006).

Durch die Einführung der TaqMan real-time PCR steht nun eine schnelle, einfache und zuverlässige Methode zur Verfügung, um Provirus- und Virus-Load zu quantifizieren (LEUTENEGGER et al., 1999). Das Verfahren ist kostengünstig, ideal um große Probenmengen zu verarbeiten und benötigt keine Postamplifikationsschritte (KLEIN et al., 1999). Aufgrund der hohen Sensitivität kann es durch Kontamination zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Diese

können allerdings nur bei der Probenverarbeitung entstehen, da keine Schritte im Anschluss an die Amplifizierung mehr nötig sind (KLEIN et al., 1999). Dadurch ist das Risiko geringer als bei herkömmlicher PCR. Die Quantifizierung funktioniert sehr zuverlässig, wenn nur ein Isolat verwendet wird, wie es z. B. bei Impfstoffstudien der Fall ist. Bei der Untersuchung von FIV-Isolaten von natürlich infizierten Katzen, die aus unterschiedlichen Regionen stammen und mit verschiedenen FIV-Subtypen infiziert sind, kann häufig nur ein Teil der Proben quantifiziert werden. Negative Ergebnisse können durch die Diskrepanz zwischen Sonde oder Primer und der proviraler DNA oder viraler RNA entstehen. Eine weitere Ursache für negative Ergebnisse sind Viruskonzentrationen unter der Nachweisgrenze (KLEIN et al., 1999; LEUTENEGGER et al., 1999).

Zusammenfassend steht mit der TaqMan real-time PCR eine Methode zur Verfügung, die es ermöglicht, Provirus- und Virus-Loads zu quantifizieren und dabei die hohe Sensitivität und Spezifität der vorherigen PCR-Verfahren beizubehalten (KLEIN et al., 1999; LEUTENEGGER et al., 1999).

#### **1.1.3.4.1. Bedeutung von Provirus- und Virus-Load in der Humanmedizin**

Seit der Entdeckung der HIV-Infektion bestehen Bemühungen, prognostische Parameter zu entwickeln, um Voraussagen über das Voranschreiten der HIV-Infektion und die Überlebenszeit abgeben zu können. Andere Anzeichen für das Voranschreiten der Infektion sind klinische Symptome und eine Erniedrigung der CD4<sup>+</sup>-Zellen (FAHEY et al., 1990; STEIN et al., 1992; ENGER et al., 1996). In den letzten Jahren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der Virus-Load, gemessen in Plasma oder Serum, ein aussagekräftiger prognostischer Marker für den Infektionsverlauf bei HIV-infizierten Patienten ist (KATZENSTEIN et al., 1996; MELLORS et al., 1996; MELLORS et al., 1997). Die gleichzeitige Bestimmung von Virus-Load und CD4<sup>+</sup>-Zellzahl ermöglicht es eine noch spezifischere Prognose über den Ausbruch oder den Tod durch AIDS zu geben (VLAHOV et al., 1998).

#### **1.1.3.4.2. Bedeutung von Provirus- und Virus-Load in der Tiermedizin**

Die FIV-Infektion bei Katzen und die HIV-Infektion bei Menschen führen zu ähnlichen Krankheitsbildern. In beiden Fällen kommt es zu einem kontinuierlichen Verlust der CD4<sup>+</sup>-Zellen zu einer Immunsuppression und dadurch zum Auftreten von opportunistischen Infektionen (ISHIDA et al., 1989).

In den letzten Jahren wurde die Pathogenese der FIV-Infektion mithilfe der Bestimmung der Plasma-Virus-RNA-Konzentration genauer untersucht (DIEHL et al., 1995, 1996; GOTO et al., 2000; GOTO et al., 2002). Die Studien wurden hauptsächlich an experimentell infizierten Katzen durchgeführt. DIEHL und Mitarbeiter (1995) fanden eine Korrelation zwischen einem hohen Virus-Load im Plasma und der akuten Phase der FIV-Infektion (DIEHL et al., 1995). Eine frühe Virämie in Form eines Peaks tritt ein bis drei Wochen nach Infektion auf, nachdem der Virus-Load wieder absinkt. Zudem wurde ein signifikant höherer Plasma Virus-Load bei experimentell infizierten Katzen beobachtet, deren FIV-Infektion insgesamt rascher voranschritt, als bei Katzen, die eine längere Überlebenszeit aufwiesen (DIEHL et al., 1996). GOTO und Mitarbeiter (2000) untersuchten die durchschnittliche Plasma-Virus-Konzentration von natürlich infizierten Katzen mittels RT-PCR und zeigten, dass der durchschnittliche Plasma-Virus-Load im AIDS-Stadium signifikant höher ist als bei Katzen im AC- und ARC-Stadium. Zudem war die Höhe der ermittelten RNA-Konzentrationen bei Katzen im AIDS-Stadium vergleichbar zu den RNA-Konzentrationen von Menschen im AIDS-Stadium (PIATAK et al., 1993a; MELLORS et al., 1996; SAAG et al., 1996). Beim Übergang von der ARC- in die AIDS-Phase wurde ein Absinken der viralen RNA-Konzentrationen beobachtet (GOTO et al., 2000). In einer Studie wurde gezeigt, dass die RNA-Konzentrationen bei natürlich infizierten Katzen einen Marker für die Schwächung des Immunsystems darstellen (GOTO et al., 2002).

## **1.2. Indirekter Erregernachweis**

Die indirekten Nachweismethoden der FIV-Infektion weisen Antikörper gegen virusspezifische Proteine nach. Bei der FIV-Infektion der Katze handelt es sich um eine lebenslange Infektion. Antikörper sind bei den meisten Katzen in allen Phasen der FIV-Infektion nachweisbar (YAMAMOTO et al., 1988; PEDERSEN et al., 1989). Meist sind bereits zwei bis vier Wochen nach Infektion messbare Antikörperspiegel erreicht (Yamamoto 1988, O'Connor 1989).

Die ersten Antikörper, die gebildet werden, richten sich gegen das Oberflächenantigen *gp20* und das Innenkörperprotein *p24* (YAMAMOTO et al., 1988; O'CONNOR et al., 1989; HOSIE & JARRETT, 1990). Nach vier bis acht Wochen ist auch der Nachweis von Antikörpern möglich, die gegen das (Transmembranprotein-) TM- Protein *gp40* gebildet werden. Diese Antikörper

erreichen bis in die Endphase der Infektion messbare Titer (HOSIE & JARRETT, 1990).

Als Goldstandard hat sich Western Blotting etabliert (EGBERINK et al., 1991; HARDY & ZUCKERMAN, 1991). ELISA sowie die auf ähnlichem Prinzip beruhende Immunochromatografietests weisen Antikörper gegen Transmembranproteine nach, ersteres Verfahren zudem Antikörper gegen *p24* (HOSIE et al., 2009). Diese Verfahren sind als Schnelltest kommerziell erhältlich und werden zur Routinediagnostik in der tierärztlichen Praxis eingesetzt (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007).

In der Frühphase der Infektion oder im Endstadium durch Zusammenbruch des Immunsystems kann ein Antikörpernachweis bei FIV-positiven Katzen aufgrund von nicht messbar niedrigen Antikörperspiegeln negativ ausfallen. Bei Welpen, die jünger als sechs Monate sind, können maternale Antikörper, die bis zu sechs Monate nach der Geburt persistieren, ein positives Testergebnis verursachen (PEDERSEN et al., 1989).

### **1.2.1. Enzyme-linked immunosorbent assay**

Der ELISA gehört neben dem Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA) zur Gruppe der Immunoassay-Verfahren. Bei einem ELISA handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Die meisten ELISA beinhalten eine feste Phase, auf der Antigen oder Antikörper fixiert sind. An einem der beiden Komponenten ist ein Enzym gekoppelt, um den Ablauf der Reaktion sichtbar zu machen. In den meisten Fällen wird hierfür Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase verwendet. Nach Zugabe zum Reaktionsgemisch kann das gekoppelte Enzym das passende Substrat umsetzen. Durch den dabei entstehenden Farbumschlag kann das Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe kann es zur Antigen-Antikörperbindung kommen. Im Anschluss an einen Waschschrift, um ungebundene Reagenzien zu entfernen, werden Enzymgekoppelte Antikörper zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wird das dazugehörige Substrat zugegeben, um eine Antigen-Antikörperreaktion durch Farbumschlag festzustellen. Dadurch kann die bei einer FIV-positive Probe entstehende Farbveränderung visuell oder photometrisch bestimmt werden (CRAWFORD & LEVY, 2007b).

Die Firma IDEXX (Portland, Maine, USA) entwickelte 1988 als Erste kommerziell erhältliche Testsysteme zum Nachweis der FIV-Infektion. Zu diesem Zeitpunkt waren zwei Testsysteme für unterschiedliche Probenanzahlen erhältlich. Der Pet Check<sup>®</sup> Test diente der Untersuchung von Einzelproben und ermöglichte den Nachweis von Antikörpern gegen FIV mithilfe von aufgereinigten FIV-Antigenen nach dem ELISA-Prinzip. Zusätzlich konnte dieses Testsystem das Vorhandensein von FeLV-*p27*-Antigen nachweisen. Bei dem zweiten Testsystem handelte es sich um den CITE<sup>®</sup> Combo Test, der für die Untersuchung von größeren Probenmengen unter Laborbedingungen entwickelt wurde. Die Firma IDEXX besaß das Monopol für die Herstellung von FIV-ELISA in den USA, sodass lange Zeit nur der Pet Check<sup>®</sup> und der CITE<sup>®</sup> Combo Test erhältlich waren. Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis von *p27*-Antikörpern in der FIV-Diagnostik auch in Deutschland über viele Jahre ausschließlich mit diesen beiden Testsystemen. Es stellte sich allerdings in einer Reihe von Studien heraus, dass diese damals erhältlichen ELISA-Tests der Firma IDEXX im Vergleich zu anderen Testverfahren (z. B. Western Blot und IFT) eine geringe Sensitivität und Spezifität aufwiesen (HOSIE & JARRETT, 1990; PEDERSEN & BARLOUGH, 1991). Es gibt mehrere Gründe für die aufgetretenen falsch positiven Ergebnisse, die zu einer niedrigeren Spezifität der Testsysteme führten. Zum Beispiel werden in den ELISA-Tests FIV-Antigene verwendet, die in der Zellkultur hergestellt wurden. Die mittels Dichtegradient aufgereinigten Antigene wurden häufig mit fötalem Kälberserum, das zur Verbesserung des Zellwachstums zugesetzt wurde, oder mit Zellkulturbestandteilen, z. B. CrFK-Zellen, in denen das Virus angezüchtet wurde, kontaminiert (PEDERSEN & BARLOUGH, 1991). Häufig wird zur Impfstoffherstellung ebenfalls Kälberserum verwendet, sodass es im Anschluss an eine Impfung zur Antikörperbildung kommt. Diese Antikörper können ein unvollständig gereinigtes Antigen in den FIV-ELISA-Platten binden und zu falsch positiven Ergebnissen führen (CALZOLARI et al., 1995). Weitere Fehlerquellen für falsch positive Ergebnisse entstehen durch mangelhafte Handhabung der Testsysteme durch ungeschultes Personal. Bekannte Fehlerquellen sind unzureichendes Waschen, Nichteinhalten der Reaktionszeiten, ungenaues Pipettieren von Reagenzien und Seren sowie das Verwenden von kalten Reaktionssubstanzen (HARTMANN et al., 1994).

Falsch negative Ergebnisse treten auf, wenn keine Antikörper gegen *p24* gebildet

werden, sondern ausschließlich Antikörper gegen Hüllproteine. Die vorliegende FIV-Infektion kann in diesem Fall mit ELISA-Testsystemen, die lediglich auf den Nachweis von Antikörpern gegen *p24* beruhen, nicht erkannt werden und liefern ein falsch negatives Ergebnis (EGBERINK et al., 1992; FURUYA et al., 1992; VERSCHOOR et al., 1993). Der in dieser Studie verwendete ELISA, der SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Antibody Test, beinhaltet zum Nachweis der FIV-Infektion das Innenkörperprotein *p24* und das Hüllglykoprotein *gp40*. Der untersuchte Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit, ein Immunochromatografietest, setzt zum Nachweis von FIV-Antikörpern ausschließlich *gp40* ein.

Aufgrund des hohen Anteils an falschen Ergebnissen wurden die ELISA-Tests weiterentwickelt. 1992 brachte die Firma IDEXX einen verbesserten Pet Check<sup>®</sup> Test auf den Markt. Dieser Test beinhaltet ausschließlich rekombinante *gag*-Proteine, die von *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert wurden. Durch die Verwendung von rekombinanten Antigenen erhöhte sich die Spezifität deutlich (MERMER et al., 1992). Nachfolgestudien belegen, dass der weiterentwickelte ELISA-Test eine bessere Übereinstimmung mit den Resultaten von Western Blot und IFT aufweist (FURUYA et al., 1992). 2007 erreichte der Pet Check<sup>®</sup> Anti FIV Test im Vergleich zu anderen Testsystemen eine Sensitivität von 94,5 % und eine Spezifität von 100,0 % (HARTMANN et al., 2007).

In den darauffolgenden Jahren wurden die ELISA-Testsysteme kontinuierlich verbessert. REID und Mitarbeiter (1991) beschrieben eine ELISA-Variante, die zum FIV-Antikörpernachweis rekombinante *gag*-Proteine (*p24* und *p17*) einsetzte. Durch Verwendung des zusätzlichen Antigens wurden Spezifität und Sensitivität erhöht (REID et al., 1991).

Bei den früher verwendeten ELISA wurden nur *gag*-spezifische Antikörper (meist *p24* oder *p15*) nachgewiesen. Neben den *gag*-spezifischen Antikörpern haben auch Antikörper gegen Hüllproteine, v. a. die, die gegen das Transmembranprotein *gp40* gerichtet sind, eine große Bedeutung in der FIV-Diagnostik, da einige Katzen ausschließlich Antikörper gegen diese bilden (FURUYA et al., 1992; ADDIE et al., 2000). Das Transmembranprotein *gp40* besitzt ein terminales immundominantes Epitop. Bei FIV-positiven Katzen werden Antikörper gegen diesen Transmembrananteil gebildet, die über Jahre

bestehen bleiben (YAMAMOTO et al., 1988; O'CONNOR et al., 1989; HOSIE & JARRETT, 1990). Ein von RIMMELZWAAN und Mitarbeitern (1984) beschriebener ELISA setzte diese Erkenntnisse um und entwickelte ein Verfahren, das gleichzeitig Antikörper gegen *gag*- und *env*-spezifische Proteine nachweisen kann (RIMMELZWAAN et al., 1994). CALZOLARI und Mitarbeiter (1995) verglichen die Sensitivität und Spezifität von verschiedenen Tests, die unterschiedliche rekombinante Proteine verwenden (Transmembran TM, Surface SU, Capsid CA) (CALZOLARI et al., 1995). Die höchste Sensitivität (98 %) und Spezifität (96 %) erreichte der ELISA, der mit rekombinanten TM-Proteinen beschichtet war. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass bei experimentell infizierten Katzen Antikörper gegen TM-Proteine drei Wochen vor den Antikörpern gegen SU- und CA-Proteine gebildet werden (CALZOLARI et al., 1995).

Derzeit verfügbare ELISA-Testsysteme beruhen meist auf dem Nachweis von Antikörpern gegen *p24*- und oder das membranassoziierte *gp40*-Protein. Gegen diese beiden *gag*-spezifischen Proteine werden bei den meisten FIV-infizierten und bei mit Vollvirusvakzinen geimpften Katzen Antikörper in großer Menge produziert (LEVY et al., 2008b).

### 1.2.2. Immunochromatografietest

Der Immunochromatografie-Schnelltest beruht auf einem ELISA-ähnlichen Prinzip und hat sich in der Praxis als schnell und einfach durchzuführendes Verfahren zum Nachweis der FIV-Infektion etabliert (UCHIO et al., 1997). Die in den letzten Jahren entwickelten kommerziellen Immunochromatografie-Schnelltests für die Routinediagnostik beruhen auf einem immunochromatografischen „Sandwich“-System. Mithilfe eines synthetischen Peptids, äquivalent zum immundominanten Epitop des *gp40*-Transmembran-Proteins, werden die FIV-Antikörper in einem positiven Testserum gebunden. Die dadurch entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe wandern auf der Membran des Schnelltests weiter und werden durch membranfixierte Sekundärantikörper im Ergebnisfenster des Testsystems fixiert. Durch Enzymwirkung oder durch Akkumulation von Gold- und Latexpartikeln werden die gebundenen Immunkomplexe dort in Form einer Bande sichtbar gemacht. Freies, nicht gebundenes Peptid wandert weiter bis zur Kontrollzone und wird dort nach dem gleichen Prinzip sichtbar (Gebrauchsinformation FASTest FIV, MegaCor,

Österreich).

In einer Studie von HARTMANN und Mitarbeitern (2007) wurden sieben FIV- und acht FeLV-Schnelltestsysteme für den Praxisgebrauch verglichen. Unter den sieben FIV-Schnelltests befanden sich vier Immunochromatografie-Schnelltests, der Fitness<sup>®</sup> Test (Synbiotics, USA), der FASTest<sup>®</sup> (MegaCor, Deutschland), der Duo Speed<sup>®</sup> Test (Bio Veto Test, Frankreich) und der Mapic<sup>®</sup> FIV Test (Biotech, USA). Der Mapic<sup>®</sup> FIV Test wurde aufgrund seines hohen Anteils an ungültigen und schwierig interpretierbaren Testergebnissen aus der Studie ausgeschlossen. Die anderen Immunochromatografie-Tests lieferten gute Ergebnisse und zeigten vergleichbar hohe Werte für Sensitivität, Spezifität sowie positive und negative prädiktive Werte (HARTMANN et al., 2007).

Der Immunochromatografie-Schnelltest stellt heute neben dem ELISA das weitverbreitete Verfahren dar, welches zur Routinediagnostik der FIV-Infektion eingesetzt wird. Sie wurden von den europäischen advisory board on cat diseases (ABCD-) Guidelines als Screeningtest für die Routinediagnose empfohlen (HOSIE et al., 2009).

### **1.2.3. Western Blot**

Das Verfahren des Western Blots wurde von TOWBIN und Mitarbeitern (1979) erstmals beschrieben (TOWBIN et al., 1979) und wird seit 1986 als Routinetest für den Nachweis des Humanen Immundefizienzvirus (HIV) eingesetzt (SCHÜPBACH, 1986). Neben dem IFT gehörten Western Blot und Radioimmunoassay zu den sensitivsten Antikörper-Nachweisverfahren (HARDY & ZUCKERMAN, 1991) und gelten als Goldstandard zum Nachweis von FIV-Antikörpern (LUTZ et al., 1988; HOSIE & JARRETT, 1990; EGBERINK et al., 1992). Der Western Blot ist daher ein sehr sensitives und spezifisches Nachweisverfahren, das kosten- und arbeitsaufwändig ist, allerdings den parallelen Nachweis von Antikörpern gegen unterschiedliche FIV-spezifische Proteine ermöglicht (EGBERINK et al., 1991; HARDY & ZUCKERMAN, 1991). Das Prinzip des Western Blots beruht auf elektrophoretischer Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen, die anschließend im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden (TOWBIN et al., 1979). Zum Nachweis von FIV-Antikörpern im zu untersuchenden Serum werden aufgereinigte denaturierte FIV-Proteine verwendet. Mittels Elektrophorese werden

diese Proteine anhand ihres Molekulargewichts im Gel aufgetrennt. Die im folgenden Schritt auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine dienen als Test-Antigen für die im zu untersuchenden Serum vorhandenen FIV-Antikörper (Primärantikörper). Dadurch führt es zur Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen. Nach Zugabe des Serums wird mit anti-Spezies-Konjugat (z. B.: Ziegen-IgG-Anti-Katze-IgG) ein vorhandener FIV-Antikörper markiert. Dieser Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper dient zum Nachweis der Immunkomplexe nach Substratzugabe. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Peroxidase vermittelt eine Farbreaktion durch Umsetzung des Substrates (4-chloro-1-naphthol). Das entstehende Bandenmuster gibt Aufschluss über die Antikörper, die in der Katze gebildet wurden (EGBERINK et al., 1991).

#### **1.2.4. Radioimmunopräzipitationstest**

Beim Radioimmunopräzipitationstest (RIPA) handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen FIV, ohne dass durch Aufreinigung und Denaturierung konformationsbedingte fragile Epitope verloren werden. Sie bleiben bei diesem Verfahren erhalten. Dadurch können auch glykolisierte Hüllproteine (*gp120* und *gp40*) nachgewiesen werden (O'CONNOR et al., 1989; EGBERINK et al., 1991).

Der erste Schritt bei diesem Verfahren ist die Kultivierung von FIV-infizierten Thymozyten und Lymphozyten in einem methioninarmen Medium. Anschließend werden radioaktives L-[<sup>35</sup>S]-Methionin- und [<sup>3</sup>H]-Glucosamin-Hydrochlorid zum Kulturmedium gegeben. Dadurch erfolgt die radioaktive Markierung und Lyse der Zellen. Die lysierten Zellen werden mit den zu untersuchenden Seren für ca. zwölf Stunden inkubiert. In dieser Zeit kann die Immunkomplexbildung stattfinden. Durch Zugabe von *Staphylococcus-aureus*-Protein-A und Formaldehyd-Fixierung erfolgt die Präzipitation. Die präzipitierten Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluografie analysiert (O'CONNOR et al., 1989; EGBERINK et al., 1991). Dabei entstehen durch die Beta-Strahlung des L-[<sup>35</sup>S]-Methionins, das an die Immunkomplexe gebunden ist, Banden auf einem belichteten Röntgenfilm. Anhand der Lokalisation und der Anzahl der gebildeten Banden kann analysiert werden, gegen welche FIV-Proteine Antikörper bei der untersuchten Katze vorhanden sind (STEINMAN et al., 1990).

### 1.2.5. Immunfluoreszenztest

Der IFT zeichnet sich neben dem RIPA und dem Western Blot durch seine hohe Spezifität aus (LUTZ et al., 1988; HOSIE & JARRETT, 1990; EGBERINK et al., 1991; HARDY & ZUCKERMAN, 1991; HARTMANN et al., 2001).

Das Prinzip des IFT beruht auf dem Nachweis von Antikörpern gegen FIV mittels infizierter T-Lymphozyten oder CrFK-Zellen. Die Untersuchung der in Zellkultur infizierten Zellen erfolgt in Vertiefungen spezieller Objektträger. Nach Fixierung der Zellen gibt man Kontroll- und Testseren zu, wobei vorhandene FIV-Antikörper an die zellulären Antigene binden können. Im nächsten Schritt werden Fluoreszin-Isocyanat-konjugierte anti-Spezies-Antikörper zum Reaktionsgemisch gegeben. Diese lagern sich an die FIV-Antikörper an, die an die zellulären FIV-Antigene binden. Nach mehreren Waschschritten, in denen ungebundene Antikörper entfernt werden, kann die Auswertung des Objektträgers unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen (BARR et al., 1991; REID et al., 1992).

Antikörper-positive Seren können durch eine leuchtende zytoplasmatische Färbung identifiziert werden. Falsch positive Ergebnisse treten meist durch unspezifische Reaktionen auf. Nach Studien von BARR und Mitarbeitern (1991) und REID und Mitarbeitern (1992) treten falsch positive Resultate bei 10 % der untersuchten Proben auf. Ursache dafür können zerstörte Zellen oder das Anfärben von Zellkernen sein (BARR et al., 1991; REID et al., 1992). Im Vergleich zum ELISA erreichte dieses Verfahren eine Spezifität von 100 % und Sensitivität von 97,4 % (BARR et al., 1991; REID et al., 1992). Der IFT wird heute nicht mehr zur Routinediagnostik eingesetzt, da er sehr arbeitsintensiv ist und die Interpretation der Ergebnisse von geschultem Personal durchgeführt werden sollte (BARR, 1996; HARTMANN et al., 2001).

### 1.2.6. Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest stellt ein Verfahren zum Nachweis von FIV-Antikörpern dar, das ohne großen technischen Aufwand durchgeführt werden kann und auch als kommerzielles Testsystem erhältlich ist. Das Verfahren weist Antikörper gegen *gp40* nach (CALZOLARI et al., 1995). Der Hämagglutinationstest enthält zusätzlich Antikörper gegen feline Erythrozyten, die mit der immundominanten Komponente des FIV-TM-*gp40*-Analogon gekoppelt sind. Nach Zugabe des zu untersuchenden Vollblutes kommt es bei

Anwesenheit von Antikörpern gegen *gp40* in der Probe zur Agglutination der Erythrozyten. Wird anstelle von Vollblut Plasma verwendet, ist die Zugabe von Erythrozyten einer FIV-negativen Katze nötig, um eine Agglutination zu beobachten (WILSON et al., 1994). Falsch positive Ergebnisse können bei diesem Testverfahren durch unspezifische Agglutinationen entstehen, die z. B. nach langer Probenaufbewahrung vor der Testdurchführung auftreten (DEL FIERRO et al., 1995). In einer Studie von WILSON und Mitarbeitern (1994) wurde für den Hämagglutinationstest eine Spezifität von 98 % und eine Sensitivität von 92 % ermittelt (WILSON et al., 1994). Bei einem Vergleich des kommerziell erhältlichen Hämagglutinationstests VetRED<sup>®</sup> (AGEN Biomedicals Ltd., Queensland, Australien) mit dem ELISA Pet Check<sup>®</sup> (IDEXX GmbH, Portland, ME) wurden annähernd gleiche Werte für Sensitivität und Spezifität festgestellt (DEL FIERRO et al., 1995).

## 2. Diagnose der feline Leukämievirusinfektion

Das feline Leukämievirus wurde 1964 von JARRETT und Mitarbeitern (1964) in Glasgow, Schottland entdeckt. FeLV ist ein Retrovirus (HOFMANN-LEHMANN et al., 2006), das neben Hauskatzen auch andere Katzenartige, wie z. B. europäische und iberische Luchse infizieren kann (HOOVER & MULLINS, 1991; LEUTENEGGER et al., 1999).

Die wichtigsten FeLV-Subtypen, -A, -B und -C werden aufgrund ihres Wirtszelltropismus definiert. Subtyp-A kommt ubiquitär vor und ist an jeder Infektion beteiligt (JARRETT et al., 1973; SARMA & LOG, 1973). FeLV-B entsteht in der Katze aus einer Rekombination von exogenem FeLV-A mit endogenem FeLV-*env* Sequenzen (BUSCH et al., 1983) und ist per se nur schwach infektiös. In 30 bis 60 % der FeLV-positiven Katzen kann Subtyp-B nachgewiesen werden, allerdings nur in Verbindung mit FeLV-A (PHIPPS et al., 2000). Subtyp-C entstand durch eine Mutation im *env*-Gen. Dieser Subtyp ist mit aplastischen Anämien assoziiert und ist nur bei 1 % der infizierten Katzen nachweisbar (JARRETT et al., 1978). Daneben existieren weitere Subtypen, z. B. FeLV-T, die für verschiedene Krankheitsbilder verantwortlich sind. In der FeLV-Diagnostik wird FeLV-A nachgewiesen, da dieser Subtyp an jeder Infektion beteiligt ist (OVERBAUGH et al., 1988; ANDERSON et al., 2000; LUTZ et al., 2009).

Die FeLV-Infektion tritt weltweit auf. Als Folge der Einführung von weitreichenden Testprogrammen und der Entwicklung von effektiven Impfstoffen verringerte sich die Prävalenz der FeLV-Infektion in den letzten 25 Jahren deutlich (HOOVER et al., 1975; LUTZ et al., 1980; HOOVER & MULLINS, 1991; ROJKO & KOCIBA, 1991). In einigen europäischen Ländern sowie in Kanada und in den USA, liegt die Prävalenz bei einzeln gehaltenen Katzen durchschnittlich bei 1 %. Die Prävalenz ist abhängig von der Populationsdichte der Katzen. In Mehrkatzenhaushalten, in denen FeLV endemisch ist und keine Prävention vorgenommen wird, kann die Prävalenz über 20 % liegen (HOSIE et al., 1989; LUTZ et al., 1990; LEVY et al., 2006).

### 2.1. Direkter Erregernachweis

Beim direkten Erregernachweis werden FeLV-Partikel in Blut, Speichel, Urin oder Gewebeflüssigkeiten durch Virusisolierung oder den Nachweis von freiem

oder intrazellulärem Antigen nachgewiesen. Der empfohlene Screeningtest für die Routinediagnose einer FeLV-Infektion ist der *p27*-ELISA (LEVY et al., 2001). Der in manchen Länder häufig eingesetzte IFT ermöglicht den Nachweis von FeLV-Antigenen in Blut- und Gewebeausstrichen. Virusisolation und PCR stellen Referenzmethoden dar, mit denen fragliche ELISA-Ergebnisse überprüft werden können (LUTZ et al., 2009).

### **2.1.1. Virusisolierung**

JARRETT und Mitarbeiter beschrieben 1968 erstmals die Replikation von leukämievirusähnlichen Viren, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden (JARRETT et al., 1968). DE NORONHA und Mitarbeiter (1977) entwickelten die erste für die Routinediagnostik einsetzbare Methode zur Virusisolierung (DE NORONHA et al., 1977). Für dieses Verfahren wurden Clone-81-Katzenzellen oder QN10-Katzenfibroblasten verwendet (FISCHINGER et al., 1974; DE NORONHA et al., 1977). Beide Zellarten beinhalten ein defektes murines Sarkomvirus (MuSV) in ihrem Genom. Nach der Infektion und Replikation von feline Leukämieviren lösen sich die Zellen aus dem Zellverband und runden sich ab. Dieser Effekt entsteht durch die Replikation und Expression des MuSV bei dem FeLV als Helfervirus fungiert (FISCHINGER et al., 1974; DE NORONHA et al., 1977). Dabei entstehen Virushybriden des murinen Sarkomvirus, die in der Hülle des feline Leukämievirus eingeschlossen sind und dazu dienen, neue Zellen zu infizieren.

Das Verfahren der Virusisolation dauert zehn bis vierzehn Tage. Wird nach diesem Zeitraum kein typischer Effekt beobachtet, werden die Zellen nochmals in kleineren Gruppen in ein neues Medium versetzt. Diesen Schritt bezeichnet man als Subkultivierung. Bereits sehr kleine Virusmengen können durch dieses sensitive Verfahren nachgewiesen werden (FISCHINGER et al., 1974).

Vorteile sind neben seiner hohen Sensitivität, der Nachweis von infektiösem Virus. Nachteile der Virusisolation sind der hohe Zeit-, Kosten- und Arbeitsaufwand. Für die Durchführung ist eine aufwendige Laborausstattung und geschultes Personal erforderlich (DE NORONHA et al., 1977; JARRETT et al., 1982a). Optimalerweise sollte es sich bei den zu untersuchenden Proben um frische Blutproben handeln, sonst besteht die Gefahr, kein vermehrungsfähiges Virus mehr nachweisen zu können. Lange Lagerperioden oder falsche

Lagerbedingungen können daher zu falsch negativen Ergebnissen führen. Wegen der hohen Anforderungen beim Probenversand und der Verarbeitung wird die Virusisolation heute nicht mehr zur Routinediagnostik eingesetzt. Durch den Nachweis von viraler Infektiosität gilt sie jedoch nach wie vor als wichtiger Test für die Bestätigung bei positiven Immunochromatografie- und ELISA-Ergebnissen oder bei wissenschaftlichen Fragestellungen (JARRETT, 1980; JARRETT et al., 1982b; BARR, 1996).

### **2.1.2. Antigennachweis**

Der Nachweis von *p27*-Antigen hat heutzutage in der FeLV-Routinediagnostik eine bedeutende Rolle. *P27* ist ein Antigen, das in großen Mengen in FeLV-infizierten Zellen produziert wird und in Serum, Plasma, Speichel, Knochenmark, Tränenflüssigkeit und in vielen Geweben einer FeLV-infizierten Katze nachgewiesen werden kann (HARDY & ZUCKERMAN, 1991). Das Vorhandensein des *p27*-Antigens kann mittels ELISA- oder Immunochromatografietest extrazellulär als freies Antigen oder mittels IFT und Immunohistochemie intrazellulär nachgewiesen werden (LUTZ et al., 2009).

#### **2.1.2.1. Nachweis von Freiem Antigen**

Freies FeLV-Antigen (*p27*) wird nach der Infektion von Monozyten und Lymphozyten in infizierten Zellen produziert und in die Blutbahn abgegeben. Dort kann es durch ELISA oder mithilfe des ELISA-ähnlichen Prinzips der Immunochromatografie nachgewiesen werden (LUTZ et al., 1983b; TORTEN et al., 1991).

##### **2.1.2.1.1. Enzyme-linked immunosorbent assay**

Beim ELISA handelt es sich um einen Immunoassay, der von ENGVALL und PERLMANN (1971) und Van WEEMEN und SCHUURS (1974) entwickelt wurde (ENGVALL & PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN & SCHUURS, 1974). LUTZ und Mitarbeiter entwickelten 1983 den ersten FeLV-ELISA (LUTZ et al., 1983b).

Das Prinzip des FeLV-ELISA beruht auf einem Immunoassay, der die Anwesenheit von *p27* im Blut nachweist (LUTZ et al., 1983b; TORTEN et al., 1991). *P27* ist ein 27 kDa schweres Protein des gruppenspezifischen Antigens des Innenkörpers. Der Nachweis von *p27* ist bereits in der Frühphase der Infektion bei

Vermehrung des Virus im Nasopharynx und später in der Virämiephase, in der sich das Antigen frei in der Blutbahn befindet, möglich. Dies erfolgt mittels mono- oder polyklonalen Antikörpern. Im Gegensatz zu polyklonalen sind monoklonale Antikörper gegen dasselbe Epitop eines Antigens gerichtet und stammen alle von einem Klon einer B-Zelle ab. Dadurch werden unspezifische Reaktionen vermieden, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können (LUTZ et al., 1983b). LUTZ und Mitarbeiter entwickelten 1983 den ersten FeLV-ELISA, einen *p27*-ELISA, mit drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern (LUTZ et al., 1983b). SETTELE (1989) zeigte, dass dieser ELISA im Vergleich zu anderen ELISA eine niedrigere Nachweisgrenze von *p27* aufweist und dadurch eine höhere Sensitivität besitzt (SETTELE, 1989).

Nach Zugabe der vorgeschriebenen Menge an Testserum erfolgt die Inkubation des Testserums und des Konjugats auf der beschichteten Mikrotiterplatte des ELISA. Bei diesem Schritt binden evtl. vorhandene *p27*-Antigene im Testserum an die Antikörper, die an die Mikrotiterplatte fixiert sind. An diese entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe kann sich das im Test enthaltene Konjugat binden. Dabei handelt es sich um einen Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist. Im darauffolgenden Waschschrift werden ungebundene Antikörper entfernt. Durch Zugabe eines Substrates und Chromogens läuft im Fall einer FeLV-positiven Probe eine Enzymreaktion ab und ein Farbumschlag wird sichtbar. Dabei korreliert die Intensität der Farbreaktion mit der Konzentration von *p27* im Testserum. Das Ablesen des Testergebnisses erfolgt mit bloßem Auge oder mithilfe eines ELISA-Readers (LUTZ et al., 1983b).

Seit Einführung der ersten kommerziellen ELISA-Testsysteme wurden zahlreiche Testvergleichsstudien mit unterschiedlichen Referenzmethoden durchgeführt. Diese Studien vergleichen ELISA mit dem IFT (LUTZ et al., 1980; JARRETT et al., 1982a; HARDY & ZUCKERMAN, 1991; JARRETT et al., 1991; SWANGO, 1991), mit der Virusisolation ((JARRETT et al., 1982b; JARRETT, 1991; HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007) und mit der PCR (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Deutliche Unterschiede bezüglich der Sensitivität und Spezifität wurden für die einzelnen Nachweisverfahren in den unterschiedlichen Studien ermittelt (JARRETT, 1980; JARRETT et al., 1982a; HARDY & ZUCKERMAN, 1991). Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz liegen im Verlauf der FeLV-Infektion, an Mängeln der Testsysteme und an

möglichen Fehlern bei der Durchführung der Tests (LOAR, 1993). Prinzipiell können jegliche Handhabungsfehler wie unzureichende Waschschriffe, zu große oder zu kleine Probenmengen und das Nichteinhalten von Reaktionszeiten zu falsch positiven Ergebnissen führen (PEDERSEN et al., 1986).

In der Frühphase der Infektion befinden sich bereits mit Virus infizierte Lymphozyten und Monozyten in der Blutbahn. In diesen Zellen wird massenhaft *p27* gebildet und in die Blutbahn abgegeben. Dadurch reagiert der ELISA bereits in dieser Phase der Infektion positiv. Der IFT kann zu diesem Zeitpunkt noch keine Infektion nachweisen, da das Knochenmark noch nicht infiziert und kein nachweisbares Antigen in den Blutzellen vorhanden ist (JARRETT et al., 1982a). Auch die selten auftretende atypische Verlaufsform der FeLV-Infektion kann zu diskrepanten Testergebnissen zwischen ELISA und IFT führen. Bei dieser Form der Infektion beenden Katzen das Stadium der Virämie, eliminieren aber das Virus nicht vollständig aus dem Organismus. Das Virus verbleibt in bestimmten Organen, wie z. B. Darm, Milz, Milchdrüse oder Harnblase und vermehrt sich dort weiterhin. Im Gegensatz zur latenten Form der Infektion bei der keine Virusvermehrung mehr stattfindet. Dadurch kann es ausgehend von den betroffenen Organen vorübergehend zu einer Virämie und Antigenämie mit Virusausscheidung kommen (LUTZ et al., 1980; PACITTI et al., 1986). Zu diesem Zeitpunkt sind die Tiere ELISA-positiv, der IFT ist hingegen negativ, da keine Virusvermehrung in Knochenmarkszellen stattfindet (JARRETT et al., 1982a; LUTZ et al., 1983b).

Der FeLV-Antigen-ELISA stellt den am häufigsten verwendeten Test in der FeLV-Diagnostik dar (JARRETT et al., 1964). Zudem empfiehlt die American Association of feline Practitioners' (AAFP) in den Feline Retrovirus Management Guidelines dieses Verfahren als Routinetest (LEVY et al., 2008a). In den letzten Jahren wurden mehrere Studien zum Vergleich der kommerziell erhältlichen ELISA-Tests durchgeführt. Die Sensitivität der kommerziellen Tests lag zwischen 92 und 100 % und die Spezifität zwischen 95 und 100 % (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007).

#### **2.1.2.2. Nachweis von intrazellulärem Antigen**

Der Nachweis von intrazellulärem Antigen kann mittels IFT und Immunohistochemie erfolgen. Beide Verfahren ermöglichen frühestens drei

Wochen nach der FeLV-Infektion den Nachweis von intrazellulärem Antigen. Von diesem Zeitpunkt an ist das Knochenmark infiziert und es befindet sich Antigen in den infizierten Blutzellen. Das intrazelluläre Antigen wird beim IFT direkt in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten nachgewiesen (HARDY et al., 1973b; HARDY et al., 1973a), bei der Immunohistochemie in paraffinfixierten Gewebeschnitten (REINACHER & THEILEN, 1987).

#### **2.1.2.2.1. Immunfluoreszenztest**

Der indirekte IFT wurde von HARDY und Mitarbeitern (1973) für den Nachweis von FeLV entwickelt und war als erster FeLV-Test für die Routinediagnostik verfügbar. Das Prinzip des indirekten IFT beruht auf dem Nachweis von Antigen durch die Bindung von spezifischen Antikörpern. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe können in einem zweiten Schritt durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper sichtbar gemacht werden (HARDY et al., 1973b).

Die gruppenspezifischen Innenkörperproteine (*p15*, *p12*, *p27* und *p10*) des FeLV werden durch ein polyklonales Kaninchen-anti-FeLV-Serum markiert. Die Gewinnung des Serums erfolgt durch die aktive Immunisierung von Kaninchen mit FeLV. Zur Durchführung des IFT werden dünne Blut- oder Knochenmarkausstriche verwendet. Nach Ausstrich der Zellen erfolgt die Fixierung der Zellen mit Alkohol oder Aceton. Dadurch ist der Nachweis des FeLV-Antigens bis zu drei Monate lang möglich. Durch die Fixierung wird die äußere Zellmembran der Blutzellen zerstört und die zugegebenen Antikörper können an das evtl. vorhandene FeLV-Protein im Zytoplasma binden. Erfolgt die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, können diese durch Isothiocyanat-konjugierte-anti-Kaninchen Antikörper sichtbar gemacht werden. Im Fluoreszenzmikroskop sind sie als apfelgrün-fluoreszierende Punkte sichtbar (HARDY & ZUCKERMAN, 1991).

Ein positiver Nachweis von FeLV-Antigen durch den IFT zeigt an, dass das Knochenmark bereits infiziert ist und die FeLV-Infektion mindestens drei Wochen zurück liegt (HOOVER et al., 1977; ROJKO et al., 1979). Bei experimentell infizierten Katzen ist der Nachweis mittels IFT ab dem 18. Tag *post infectionem* möglich (JARRETT et al., 1982b). Repliziert sich Virus im

Knochenmark, ist die Katze virämisch und scheidet das Virus mit dem Speichel aus (HARDY et al., 1973a; HOOVER et al., 1977; ROJKO et al., 1979). Bei einer IFT-positiven Katze besteht eine 91 bis 97 % Wahrscheinlichkeit, dass sie lebenslang virämisch bleibt. Nur in etwa 3 bis 9 % der Fälle handelt es sich bei IFT-positiven Katzen um eine regressive Infektion (transiente Virämie) (JARRETT et al., 1982a; LUTZ et al., 1983b; HARDY & ZUCKERMAN, 1991).

Falsch negative IFA-Ergebnisse können durch leukopenische Blut- und Knochenmarkausstriche hervorgerufen werden (HARDY & ZUCKERMAN, 1991). Auch bei der Verwendung von heparinisierten Blutproben können falsch negative Interpretationen auftreten, weil sich die Fluoreszenz der positiven Zellen verringert (JARRETT, 1995). Zu dick ausgestrichene Blutausrüche erschweren die Auswertung in den übereinander liegenden Zellschichten, in denen es häufig zu unspezifischen Reaktionen mit dem Reagenz kommt (HARDY & ZUCKERMAN, 1991). Unspezifische Bindungen des Fluoreszenzfarbstoffes an eosinophile Granulozyten können unspezifische Anfärbungen hervorrufen, die ein falsch positives Ergebnis vortäuschen (FLOYD et al., 1983).

Seitdem der IFT kommerziell verfügbar ist, wird von widersprüchlichen Ergebnissen zwischen FeLV-ELISA und IFT berichtet. Diese Beobachtungen traten gehäuft bei positiven ELISA-Testergebnissen auf, in denen der IFT als Bestätigungstest verwendet wurde. Bei dieser Konstellation muss beachtet werden, dass erst drei Wochen *post infectionem* das Knochenmark infiziert ist und der IFT positive Ergebnisse liefert, der ELISA jedoch früher positiv reagiert (HARDY et al., 1973b; HARDY & ZUCKERMAN, 1991).

Seit der Entwicklung im Jahr 1973 wird der IFT auch heute, neben der Virusisolierung und verschiedenen PCR als Referenzmethode in der FeLV-Diagnostik angesehen und bei positiven ELISA- und Immunochromatografietests als Bestätigungstest eingesetzt (HARDY & ZUCKERMAN, 1991).

#### **2.1.2.2.2. Immunhistochemie**

Das Verfahren der Immunhistochemie zählt zu den etablierten Standardmethoden um Antigen qualitativ im Gewebe nachzuweisen (LOTTSPREICH et al., 2006). In der FeLV-Diagnostik wird dieses Verfahren zum *post mortem* Nachweis von FeLV-Antigen aus Geweben, z. B. aus dem Knochenmark, der Milz, den Lymphknoten und dem Darm eingesetzt (LUTZ et al., 2009). Heute gibt es licht-

und elektronenoptische Verfahren zum einen für die Untersuchung von nativen Gewebeschnitten als auch von Schnitten von fixiertem Gewebe, das in Paraffin oder Plastik eingebettet wurde. In der FeLV-Diagnostik werden in den meisten Fällen methanol- oder formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte nach Entparaffinisierung auf das Vorliegen von *p27*- und *p70*-Antigen untersucht (REINACHER & THEILEN, 1987; KOVACEVIC et al., 1997). Die Zugabe der Antikörper erfolgt heute in den meisten Fällen nach dem Schneiden und Einbetten (Processing) am Schnitt selbst (LOTTTSPEICH et al., 2006). Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wird empfohlen, mono- oder polyklonales *p27*-Antiserum oder einen monoklonalen *gp70*-Antikörper einzusetzen (KOVACEVIC et al., 1997).

### **2.1.3. Nachweis des viralen Genoms**

Die PCR wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt (MULLIS et al., 1986). SAIKI und Mitarbeiter (1985) beschrieben dieses Verfahren zum Nachweis des Genoms erstmals (SAIKI et al., 1985). Diese Methode dient dazu, einen kurzen, definierten Teil der Erbsubstanz zu vervielfältigen (amplifizieren). Ursprünglich wurde die PCR in der Humanmedizin angewandt, um humane  $\beta$ -Globin-DNA-Sequenzen zur pränatalen Diagnose der Sichelzellenanämie nachzuweisen (SAIKI et al., 1985).

Die PCR ist eine sehr sensitive und spezifische Methode, die den qualitativen und quantitativen Nachweis von FeLV-infizierten Zellen in Blut und Geweben ermöglicht (LUTZ et al., 2009). Durch Weiterentwicklung der PCR seit dem Jahr 1985 stehen das Verfahren der „nested“ PCR und das Verfahren der TaqMan real-time PCR zur Verfügung, welche die Quantifizierung von Provirus-Loads ermöglichen (KEMP et al., 1989; ALBERT & FENYO, 1990; LIVAK et al., 1995; GIBSON et al., 1996; TANDON et al., 2005; LOTTTSPEICH et al., 2006).

#### **2.1.3.1. Herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR macht sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutze, DNA zu duplizieren. Voraussetzung hierfür ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit freiem 3'-OH-Ende, der entsprechend verlängert werden kann. Bei Anwesenheit von DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa zwanzig Nukleotiden im Reaktionsansatz, auch Oligonukleotide oder Primer genannt, kommt es zur Bindung an den DNA-Einzelstrang (Annealing) und, ausgehend

davon, zu einer Verlängerung (Extension) durch die Polymerase. Denaturiert man anschließend die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge durch Temperaturerhöhung in zwei Einzelstränge, können neue Primer binden und der PCR-Prozess kann von neuem beginnen (LOTTSPREICH et al., 2006). Die gewonnenen PCR-Produkte können mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Anfärben mit Ethidiumbromid und Sichtbarmachen mit UV-Licht können die amplifizierten DNA-Sequenzen als Banden dargestellt werden (MULLIS et al., 1986).

Die Fähigkeit von DNA-Polymerasen bei Temperaturen von über 72 °C DNA-Abschnitte zu synthetisieren (hohe Prozessivität) sowie eine gute Temperaturstabilität bei 95°C stellen wichtige Voraussetzungen für deren Verwendung bei der PCR dar. Die Taq-DNA-Polymerase kommt in den meisten Standardprotokollen zum Einsatz und besitzt eine hohe 5'-3'-Exonukleaseaktivität (LOTTSPREICH et al., 2006).

#### **2.1.3.2. „Nested“ Polymerase-Kettenreaktion**

Durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Primerpaaren wird die Sensitivität und Spezifität beim Verfahren der „nested“ (verschachtelte) PCR noch erhöht (KEMP et al., 1989; ALBERT & FENYO, 1990; RIMSTAD et al., 1990; LOTTSPREICH et al., 2006). In zwei hintereinander folgenden Amplifizierungszyklen synthetisiert zunächst das äußere Primerpaar ein etwas größeres Amplikon (PCR-Produkt). Dieses Amplikon wird anschließend in einer zweiten Reaktion mit dem inneren Primerpaar weiter amplifiziert. Der zweite PCR-Zyklus kann nur im Anschluss ablaufen, wenn im ersten Zyklus die korrekte Sequenz amplifiziert wurde. Die Zugabe des inneren Primerpaares erfolgt in der Regel nach 15 bis 20 Zyklen. Dadurch ist die PCR spezifischer. Das Umpipettieren des Amplikons für den zweiten PCR-Schritt birgt jedoch eine hohe Kontaminationsgefahr und stellt damit einen entscheidenden Nachteil des Verfahrens dar. Um dies zu verhindern, besteht die Möglichkeit eine sogenannte „one tube nested PCR“ durchzuführen. Bei diesem ähnlichen Reaktionsansatz liegen alle vier Primer gleich zu Reaktionsbeginn vor. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das äußere Primerpaar einen höheren Schmelzpunkt hat als das innere. Man wählt die Temperatur im Reaktionsverlauf so, dass zunächst bei erhöhter Temperatur der äußere Primer anlagert und nach Senkung der Temperatur der innere Primer binden kann (LOTTSPREICH et al., 2006). Nach

Einführung der real-time PCR, die die Möglichkeit der Quantifizierung bietet, hat die „nested“ PCR keine große Bedeutung in der FeLV-Diagnostik mehr (KEMP et al., 1989).

### **2.1.3.3. Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion**

Neben den bisher eingesetzten PCR-Methoden hat sich in den letzten Jahren die quantitative TaqMan real-time PCR etabliert, die auch heute in der FeLV-Diagnostik eine bedeutende Rolle spielt (LIVAK et al., 1995; GIBSON et al., 1996; HEID et al., 1996; TANDON et al., 2005). Die Messung der gebildeten Amplifikationsprodukte erfolgt nicht erst nach erfolgter Amplifikation, sondern direkt während des Amplifikationsvorganges (homogenes Format). Durch den Ablauf der Reaktion in geschlossenen Gefäßen (closed system) und die direkte Detektion der Fluoreszenzsignale zu jeder Zeit der Amplifikationsreaktion wird das Kontaminationsrisiko deutlich gesenkt. Die Bildung der Amplifikate erfolgt daher in „Echtzeit“, so dass man von „real-time“-Messungen spricht (LOTTSPREICH et al., 2006). Das Prinzip dieses quantitativen Nachweisverfahrens beruht auf der 5'-3'-Aktivität der DNA-Polymerase (HOLLAND et al., 1991; LYAMICHEV et al., 1993) und dem Förster-Energietransfer (FÖRSTER, 1948).

Beim Ablauf des Verfahrens befindet sich zusätzlich zu den beiden Primern, (einem vorwärts- und einem rückwärts gerichtetem), eine fluoreszenzmarkierte Sonde im PCR-Reaktionsgefäß. Die Sonde bindet an eine spezifische Gensequenz zwischen den beiden Primern. Am 5'- und 3'- Ende ist sie mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, einem Reporterfarbstoff und einem Quencher. Sind beide Farbstoffe an die Sonde gebunden, kommt es durch ihre räumliche Nähe und durch monochromatische Anregung eines Argonlasers zu einem Energietransfer. Die entstandene Energie wird vom Reporter an den Quencher übertragen und absorbiert. Durch diesen Vorgang entsteht kein messbares Fluoreszenzsignal. Im Verlauf der Amplifizierung werden beide Primer durch die Taq-Polymerase verlängert bis sie auf die Sonde treffen (HOLLAND et al., 1991). Gelangt die Polymerase zur Sonde, wird die Sonde vom Strang abgelöst und durch die 5'-Nuklease Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch werden Reporter und Quencher voneinander getrennt und es ist kein Energieaustausch mehr möglich. Dies führt zu einem messbaren Anstieg der Reporterfluoreszenz, die direkt proportional zur Menge des gebildeten Amplifikationsprodukts ist. Die

Fluoreszenzsignale von Reporter und Quencher werden alle sieben Sekunden gemessen und gespeichert. Aus den gewonnenen Daten kann der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität dargestellt werden. Meist liegt in den ersten Amplifikationszyklen das Fluoreszenzsignal unterhalb der Nachweisgrenze, um von der CCD-Kamera aufgenommen zu werden. Danach steigt es kontinuierlich an. Innerhalb der Verlaufskurve wird nun ein geeigneter Parameter bestimmt, der die Quantifizierung der Ausgangsmenge erlaubt. Dieser Punkt wird als sogenannter „threshold“ bezeichnet. Der PCR-Zyklus, bei dem die PCR-Kurve diesen threshold schneidet, wird als threshold-cycle definiert. Der threshold-cycle korreliert mit der eingesetzten Virusmenge und erlaubt daher eine genaue Quantifizierung der Virusmenge, die für die PCR eingesetzt wurde (LEUTENEGGER et al., 2001; LOTTSPREICH et al., 2006).

Seit einigen Jahren ist die TaqMan real-time PCR verfügbar und hat sich als schnelle, spezifische und sensitive Methode bewährt (LIVAK et al., 1995; GIBSON et al., 1996; HEID et al., 1996). Diese Methode weist gegenüber der konventionellen PCR deutliche Vorteile auf. Zum einen werden für die vollständige Quantifizierung der Ausgangs-DNA-Menge nur geringe Mengen, benötigt und es können in kurzer Zeit große Probenmengen bearbeitet werden (HEID et al., 1996). Zum anderen ist das Kontaminationsrisiko sehr gering, da die Reaktionsgefäße während und nach der PCR nicht mehr geöffnet werden müssen. Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgt bei jedem PCR-Zyklus automatisch (LIVAK et al., 1995; GIBSON et al., 1996; HEID et al., 1996).

Mithilfe der TaqMan real-time PCR konnte auch die Pathogenese der FeLV-Infektion genauer beschrieben werden (TORRES et al., 2005; HOFMANN-LEHMANN et al., 2007). So konnte kürzlich dokumentiert werden, dass Katzen, die eine Immunität gegen die FeLV-Infektion entwickelt hatten, trotzdem FeLV-DNA in sich tragen (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; TANDON et al., 2005; TORRES et al., 2005; HOFMANN-LEHMANN et al., 2006). Bei einer regressiven Infektion und einer nicht nachweisbaren oder transienten Antigenämie wurden geringe periphere Provirus-Level im Blut und Virus-RNA-Level im Plasma festgestellt. Persistierend hohe Provirus- und Virus-RNA-Level sind charakteristisch für Katzen mit progressivem Verlauf der FeLV-Infektion (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007). Für die latente Form der FeLV-Infektion sind die veröffentlichten Ergebnisse konträr. TORRES und Mitarbeiter (2008)

finden hier moderate Provirus-Load, im Gegensatz zu HOFMANN-LEHMANN und Mitarbeiter (2007), die keinen Unterschied zwischen dem Provirus-Load bei Katzen mit latenter und regressiver Infektion beschreiben (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007; TORRES et al., 2008). Katzen, die die Virämie beenden können, bleiben daher über die gesamte Lebenszeit Provirus-positiv. Diese Katzen besitzen eine Immunität gegen FeLV. Die FeLV-DNA bleibt aber offenbar in den Knochenmarkszellen zurück (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Welche Rolle die inkorporierte FeLV-DNA in Knochenmarkszellen für die Entwicklung der latenten Infektion spielt, ist bisher unklar (HOFMANN-LEHMANN et al., 2008).

## 2.2. Indirekter Erregernachweis

Der Nachweis von Antikörpern hat keine Bedeutung in der FeLV-Diagnostik. Antikörper können in jeder Phase der Infektion und auch nach Elimination des Virus nachgewiesen werden. Der FeLV-Antikörpertest wird deshalb nicht zur Diagnose einer FeLV-Infektion herangezogen, kann jedoch wichtige Information über eine bestehende Immunität liefern (HARTMANN & HEIN, 2008). FeLV-infizierte Katzen produzieren Antikörper gegen eine Vielzahl von FeLV-Antigenen (ESSEX et al., 1977; JACQUEMIN et al., 1978; LUTZ et al., 1980; CHARREYRE & PEDERSEN, 1991). Katzen, die die FeLV-Infektion noch vor oder nach einer kurzen Virämiephase beenden können, entwickeln signifikant höhere Antikörperspiegel als Katzen, die eine persistierende FeLV-Infektion entwickeln (LUTZ et al., 1980). Entsteht im Verlauf der FeLV-Infektion eine Immunität, wird diese durch Virus-neutralisierende Antikörper vermittelt, die sich hauptsächlich gegen Epitope des Hüllproteins *gp70* richten (HARDY et al., 1976; GRANT et al., 1980; LUTZ et al., 1980). Die Virus-neutralisierenden Antikörper binden an spezifische Antigene an der Virusoberfläche und verhindern damit, dass das Virus an die Wirtszelle binden kann. Bei fast allen Katzen (ca. 98 %), die eine Infektion mit FeLV eliminieren können, sind Virus-neutralisierende Antikörper nachweisbar (HOOVER et al., 1977; LUTZ, 1984; CHARREYRE & PEDERSEN, 1991)

Zum Nachweis von Antikörpern gegen FeLV werden Virusneutralisationstests und der ELISA verwendet. Der Nachweis von Virus-neutralisierenden Antikörpern in der Zellkultur (SCHALLER et al., 1975) kann durch zwei Methoden erfolgen; bei dem ersten Verfahren handelt es sich um den

Virusneutralisationstest, bei dem zweiten um eine Kombination aus ELISA und Gelelektrophorese, dem GEDELISA. Der GEDELISA ermöglicht den Nachweis von verschiedenen Antikörpern gegen FeLV (LUTZ et al., 1980).

### **2.2.1. Enzyme-linked immunosorbent assay**

Der ELISA wurde in unterschiedlichen Studien eingesetzt, um die Antikörperproduktion im Verlauf der FeLV-Infektion zu untersuchen (LUTZ et al., 1980; WEIJER et al., 1993). Durch die Kombination mit einem weiteren Verfahren, der Gelelektrophorese, zum „gel electrophoresis-derived enzymed-linked immunosorbent assay“ (GEDELISA) gelang es LUTZ und Mitarbeitern (1980) auch eine qualitative und quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen verschiedene FeLV-Antigene durchzuführen (LUTZ et al., 1980). Ausschließlich Antikörper gegen Hüllproteine (*gp70*) besitzen Virus-neutralisierende Eigenschaften. WEIJER und Mitarbeiter (1993) untersuchten diesen Zusammenhang und entwickelten einen ELISA mit unterschiedlichen FeLV-Antigenen (FeLV-Vollvirus, FeLV-*gp70*, unterschiedliche *gp70*-Peptideinheiten). (WEIJER et al., 1993).

Im ersten Schritt wird FeLV dabei mithilfe der Gelelektrophorese in seine einzelnen Proteinfractionen aufgetrennt. Dadurch wird sichergestellt, dass Antikörper gegen jedes einzelne Protein nachgewiesen werden. Die einzelnen Proteine werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte des ELISA pipettiert. Im Anschluss kann der ELISA mit dem Testserum gestartet werden. Nach Ablauf erfolgt anhand der für die einzelnen Proteinfractionen gemessenen Absorptionswerte eine quantitative Bestimmung der FeLV-Antikörper (LUTZ et al., 1980; WEIJER et al., 1993).

### **2.2.2. Virusneutralisationstest**

Der Virusneutralisationstest ermöglicht durch Beurteilung des zytopathischen Effekts in einer standardisierten FeLV-infizierten Zellkultur Virus-neutralisierende Antikörper nachzuweisen (SARMA et al., 1975; SCHALLER et al., 1975). Zur Durchführung des Virusneutralisationstests werden Zellkulturreihen (mit Clone-81-Katzenzellen oder QN10-Katzenfibroblasten) in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit dem zu untersuchenden Testserum inkubiert. Zu diesem Ansatz wird zu jeder Verdünnungsstufe infektiöses FeLV gegeben. Sind keine oder nicht ausreichende Virus-neutralisierende Antikörper

vorhanden, kommt es ab der jeweiligen Verdünnungsstufe zum zytopathischen Effekt (SCHALLER et al., 1975).

Bis heute steht kein standardisierter Virusneutralisationstest zur Verfügung, sodass diese Methode keinen routinemäßigen Einsatz in der Diagnostik findet. Dieses Verfahren wird hauptsächlich im Rahmen von Impfstoffstudien eingesetzt (WEIJER et al., 1993).

### **III. VERÖFFENTLICHUNGEN**

#### **1. Studie 1**

**Evaluation of a new in-clinic test system to detect feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection**

**Christina Sand**

Clinic of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

**Theresa Englert**

Clinic of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

**Herman Egberink**, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Department of Infectious Disease and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands

**Hans Lutz**, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Department of Internal Veterinary Medicine, Veterinary Faculty, University of Zurich, Zurich, Switzerland

**Katrin Hartmann**, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Clinic of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

**Journal of Veterinary Clinical Pathology, Epub ahead of print.**

## ORIGINAL RESEARCH

## Evaluation of a new in-clinic test system to detect feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection

Christina Sand<sup>1</sup>, Theresa Englert<sup>1</sup>, Herman Egberink<sup>2</sup>, Hans Lutz<sup>3</sup>, Katrin Hartmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany; <sup>2</sup>Department of Infectious Disease and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands; and <sup>3</sup>Department of Internal Veterinary Medicine, Veterinary Faculty, University of Zurich, Zurich, Switzerland

### Key Words

Diagnosis, ELISA, FeLV, FIV, immunochromatography

### Correspondence

Prof. Dr. Katrin Hartmann, Clinic of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany  
E-mail: hartmann@uni-muenchen.de

DOI:10.1111/j.1939-165X.2009.00196.x

**Background:** Many in-house tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) infection are licensed for use in veterinary practice. A new test with unknown performance has recently appeared on the market.

**Objectives:** The aims of this study were to define the efficacy of a new in-clinic test system, the Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test, and to compare it with the current leading in-clinic test, the SNAP Kombi Plus FeLV Antigen/FIB Antibody Test.

**Methods:** Three-hundred serum samples from randomly selected healthy and diseased cats presented to the Clinic of Small Animal Medicine at Ludwig Maximilian University were tested using both the Anigen Rapid Test and the SNAP Kombi Plus Test. Diagnostic sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were calculated for both tests using Western blot as the gold standard for verification of FIV infection and PCR as the gold standard for FeLV infection.

**Results:** The presence of antibodies against FIV was confirmed by Western blot in 9/300 samples (prevalence 3%). FeLV DNA was detected by PCR in 15/300 samples (prevalence 5%). For FIV infection the Anigen Rapid Test had a sensitivity of 88.9%, specificity of 99.7%, positive predictive value of 88.9%, and negative predictive value of 99.7%. For FeLV infection, the Anigen Rapid Test had a sensitivity of 40.0%, specificity of 100%, positive predictive value of 100%, and negative predictive value of 96.9%. Diagnostic accuracy was similar to that of the SNAP Kombi Plus Test.

**Conclusion:** The new Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test performed very well and can be recommended for use in veterinary practice.

### Introduction

Feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) are both members of the retroviridae family of RNA viruses.<sup>1</sup> FIV is a member of the lentivirus genus, while FeLV belongs to the subfamily orthoretrovirinae, genus gammaretrovirus. Both cause severe, often fatal diseases in domestic cats. Both infections occur worldwide with prevalence varying by location.<sup>2</sup> Clinical signs are caused mainly by secondary infections resulting from immunodeficiency, tumors, and hematologic abnormalities. Underlying retrovirus infection cannot be detected by routine clinical evaluation. Therefore, all cats should be tested for FIV and FeLV,

especially those that are sick with clinical signs that might be related to FeLV and/or FIV infection or before being introduced into a multiple-cat household.<sup>3</sup> Testing to identify and segregate infected cats is the most important method for preventing viral transmission.

Accurate and simple-to-use diagnostic tests for in-clinic detection of FeLV and FIV are indispensable to veterinarians in the management and control of these diseases. A variety of different testing methods are available, including rapid screening tests for FeLV antigens and FIV antibodies in plasma, serum, or whole blood. In recent years, many rapid test systems have been licensed for use in veterinary practice, and their diagnostic performance has been compared.<sup>4,5</sup>

The preferred initial tests are in-house tests such as an ELISA or immunochromatographic test, which offer the advantage of speed and convenience.<sup>6</sup> These tests detect the presence of soluble FeLV p27 antigen and the presence of antibodies against FIV proteins (usually p24 core protein and/or gp40 transmembrane protein). However, the sensitivity and specificity of each test and the prevalence of the infectious agent in question must be considered when interpreting test results.<sup>5</sup>

A new test system, Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit is now on the European market in Austria, Spain, and Germany. The aim of this study was to assess its diagnostic sensitivity and specificity and the predictive value of positive and negative test results. In addition, this new test was compared with the SNAP Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Antibody Test, which is used most often in Europe today. Both tests are immunoassays for simultaneous detection of FIV antibodies and FeLV antigen in feline serum, plasma, or whole blood.

**Materials and methods**

Blood samples were obtained from 300 cats presented from June 2007 to May 2008 for a variety of diseases or tested routinely before vaccination against FeLV at the Clinic of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University. All cats for which clinicians requested FIV and FeLV tests, eg, for determination of retroviral status in sick cats or cats presented for FeLV vaccination, were included in the study until a total of 300 cats was reached. Cats were excluded from the study if they were < 6 months old or had been vaccinated against FIV.

Blood samples were collected in EDTA and serum tubes. Serum was separated within 10 minutes after blood sampling. The serum was tested immediately with the Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test kit (Animal Genetics Inc., Kyunggi-do, Korea) and the SNAP Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Antibody Test (IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Germany), according to manufacturers' instructions. Serum and whole blood were frozen within 1 hour at -20°C for up to 4 months; samples were thawed immediately before use for the reference tests. Samples were blinded during performance of the in-clinic tests and the person performing the reference tests was blinded to the in-clinic test results.

Western blot as described by Egberink et al<sup>6</sup> was used as the gold standard test to confirm FIV infection. The blots contained purified proteins of FIV and envelope protein fragments expressed by *Escherichia coli*. These FIV-specific proteins were separated by electro-

phoresis in 12.5% polyacrylamide gels in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), then electrophoretically transferred to nitrocellulose filters and cut into blot strips. The nitrocellulose strips were blocked for 2 hours at room temperature using a gelatin buffer and subsequently incubated with a 1:10 dilution of feline serum followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-cat IgG. The antigen-antibody reaction was visualized using 4-chloro-1-naphthol as the chromagen. The proteins that can be visualized on the blot strips are structural proteins of the purified FIV strain CrFK-113: CA (capsid protein, gag), KSU3 (surface protein, envelope), and GTM2 (transmembrane, envelope). Samples were considered FIV positive if 2 or more of these protein bands were visible.

TaqMan real-time PCR was used as the gold standard test to verify FeLV infection and detects proviral DNA in infected cats.<sup>7,8</sup> Probe and primers were designed to amplify all 3 subtypes of FeLV within the unique region (U3) of the long terminal repeat (LTR).<sup>9</sup>

**Results**

Antibodies against FIV were detected by Western blot analysis in 9/300 samples (prevalence 3%). FeLV DNA was detected by TaqMan real-time PCR in 15/300 samples (prevalence 5%). Both FIV antibodies and FeLV antigens were present in 2 samples. Results obtained using the Anigen Rapid Test and the SNAP Kombi Plus Test were summarized (Tables 1 and 2). In comparison with the Anigen Rapid Test the Snap Kombi Plus Test

**Table 1.** FIV results using the new Anigen Rapid Test system and the SNAP Kombi Plus Test system, as compared with the gold standard test.

	Gold Standard Test (Western Blot)			
	Positive	Negative	Total	
<b>Anigen Rapid Test</b>				
Positive	8	1	9	PPV = 88.9%
Negative	1	290	291	NPV = 99.7%
Total	9	291	300	
	Se = 88.9% (CI, 56.5-98.0%)		Sp = 99.7% (CI, 98.1-99.9%)	
<b>SNAP Kombi Plus</b>				
Positive	8	0	8	PPV = 100%
Negative	1	291	292	NPV = 99.7%
Total	9	291	300	
	Se = 88.9% (CI, 56.5-98.0%)		Sp = 100% (CI, 98.7-100%)	

Se, sensitivity; Sp, specificity; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; FIV, feline immunodeficiency virus.

**Table 2.** FeLV results using the new Anigen Rapid Test system and the SNAP Kombi Plus Test system, as compared with the gold standard test.

	Gold Standard Test (PCR)		Total	
	Positive	Negative		
<b>Anigen Rapid Test</b>				
Positive	6	0	6	PPV=100%
Negative	9	285	294	NPV=96.9%
Total	15	285	300	
	Se=40.0% (CI, 19.8–64.3%)	Sp=100% (CI, 98.7–100%)		
<b>SNAP Kombi Plus</b>				
Positive	8	0	8	PPV=100%
Negative	7	285	292	NPV=97.6%
Total	15	285	300	
	Se=53.3% (CI, 30.1–75.2%)	Sp=100% (CI, 98.7–100%)		

Se, sensitivity; Sp, specificity; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; FeLV, feline leukemia virus.

was more difficult to read due to the colored background window.

## Discussion

In this study, the new Anigen Rapid Test system was compared with the Snap Kombi Plus Test system most commonly used in Europe and the United States. The new test had high sensitivity (88.9%) and specificity (99.7%) for detecting FIV antibodies, with high positive and negative predictive values. For FeLV antigen detection, the Anigen Rapid Test had a sensitivity of 40.0%, and specificity and positive and negative predictive value at or near 100%. Thus, diagnostic accuracy was similar to that of the Snap Kombi Plus Test.

Valid test evaluation studies should fulfill certain criteria.<sup>10</sup> First, test systems should be compared with a reference gold standard performed by an independent person, as was done in this study. Western blot was chosen as the gold standard test for FIV infection in this study. Western blot is the accepted gold standard for FIV diagnosis,<sup>6,11</sup> at least in countries in which no FIV vaccine is available, although it has some shortcomings. The number of bands on the blot strips required to definitively identify a positive result, is disputed. Hosie and Jarrett<sup>12</sup> consider only the presence of antibodies against at least 3 core proteins as a positive result, while Barr<sup>13</sup> and Reid et al<sup>14</sup> suggest that the presence of 2 virus-specific bands is adequate to indicate a positive result and consider reactivity against a single viral protein to be equivocal.<sup>5</sup> Viral culture using peripheral blood mononuclear cells offers the possibility to verify the infection status of FIV-infected, uninfected, or vaccinated cats.<sup>15,16</sup> However, virus isolation

has high technical demands and is expensive, time consuming, and not widely available. For these reasons, Western blot was used as the gold standard for FIV antibody detection in this study.

No generally accepted gold standard for FeLV detection exists. A variety of methods, such as immunofluorescence assay (IFA) and virus isolation, have been used.<sup>17–20</sup> Virus isolation has many limitations; it detects replication-competent virus, whereas the index test detects soluble antigen. Presence of the virus is not always consistent with the presence of soluble antigen in blood. In addition, transport and storage of samples can lead to false-negative virus isolation results due to destruction of the virus. The technique furthermore is technically demanding, expensive, and time consuming. Virus isolation as a gold standard can lead to misinterpretation of true positive results as false positive. Other methods to detect FeLV are also not ideal, including IFA, which produces a high number of false positive and false negative results.<sup>21,22</sup> While virus isolation and IFA are useful in detecting infected cats, they do not detect latent infection with FeLV. Thus, TaqMan real-time PCR was used as the gold standard in our study. This assay was developed for the detection of FeLV proviral DNA in infected cats.<sup>7,8</sup> and has higher sensitivity than that of ELISA and virus isolation in the early phase of infection. In addition, the assay identifies provirus carriers that have overcome antigenemia.<sup>7</sup> Key benefits of this method are the ability to quantify the input template over a broad linear range, low sample consumption, the ability to rapidly test large numbers of samples, and low risk of contamination.<sup>23–25</sup> Thus, TaqMan real-time PCR has been recommended as the most effective test for diagnosing FeLV infection.<sup>9</sup> The PCR used in the present study was designed to amplify all 3 subtypes of FeLV (FeV-A, FeLV-B, and FeLV-C), but not endogenous FeLV-like sequences.<sup>7</sup>

A second criterion for valid test evaluation studies is that samples should be representative of patients on which the test system will be applied in practice.<sup>10</sup> In our study, samples were collected from patients in the hospital population, including both healthy and diseased cats, for which clinicians had requested FIV and FeLV tests. The prevalence of FIV and FeLV infection in the study population, therefore, was representative of that in the population examined at the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University. Thus, this represents the true situation in which clinicians will use this test. Previous studies have shown that the prevalence of FIV is highly variable and depends on the age, gender, lifestyle, physical condition, and most importantly geographic location, ranging

from < 1% in healthy cats in North America to 44% in sick cats in Japan.<sup>14</sup> The prevalence of FeLV infection has decreased during the last 20 years, presumably as a result of implementation of testing programs and development of effective vaccines.<sup>26,27</sup> In a recent retrospective study of 3780 client-owned cats in southern Germany, the prevalence of FIV was 2.5% and that of FeLV was 2.9%.<sup>28,29</sup> The higher prevalence for FeLV infection in our study may be explained by the high number of cases referred to the Veterinary Teaching Hospital with unclear diseases. Therefore, the number of FeLV-positive cats may be higher than would be expected in primary veterinary practices.

Because of the low prevalence of FIV and FeLV infection, additional positive samples would have strengthened confidence in the sensitivity estimates, but were not possible within the present study design. Although the low number of true positive cats is a limitation of the study, it mirrors the epidemiological situation in which the test systems are used in practice.

Compared with the results of previous studies,<sup>19,20</sup> both in-clinic test systems performed well and had comparably high sensitivity, specificity, and predictive values for diagnosing FIV. The low sensitivity of both in-clinic tests for diagnosing FeLV may be explained by the fact that the antigen tests and PCR detect virus in different forms and in different compartments. FeLV antigen is present during viremia, which occurs in the early phase of infection with or without bone marrow infection. In many cats, however, viremia is transient and thus, antigen tests become negative. However, latent FeLV infection may be present that is characterized by the persistence of viral nucleic acids in the bone marrow of nonviremic cats. The PCR test used in this study also may detect latent infections due to its ability to detect proviral DNA with high sensitivity. In 1 study, 10.0% of PCR-positive cats were antigen-negative.<sup>7</sup> The fact that 6 of the antigen-negative PCR-positive cats tested negative in both antigen tests makes it likely that these cats are actually true antigen-negative cats with latent infection.

It can be concluded that the performance of the Anigen Rapid Test was very good and similar to that of the Snap Kombi Plus Test; both tests can be recommended for use in veterinary practice. However, in areas with a lower prevalence of infection and because a positive test result may have serious consequences for the cat, all positive test results should be interpreted carefully. According to the advisory panel of the American Association of Feline Practitioners on feline retrovirus infections, positive results should be confirmed by a second, preferably more sensitive test, especially in clinically healthy cats.

### Acknowledgments

C. Sand and K. Hartmann received research funding from Animal Genetics, Kyunggi-do, Korea, for this study.

### References

1. Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*. 1987;235:790-793.
2. Hartmann K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet J*. 1998;155:123-137.
3. Levy J, Richards J, Edwards D, et al. Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management. *J Feline Med Surg*. 2003;3-10.
4. Levy J, Richards J, Edwards D, et al. Feline retrovirus testing and management. *Compend Cont Educ Pract Vet*. 2001;23:652-657.
5. Barr MC. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1996;11:144-153.
6. Egberink HF, Lutz H, Horzinek MC. Use of western blot and radioimmunoprecipitation for diagnosis of feline leukemia and feline immunodeficiency virus infections. *J Am Vet Med Assoc*. 1991;199:1339-1342.
7. Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, et al. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J Gen Virol*. 2001;82:1589-1596.
8. Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*. 2005;332:272-283.
9. Tandon R, Cattori V, Gomes-Keller MA, et al. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2005;130:124-132.
10. Polzin DJ, Lund E, Walter P, Klausner J. From journal to medicine: evidence bases medicine. In: Bonagura JD, ed: *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1999:2-8.
11. Lutz H, Arnold P, Hubscher U, et al. Specificity assessment of feline T-lymphotropic lentivirus serology. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1988;35:773-778.
12. Hosie MJ, Jarrett O. Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus. *AIDS*. 1990;4:215-220.
13. Barr MC, Pough MB, Jacobson RH, Scott FW. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. *J Am Vet Med Assoc*. 1991;199:1377-1381.

14. Reid RW, Barr MC, Scott FW. Retrospective serologic survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELISA and IFA techniques. *Cornell Vet.* 1992;82:359–369.
15. Levy JK, Crawford PC, Slater MR. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;225:1558–1561.
16. Crawford PC, Slater MR, Levy JK. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226:1503–1507.
17. Hardy WD Jr, Hirshaut Y, Hess P. Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. *Bibl Haematol.* 1973;39:778–799.
18. Jarrett O, Golder MC, Weijer K. A comparison of three methods of feline leukaemia virus diagnosis. *Vet Rec.* 1982;110:325–328.
19. Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, et al. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J Feline Med Surg.* 2007;9:439–445.
20. Hartmann K, Werner RM, Egberink H, Jarrett O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Vet Rec.* 2001;149:317–320.
21. Jarrett O. Detection of FeLV antigen. *Vet Rec.* 1995;137:127.
22. Floyd K, Suter PF, Lutz H. Granules of blood eosinophils are stained directly by anti-immunoglobulin fluorescein isothiocyanate conjugates. *Am J Vet Res.* 1983;44:2060–2063.
23. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6:995–1001.
24. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986–994.
25. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357–362.
26. Levy JK, Crawford PC. Feline leukemia virus. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* Philadelphia, PA: WB Saunders Co.; 2005:653–659.
27. Cotter SM. Feline viral neoplasia. In: Greene CE, ed. *Infectious Diseases of Dog and Cat.* Philadelphia, PA: WB Saunders Co.; 1998:71–84.
28. Levy JK, Scott HM, Lachtara JL, Crawford PC. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;228:371–376.
29. Gleich S, Hartmann K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J Vet Intern Med.* 2009;23:552–558.

## 2. Studie 2

### **Association of feline immunodeficiency provirus and virus load with the health status of naturally FIV-infected cats**

#### **Introduction**

Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic cats results in an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 1988), similar to the syndrome caused by human immunodeficiency virus (HIV) infection in humans (BENDINELLI et al., 1995; VAHLENKAMP et al., 1995). Both FIV and HIV infections are characterized by progressive CD4<sup>+</sup> lymphocyte loss and lymphoid depletion (LEVY, 1993; PEDERSEN, 1993), immunologic abnormalities (MIEDEMA et al., 1988; ACKLEY et al., 1990; TORTEN et al., 1991), and the susceptibility for opportunistic infections (PEDERSEN et al., 1987; PEDERSEN et al., 1989; ENGLISH et al., 1994). Five different clinical stages (acute phase (AP), asymptomatic carrier (AC), persistent generalized lymphadenopathy, AIDS-related complex (ARC), and AIDS stage (PEDERSEN et al., 1989; ISHIDA & TOMODA, 1990)), modified from those used in HIV infection, have been proposed for the course of infection in cats naturally infected with FIV (PEDERSEN et al., 1989; ISHIDA & TOMODA, 1990). Criteria for classifying cats into these clinical stages are mainly based on clinical signs. However, staging seems to be very unreliable in naturally infected cats.

Determination of retroviral loads is an important tool to investigate the success of vaccination or therapeutic trials. Since the development of TaqMan real-time PCR, it has become possible to quantify provirus and virus loads fast, easy, and with a high reproducibility and sensitivity (KLEIN et al., 1999; LEUTENEGGER et al., 1999; KLEIN et al., 2001).

Virus RNA levels have been shown to correlate with disease stages in HIV and experimental FIV infection (PIATAK et al., 1993b; PIATAK et al., 1993a; PIATAK et al., 1993c; DIEHL et al., 1995). Also an increase of virus RNA levels in the AP stage and a decrease in the following AC stage were implied by Diehl and co-writers (1995) (DIEHL et al., 1995) in experimentally infected cats.

Additionally, the increase of 1 to 2 logs of plasma RNA concentration in cats with rapidly progressive FIV disease was established (DIEHL et al., 1996; GOTO et al., 2002).

So far, some studies have monitored plasma virus RNA concentrations in experimental as well as naturally FIV-infected cats. However, there is no study that examined the correlation between provirus and virus load and the quality of life in these cats.

The aim of this study was to investigate the correlation between provirus and virus loads of naturally FIV-infected cats using the TaqMan PCR method with the cats' quality of life and health status, evaluated with the modified Karnofsky's score.

## **Materials and Methods**

### **Cats included**

Between January 1998 to October 2008, 99 cats that were tested FIV-positive were eligible to enter the study. All cats were presented to the Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany. Inclusion criteria to enter the study were the definitive diagnosis of FIV infection using the SNAP<sup>®</sup> Combo Plus FeLV Antigen/FIV Antibody test (IDEXX GmbH, Portland, ME<sup>1</sup>). Each positive test result was confirmed by a second testing before the cats were eligible to enter the study. Cats were excluded, if they were younger than six months, because passively acquired maternal antibodies could have cause a positive result. Further exclusion criteria were history of import from the United States to Germany and an unknown FIV vaccination status against FIV infection. Of the 99 eligible cats, 50 were excluded due to (1) not measurable provirus or virus load or (2) unwillingness to answer the detailed questionnaire.

### **Evaluation of the health status**

The health status of the cats was evaluated by the Karnofsky's score modified for the cat (HARTMANN & KUFFER, 1998). The Karnofsky's score was determined on the same day when the blood samples for PCR were drawn. The

score was originally developed by David A. Karnofsky in 1948 to describe the quality of life in lung cancer patients. It is used for HIV-infected patients (FISCHL et al., 1990), e.g., to compare the efficiency of different antiviral treatments in improving the quality of life. The modified index for cats enables the investigator to judge the quality of life and health status in cats by means of a score from 100% (absolutely healthy and happy) to 0% (dead) (table 1). The modified Karnofsky's score is calculated in two parts. The first part consists of a questionnaire, which has to be answered by the cat owners. The owners have to compare the actual behaviour of the cat to the behaviour before they noticed any signs of disease and have to judge the difference. The second part represents the general condition determined by the veterinarian.

### **TaqMan real-time PCR for measuring the amount of DNA in samples**

From each of the 49 cats, plasma (to detect viral RNA) and whole blood (to detect proviral DNA) samples were collected. DNA and RNA isolation was performed according to the manufacturers' instructions, using QIAmp<sup>®</sup> DNeasy Mini Kit<sup>a</sup> and RNA isolation with a QIAmp<sup>®</sup> RNA Viral Kit<sup>a</sup>, respectively.

Three different real-time PCR assays were used. The primer and probe sequences were designed with Primer Express software<sup>b</sup>. It is known that virus isolates from naturally infected cats show multiple sequence variations in the *env* and *gag* genes (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996a; STEINRIGL et al., 2009). Consequently probe and primers were designed to have a high cross reactivity between *gag* sequences from different FIV subtypes and the three different probes were used (FIV 1416p, FIV 1010p, and FIV 1372p) (table 2). Each of the probes was combined with a different forward and reverse primer. If quantification with probe FIV 1416p probe was not possible, FIV1010p or FIV1372p was used.

Probe FIV 1010p assay was designed to be 100% homologous to the clade A FIV isolates Petaluma (GenBank accession number M25381), Utrecht 113 (X68019), Zurich 1 (X57002), and San Diego (M36968). This probe detected 13/20 subtypes A, 10/12 subtypes B and 0/5 subtypes D (LEUTENEGGER et al., 1999). Probe FIV 1372p was designed to detect FIV subtype B. The third FIV assay (1416p) was designed to detect a broad range of Austrian and German FIV isolates. All

probes were phosphorylated at the 3'-OH to prevent elongation during PCR. All oligonucleotids were purified during high performance liquid chromatography and obtained from Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). 6-carboxy-fluorescein (FAM) served as a reporter fluorochrome and 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) as a quencher. As plasmid standard, the plasmid pBSCompZ2 (ALLENSPACH et al., 1996) and as a genomic DNA standard, DNA from CrFK cells, stably infected with different FIV isolates, were used as described previously by Klein *et al* (KLEIN et al., 1999).

Twenty-five µl PCR reaction mixture contained 10mM Tris Buffer (pH 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µM dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 300 mM of the forward and reverse primer, 200 mM rhodamine (ROX), 1.25 U of Taq DNA polymerase per reaction. After the initial denaturation for 2 min at 95 °C, amplification was performed with 45 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C.

For measuring the RNA amount in the samples, RNA was firstly transcribed into cDNA. For this step, the reaction mixture contained additionally 2.5 U AMV reverse transcriptase. After the transcription from RNA to DNA the same PCR protocol for provirus and virus load was used.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with SPSS, Version 16.0. (SPSS Inc., Chicago, IL). Logit transformation was utilized for the Karnofsky's score and ln transformation for provirus and virus load to obtain normally distributed data. Correlation between the transformed data was compared using the Pearsons' product-moment correlation. P values of < 0.05 were considered significant.

### **Results**

Ninety-nine FIV-positive cats were identified eligible to enter the study. Of these 99 cats, 50 were excluded due non-measurable provirus and virus load in 27 cats or the unwillingness of the owner to participate in the study (23 cats).

The mean Karnofsky's score evaluated at time of presentation in this study was 87.3%. Lowest measured value was 50% the highest 99%. Karnofsky's score data

were not normal distributed, and 69% (34/49) of cats had a Karnofsky's score between 90 and 100% with normal behaviour and with no or only minor signs of disease (figure 1).

Provirus load detection implied that mean of 2.7% of PBL were infected (range 0.005% - 57.8%). Mean virus load in this study was 88,588 virions/ml (range 0.01 - 3459366.59 virions/ml). Furthermore it could be confirmed that virus load levels in cats with a Karnofsky's score higher than 95% were significantly lower than those in cats with a Karnofsky's score lower than 80%. Provirus as well as virus load indicated a significant (provirus load:  $p = 0.036$ ; virus load:  $p = 0.023$ ), but only weak correlation with the Karnofsky's score (logit Karnofsky and ln provirus load:  $-0.301$ ; ln virus load:  $-0.324$ ) (figure 2 and 3).

## Discussion

Previous studies showed that that the kinetics of plasma virus load during FIV infection resembled those during HIV infection (PIATAK et al., 1993a; DIEHL et al., 1996; GOTO et al., 2002; LEVY, 2006). Virus load was suggested to be a prognostic marker in both, HIV and FIV infection, for the progression of infection. HIV and experimental FIV infections show characteristic virus levels, a peak during the phase of acute infection followed by a decline in the asymptomatic phase, during which virus loads remains stable (DIEHL et al., 1995). In human medicine, plasma RNA load is used as the main prognostic factor of progression to AIDS and death in HIV-infected patients (JURRIAANS et al., 1994; MELLORS et al., 1995; MELLORS et al., 1996; DE WOLF et al., 1997), and changes in the HIV RNA load are more predictive of disease progression than changes in DNA loads (FISCUS et al., 1998; LATHEY et al., 1998). Thus, plasma virus RNA concentration represents a useful marker for clinical staging (PIATAK et al., 1993b; MELLORS et al., 1996).

The objective of the present study was to show that cats with a low Karnofsky's score and thus, bad health status, have a high provirus and virus load and vice versa. Indeed, an association between ln provirus as well as ln virus load and the Karnofsky's score could be confirmed (figure 2 and 3). Mean values of provirus and virus load were lowest in cats with a Karnofsky's score  $> 95\%$ , and the highest mean virus levels were measured in cats with a Karnofsky's score  $< 80\%$ .

This association was statistically significant (provirus load:  $p = 0.036$ ; virus load:  $p = 0.023$ ), but the correlation was only weak (logit Karnofsky and ln provirus load:  $-0.301$ ; ln virus load:  $-0.324$ ). In contrast to human medicine, provirus load seems to be slightly more predictive. Provirus and virus levels in field cats are influenced by many more environmental factors (e.g. secondary infections, stress) than they are in experimentally infected cats. Experimentally infected cats mostly live under standardized conditions, e.g. same surrounding, infection with the same subtype at the same time point and no secondary infections.

The group of cats with a Karnofsky's score between 90 and 100%, which are in the asymptomatic phase of FIV infection, established provirus levels from 0.005 to 7.58 virions/ml and virus levels from 0.01 to 26263.39% infected PBL. The range of both, the investigated provirus and virus levels, was surprisingly wide. Previous studies in experimentally infected cats typically demonstrated a decline and then stable virus levels after the peak of the acute phase of infection (VAHLENKAMP et al., 1995). These studies usually examined virus levels in acute infection. In this study the diagnosis of FIV infection was an „incidental“ finding during a routine check up in the majority of the cats included in this study and time point of infection was unknown. Consequently, it is most likely that most of the cats were already infected for a quite long time period. Virus levels obviously do not remain stable during the whole asymptomatic phase in cats in naturally infected cats, and provirus and virus kinetics can not be compared to experimentally infected animals. Follow-up investigations during the asymptomatic phase in naturally infected cats in different environments would be necessary to learn more about the viral kinetics during this phase of infection.

In human and veterinary medicine several scores are applied to classify the quality of life. The judgement of the well-being in cats can be extremely difficult for veterinarians, particularly, if cats are hospitalized in an unknown environment. In veterinary medicine, it is eminently important to use scores, for obtaining objective data, because patients are not able to articulate their complaints and feelings. The Karnofsky's score is an index which is based on questions concerning eating, playing, sleeping, and social behaviour, as well on the general condition of the cat (table 1). In human medicine, the Karnofsky's score was established as an easy and sufficiently reliable scoring system in all stages of HIV disease (FANTONI et al., 1999). The usefulness of the modified Karnofsky's

score for cats was validated in a study in naturally FIV-infected cats by Hartmann and Kuffer (1998) (HARTMANN & KUFFER, 1998). For all cats included in the present study, the Karnofsky's score was determined, and the mean of the Karnofsky's score was surprisingly high (87.4%). Most of the cats (69%) were asymptomatic and had a high Karnofsky's score between 90 and 100% at time of presentation. In fact, this unbalanced distribution of the Karnofsky's score is a limitation of the study, but mirrors the course of FIV infection and lower pathogenicity of FIV when compared to HIV, and the status, cats are presented with at veterinarians in a country in which cats commonly received good veterinary care. The long survival time (ADDIE et al., 2000) and the long asymptomatic phase in FIV infection may lead to the high percentage of asymptomatic cats in the examined population. Indeed, FIV-infected cats can live many years in good clinical condition and may die at an older ages from diseases unrelated with their underlying FIV infection. If FIV is present in a stable population, the number of infected and non-infected cats remains unchanged (COURCHAMP et al., 1995; COURCHAMP et al., 1997), and FIV does not deplete the population. Field investigations verified, that FIV-positive cats had a median survival time of 4.9 years after the diagnosis (compared to 6.0 years for the control cats) (LEVY, 2006).

Fifty cats were excluded from the study, 27 of these due to a non-measurable provirus and virus load. One possible explanation is the extensive variation among parts of the *env* and *gag* gene of FIV. This high mutation rate results in sequence differences in these genes up to 26% (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996a), especially in Munich, Germany, where the widest representation of subtypes, A, B and C, was found in the past (BACHMANN et al., 1997). Consequently, primer and probes selection is difficult for testing FIV field isolates from different geographical areas. PCR results are highly influenced by variations in target gene sequences (KLEIN et al., 1999; KLEIN et al., 2001). To overcome this problem three different probes (FIV 1416p, FIV 1010p, and FIV 1372p) were used. These TaqMan probes and primers are designed to be cross reactive with FIV subtypes, clades A and B, representing the majority of isolates in Europe. Still the isolates of 27 of 99 cats could not be detected by PCR. These cats were repeatedly positive by antibody detection and vaccination against FIV and maternal antibodies could be excluded. For that

reason, it is most likely that the PCR results of these 27 cats are false negative. Mismatches of probe and primers to target gene sequences or viral load levels below the limit of detection are the most common reasons for false negative results and differences in PCR efficiency (KLEIN et al., 1999). For exact quantitative determination of provirus and virus load of a specific subtype, probe and primer have to be 100% complementary to the target strain. Using degenerative primers would be a possibility to increase the number of measurable provirus and virus loads, but was not arranged in the present study. Crawford *et al* (2005) compared commercially available PCR assays, conventional as well as real-time PCR. All these PCR assays are offered to veterinary practitioners in North America in commercial laboratories. However, results showed significant variations in their diagnostic accuracy (CRAWFORD et al., 2005). Sensitivity ranged from 41 to 93% and specificity from 81 to 100% for cats not vaccinated against FIV. Although PCR assays have been promoted as a potential solution for confirming the true FIV status of cats (UHL et al., 2002; CONNELL, 2003; STEINRIGL & KLEIN, 2003), especially in countries where FIV vaccines are used, the drawbacks of this technique needs to be considered. Diagnostic PCR assays are mightily specific (LEUTENEGGER et al., 1999). However, this high specificity can lead to false negative results, especially when diagnosing five different subtypes with a high intrinsic mutation rate.

The advantage of this study when compared to previous studies on this subject is the high number of naturally FIV-infected cats included and the comparison between the associations of provirus as well as virus load to a fairly objective judgement of the quality of life, the Karnofsky's score. In conclusion, provirus as well as virus load showed a significant but only weak correlation to the Karnofsky's score. These results suggest that DNA and RNA levels are highly variable in the asymptomatic phase in naturally infected cats, and that, other than in HIV-infected humans, clinical status is not predictive of virus loads. Thus, neither provirus nor virus load are good predictors of the health status in naturally FIV-infected cats

**Table 1:** Karnofsky's score modified for cats (HARTMANN & KUFFER, 1998)

<b>100%</b>	normal behaviour, no complaints, no evidence of disease
<b>90%</b>	minor signs of disease, still normal eating, resting, and social behaviour
<b>80%</b>	some signs of symptoms of disease, eating behaviour not influenced, social behaviour slightly reduced, normal activities like playing and grooming only with efforts, increased sleeping time
<b>70%</b>	playing, comfort, and social behaviour reduced, more lethargy than normal, less appetite
<b>60%</b>	requiring sometimes assistance in cleaning and special feeding care
<b>50%</b>	requiring all the time assistance in cleaning and feeding, and sometimes medical care
<b>40%</b>	requiring assistance for everything and depending on medical care, wild roaming cats without human help in acute danger to life
<b>30%</b>	severely disabled, taking no food, appropriate medical care difficult at home, hospitalisation indicated
<b>20%</b>	very sick, life not possible without hospitalisation, active supportive treatment necessary for staying
<b>10%</b>	danger to life, fatal process
<b>0%</b>	dead

**Table 2:** FIV primers and probes used in the FIV fluorogenic TaqMan real-time PCR<sup>a</sup> to determine provirus and virus load

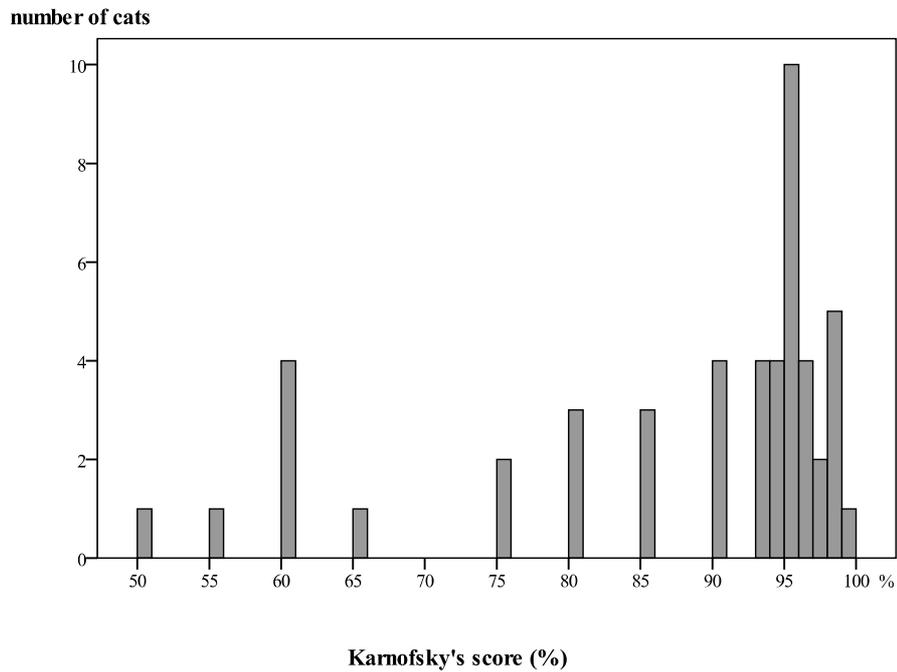
probe or primer	sequence
Probe FIV1416p	<sup>b</sup> TGC AGT GTA GAG CAT GGT ATC TTG AGG CA <sup>c</sup>
Forward Primer FIV 1360f	GCA GAA GCA AGA TTT GCA CCA
Reverse Primer FIV1437r	TAT GGC CCG CAA TTT TCC T
Probe FIV 1010p	<sup>b</sup> TAT GCC TGT GGA GGG CCT TCC T <sup>c</sup>
Forward primer FIV 0771f	AGA ACC TGG TGA TAT ACC AGA GAC
Reverse Primer FIV 1081r	TGG GGT CAA GTG CTA CAT ATT G-3'
Probe FIV 1372p	<sup>b</sup> TTT GCA CCA GCC AGA ATG CAG TGT TAG <sup>c</sup>
Forward Primer FIV 1280f	ATC CTC CTG TG GGC CTA GAC
Reverse Primer FIV 1426r	ACT TTC CTA ATG CTT CA GGT ACC

<sup>a</sup> Sequences of probe and primers are given in 5'-3' orientation

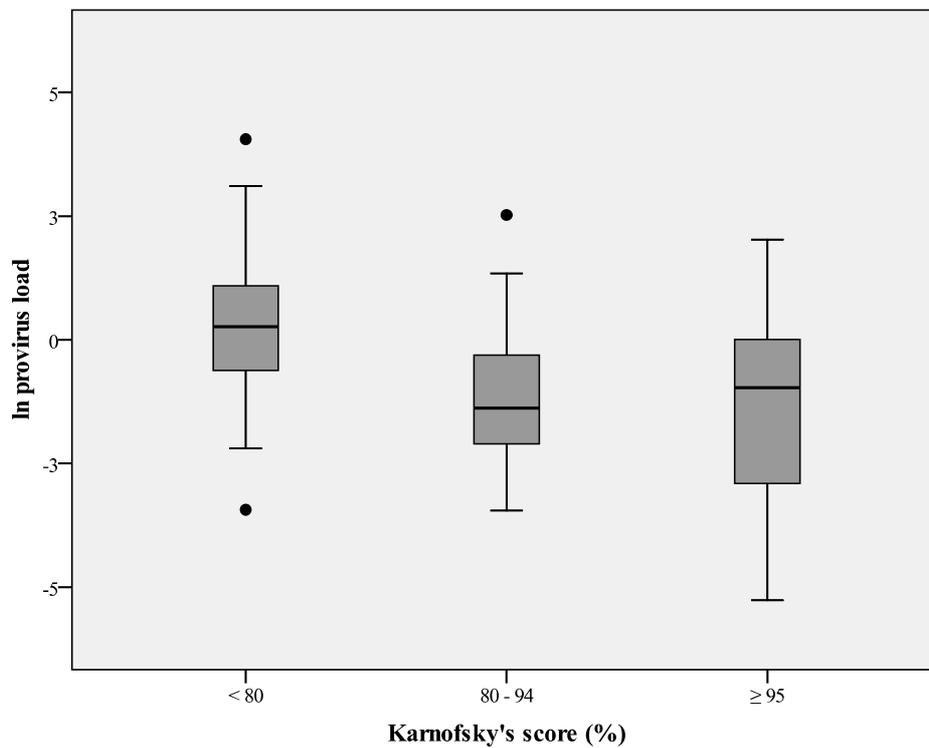
<sup>b</sup> Nucleotide to which the reporter FAM is coupled

<sup>c</sup> Nucleotide to which the quencher TAMRA is coupled

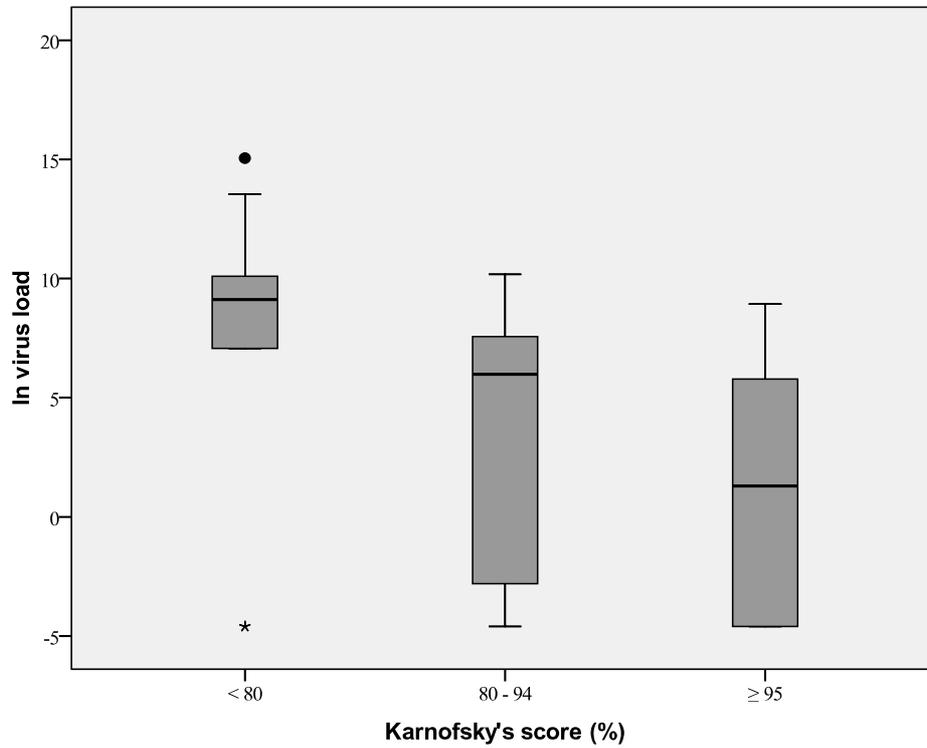
**Figure 1:** Frequency distribution of Karnofsky's score data in the examined cat population (n = 49)



**Figure 2:** Association between ln provirus load and Karnofsky's score (classified into 3 groups: < 80% (n = 9), 80 - 94% (n = 18),  $\geq 95%$  (n = 22 cats))



**Figure 3:** Association between ln virus load and Karnofsky's score (classified in 3 groups: < 80% (n = 9), 80 - 94% (n = 18),  $\geq$  95% (n = 22 cats)), (ln virus load significantly higher in cats with a Karnofsky's score of < 80% than the ln virus load of cats with a Karnofsky's score of  $\geq$  95% (p=0.002))



## IV. DISKUSSION

Die korrekte Diagnose der FIV- und FeLV-Infektion spielt eine bedeutende Rolle. Gelingt es nicht, FIV-infizierte Katzen in einer Katzenpopulation zu identifizieren, besteht für andere Katzen die Gefahr einer Infektion. Die Identifizierung und Separierung von FIV-infizierten Katzen sind die wichtigsten Schritte, um Neuinfektionen zu verhindern. Dafür stehen eine Vielzahl von direkten und indirekten Nachweismethoden zur Verfügung. Die American Association of feline practitioners' (AAFP) empfiehlt den Einsatz von ELISA und Immunochromatografietests als Routinenachweis von Antikörpern gegen FIV und FeLV-Antigen (LEVY et al., 2008a).

Seit einigen Jahren sind eine Vielzahl dieser ELISA und Immunochromatografietests für den Praxisgebrauch erhältlich. Die Vor- und Nachteile der bisher verfügbaren Tests wurden bereits in früheren Testvergleichsstudien verglichen (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007). Seit kurzem ist ein neues FIV-/FeLV-Testsystem auf dem Markt. Ziel der ersten Studie im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es, die Vor- und Nachteile dieses neuen Tests mit dem bisherigen Marktführer zu vergleichen. Dafür wurden in der untersuchten Population von 300 Katzen die Prävalenz der FIV- und FeLV-Infektion, die Sensitivität, die Spezifität sowie der positive und negative prädiktive Wert beider Testsysteme bestimmt.

Die untersuchte Population bestand aus 300 unselektierten Katzen aus dem süddeutschen Raum. Bei neun von 300 Katzen wurden Antikörper gegen FIV nachgewiesen. Das entspricht einer Prävalenz von 3,0 %. Annähernd ähnliche Prävalenzen wurden auch in vorherigen Studien ermittelt, die im gleichen Gebiet stattgefunden haben. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von GLEICH und Mitarbeitern (2009) lag die FIV-Prävalenz bei 3,2 % (GLEICH & HARTMANN, 2009), 1996 bei 2,3 % (WILHELM, 1996), 1994 bei 2,2 % (HARTMANN et al., 1994) und 1991 bei 2,3 % (HARTMANN & HINZE, 1991). Diese Studien zeigen, dass die FIV-Prävalenz im untersuchten Gebiet annähernd konstant geblieben ist, obwohl in den letzten Jahren eine zunehmende Aufklärung der Tierbesitzer und Beratung der Tierärzte stattgefunden hat. CHOURCHOUMP und Mitarbeiter (1995) beschreiben, dass die Anzahl an FIV-infizierten Katzen in einer Population

in der FIV endemisch ist konstant bleibt und die Population nicht dezimiert wird (COURCHAMP et al., 1995). Am häufigsten sind ranghöhere Kater infiziert, die bei Kämpfen FIV übertragen. Die rangniederen Tiere spielen bei der Übertragung keine bedeutende Rolle (COURCHAMP et al., 2000). Gründe für die gleichbleibende Prävalenz könnten in der geringen Pathogenität des Virus und der niedrigen Übertragungsrate unter sozialen Katzen liegen (LUTZ et al., 2009).

Die FeLV-Infektion war in der untersuchten Population bei 15 von 300 Katzen vorhanden. Das entspricht einer Prävalenz von 5,0 %. Diese Prävalenz liegt über der kürzlich von GLEICH und Mitarbeitern (2009) ermittelten Prävalenz von 3,6 % (GLEICH et al., 2009). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in der untersuchten Katzenpopulation eine große Anzahl an Katzen mit unklarer Erkrankung, die an die Medizinische Kleintierklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München überwiesen wurden waren, mit eingeschlossen waren. Die häufigsten Folgen einer persistierenden FeLV-Infektion sind Immunsuppression (PERRYMAN et al., 1972), Anämie und Lymphome (HARDY et al., 1976; KOCIBA, 1986). Diese Symptome sind unspezifisch und können mit einer Vielzahl von Erkrankungen einhergehen. Die Prävalenz kann bei kranken Katzen deutlich höher sein und bis zu 25 % reichen (HARTMANN & HEIN, 2008).

Infektionen mit FeLV treten weltweit auf. Dabei ist die Prävalenz abhängig von der Dichte der Katzenpopulation und lokalen und geografischen Unterschieden. In einigen europäischen Ländern, in den USA und in Kanada beträgt die Prävalenz bei einzeln gehaltenen Katzen weniger als 1 %. In Mehrkatzenhaushalten, in denen keine Präventivmaßnahmen (wie Screeningtests oder Impfung) vorgenommen werden, kann die Prävalenz bis über 20 % ansteigen (HOSIE et al., 1989; LEVY et al., 2006). In den letzten 25 Jahren ist die Prävalenz der FeLV durch den Einsatz von FeLV-Tests und Impfstoffen deutlich zurückgegangen (LUTZ et al., 2009).

Als Referenzmethode zum Nachweis von FIV-Antikörpern steht Western Blotting zur Verfügung. Heutzutage gilt der Western Blot als Goldstandard (LUTZ et al., 1988; HOSIE & JARRETT, 1990; EGBERINK et al., 1992) und wurde aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit als Referenzmethode ausgewählt. Als indirektes Nachweisverfahren ermöglicht der Western Blot den Nachweis von spezifischen FIV-Antikörpern gegen Hauptinnenkörperproteine und gegen das Transmembranprotein *gp40* (O'CONNOR et al., 1989; CALZOLARI et al., 1995).

Durchgeführt wurde das von EGBERINK und Mitarbeitern (1991) beschriebene Western Blot Protokoll (EGBERINK et al., 1991). Zum Nachweis von FIV-Antikörpern wurden vier FIV-Proteine eingesetzt: ein *gag*-Protein (*p24*), ein *env*-Protein (*KSU<sub>3</sub>*), ein Transmembranprotein (*GTM<sub>2</sub>*) und ein Hüllprotein (*CA*). Eine Probe galt als positiv, wenn mindestens zwei oder mehr Banden auf Höhe der beschriebenen Proteine sichtbar waren. Problematisch ist, dass die Anzahl der Banden, die für ein positives Ergebnis vorhanden sein müssen, von verschiedenen Autoren unterschiedlich beschrieben werden. HOSIE und JARRET (1991) erachten eine Probe als positiv, wenn mindestens drei Banden gegen Core-Proteine gebildet werden (Hosie and Jarret 1991). BARR und REID (1992) betrachten hingegen die Anwesenheit von zwei virusspezifischen Banden als ausreichend für den Nachweis einer FIV-positiven Probe (BARR et al., 1991; REID et al., 1992).

Der Nachweis von Antikörpern gegen alle Oberflächenantigene ist mittels Western Blot nur eingeschränkt möglich. Höher molekulare Hüllproteine (*gp95*, *gp120* und *gp135*) werden bei der Aufreinigung und Proteindenaturierung häufig beschädigt. Anschließend können die Proteine nur unvollständig auf die Nitrozellulosemembran übertragen werden (EGBERINK et al., 1991) (PEDERSEN & BARLOUGH, 1991). Bilden Katzen ausschließlich Antikörper gegen diese Hüllproteine, können falsch negative Ergebnisse im Western Blot auftreten (HOSIE et al., 1989; EGBERINK et al., 1991).

Die Wahl des Western Blots als Referenzmethode für die Testvergleichsstudie, erwies sich als geeignet. Beim Western Blot handelt es sich wie bei den zu überprüfenden ELISA und Immunochromatografietests um ein indirektes Nachweisverfahren für FIV-Antikörper. Die Banden auf den Western-Blot-Streifen waren deutlich zu erkennen, gut abgrenzbar und die Ergebnisse zeigten eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den zu untersuchenden Testsystemen.

Für die FeLV-Diagnostik existiert bisher kein einheitlich akzeptierter Goldstandard. In vorherigen Testvergleichsstudien wurde hauptsächlich die Virusisolation als Referenztest zum Nachweis der FeLV-Infektion eingesetzt (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007). Dieses Verfahren ermöglicht den Nachweis von replikationsfähigem Virus, im Gegensatz zu dem in dieser Studie verglichenen ELISA- und Immunochromatografietest, die FeLV-

Antigen nachweisen. Im Verlauf der FeLV-Infektion ist nicht zu jedem Zeitpunkt bei Anwesenheit von Virus auch immer Antigen vorhanden. Dies ist jedoch bei der atypischen Form der FeLV-Infektion möglich. Es handelt sich hierbei um eine sequestrierte Form der Infektion, bei der es zur lokalen Vermehrung des Virus, z. B. in der Blase, Milchdrüse oder im Auge, ohne Beteiligung des Knochenmarks kommt (HOOVER & MULLINS, 1991).

Die Virusisolierung hat Nachteile: mangelhafte Lagerungs- und Transportbedingungen der Proben oder technische Fehler können die vorhandene Virusmenge in den Proben reduzieren (JARRETT et al., 1982b). Dadurch werden tatsächlich positive Proben in der Virusisolierung als negativ erachtet und die ELISA-Ergebnisse folglich als falsch positiv bewertet.

HARTMANN und Mitarbeiter wählten 2001 und 2007 die Virusisolation als Referenztest (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007). In beiden Studien wurden deutlich höhere Werte für Sensitivität beschrieben als in der vorliegenden Studie, in der die real-time PCR als Referenztest eingesetzt wurde. Der ELISA- und der Immunochromatografie-Test weisen Antigen nach und die PCR Virus-DNA. Das Verfahren der real-time PCR ermöglicht es auch latente FeLV-Infektionen nachzuweisen, die durch einen FeLV-Antigen-Test nicht erkannt werden können. HOFMANN-LEHMANN und Mitarbeiter (2001) beschrieben, dass in einer untersuchten Population 10 % der *p27*-positiven Katzen alle PCR-negativ waren (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Die Tatsache, dass sechs der Antigen-negativen PCR-positiven Katzen in beiden Antigen-Tests negativ getestet wurden, macht es sehr wahrscheinlich, dass diese sechs Katzen tatsächlich Antigen-negativ sind, jedoch latent FeLV-infiziert sind. Es handelt sich daher nicht um eine wirklich „falsch“ negative Ergebnisse.

In der vorliegenden Studie wurde die TaqMan real-time PCR als Referenzmethode ausgewählt. Dieses Verfahren ermöglicht den Nachweis von Provirus in peripheren Blutzellen und ist sensitiver als die Virusisolation in der Frühphase der FeLV-Infektion (TANDON et al., 2005).

Bei dem in der vorliegenden Studie untersuchten Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test handelt es sich um einen ELISA-ähnlichen Immunochromatografietest. Dieser Test wurde mit SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Antikörpertest, einem ELISA, im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität sowie positiven und

negativen prädiktiven Werten verglichen. ELISA und Immunochromatografietests beruhen auf dem Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen FIV und FeLV-Antigen. Der SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test weist Antikörper gegen *p24* und *gp40* nach. Der Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test weist ausschließlich Antikörper gegen *gp40* nach. Beide Tests weisen FeLV-p27-Antigen nach.

Immunochromatografie-Schnelltests besitzen gegenüber den ELISA-Tests den Vorteil, dass sie sehr einfach zu handhaben sind und in ihrer Durchführung wenige Fehlerquellen beinhalten. Die Farbentwicklung der Banden entsteht durch Verdickung von Gold- und Latexpartikeln, so dass eine sekundäre enzymkatalysierte Reaktion nicht mehr notwendig ist und die Testsysteme nicht temperaturempfindlich sind. Gegenüber älteren ELISA-Testsystemen sind die Immunochromatografietests im Vorteil, da sie Antikörper gegen Hüllproteine, meist *gp40*, nachweisen, die von manchen Katzen ausschließlich gebildet werden. Testsysteme, die einzig auf dem Nachweis von Antikörpern gegen *p24* beruhen, können dadurch zu falsch negativen Ergebnissen führen (EGBERINK et al., 1992; FURUYA et al., 1992).

Für beide Testsysteme wurde die Sensitivität, Spezifität sowie der positive und negative prädiktive Werte für den Nachweis der FIV-Infektion ermittelt. Bei einem der Testsysteme, dem Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test, trat ein falsch-positives Testergebnis beim Nachweis von FIV-Antikörpern auf. Folglich wurden für beide Testsysteme hohe Werte für die Spezifität ermittelt (Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test: 99,7 %, SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test: 100,0 %). Aufgrund der niedrigen Prävalenz der FIV-Infektion wurde eine hohe Spezifität ermittelt. Ein negativer Antikörpertest schließt daher eine FIV-Infektion weitgehend aus, da auch der negative prädiktive Wert aufgrund der niedrigen Prävalenz sehr hoch ist. Vergleichbare Werte wurden in vorherigen Studien erreicht (BARR et al., 1991; REID et al., 1991; HARTMANN et al., 1994; HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007).

Falsch positive Resultate bei FIV-ELISA-Testsystemen werden durch Handhabungs- und Waschfehler als auch Qualitätsmängel hervorgerufen. ELISA-Tests, die kein rekombinantes Antigen verwenden, setzen ein Antigen ein, das von FIV-infizierten Zellen in Zellkultur produziert wird. Das gewonnene Antigen wird mittels Dichtegradient aufgereinigt und ist häufig mit zellulären Bestandteilen der

Zellkultur (z. B. CrFK-Zellen) oder mit Komponenten des fötalen Kälberserums, das zum Wachstum der Zellen eingesetzt wird, kontaminiert (PEDERSEN & BARLOUGH, 1991). Viele Katzenimpfstoffe werden in CrFK-Zellen oder anderen Zelllinien hergestellt, die fötales Kälberserum benötigen. Bei geimpften Katzen kann es zu Antikörperbildung gegen das in Impfstoffen enthaltene Kälberserum kommen. Die gebildeten Antikörper binden an die unvollständig gereinigten Antigene in den FIV-ELISA-Platten und es entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe (CALZOLARI et al., 1995). Dadurch können falsch positive Testergebnisse auftreten, die die Spezifität des Testsystems verringern.

Auch die Sensitivität im FIV-Antikörper-Nachweis war für beide Tests hoch. Ein falsch negatives Testergebnis trat bei beiden Tests auf. Dadurch wurde sowohl für den Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test als auch den SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test eine Sensitivität von 88,9 % ermittelt. Die Ergebnisse der Studien von GROAT und Mitarbeitern (2000) und HARTMANN und Mitarbeiter (2007) stimmen mit diesem Ergebnis überein (GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2007). HARTMANN und Mitarbeiter (2001) ermittelten hingegen in einer vorherigen Studie lediglich eine Sensitivität von 86,3 % (HARTMANN et al., 2001). Eine Erklärung für die abweichenden Werte der Sensitivität könnte in der Verwendung von unterschiedlichen Versionen des SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test liegen. Seit 2000 ist eine verbesserte Version des ELISA der Firma IDEXX erhältlich, der zusätzlich zu Antikörpern gegen *gp40* auch Antikörper gegen *p24* nachweist. In der vorliegenden sowie in den Studien von GROAT und Mitarbeitern (2000) und HARTMANN und Mitarbeitern (2007) wurden die neue Version des SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test eingesetzt (GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2007).

Zum Nachweis der FeLV-Infektion wurde von beiden Testsystemen die Sensitivität, die Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert bestimmt. Der Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test, ein ELISA-ähnlicher Immunochromatografietest, und der SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test, ein *p27*-Antigen-ELISA, weisen beide *p27*-Antigen nach. Bei beiden Tests traten keine falsch positiven Ergebnisse auf und die Spezifität lag jeweils bei 100,0 %. Die ermittelten Werte für die Spezifität sind mit Werten aus früheren Studien vergleichbar (JARRETT et al., 1982b; LOPEZ & JACOBSON, 1989; HARDY & ZUCKERMAN, 1991; SWANGO, 1991; HARTMANN et al., 2001;

HARTMANN et al., 2007).

Ursachen für falsch positive Testergebnisse können Handhabungsfehler und schlechte Probenqualität sein. Bei der Verwendung von hämolytischen Seren kann die katalytische Wirkung der Peroxidase aus der Häm-Gruppe zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Weitere Ursachen für die Entstehung sind anti-Spezies Antikörper. Diese Antikörper richten sich gegen Mausantigene und kommen bei 0,14 bis 0,57 % aller Katzen vor. Durch die Interaktion der anti-Maus-Antikörper mit den monoklonalen Antikörpern kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen (LOPEZ & JACOBSON, 1989). Die Entstehung dieser Antikörper ist nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird, dass Katzen nach intensivem Kontakt zu Mäusen, Antikörper gegen Mäuse-IgG bilden (HORZINEK, 1990). Durch Zugabe von spezifischen Antikörpern, die gegen anti-Maus-Antikörper gerichtet sind, können falsch positive Testergebnisse im ELISA und Immunochromatografietest vermieden werden (LOPEZ & JACOBSON, 1989)

Der Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test erreichte in der vorliegenden Studie für den Nachweis der FeLV-Infektion eine Sensitivität von 40,0 %, der SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test 53,3 %. Die ermittelten Werte für die Sensitivität liegen deutlich unter denen vorheriger Studien (JARRETT et al., 1982b; HARDY & ZUCKERMAN, 1991; SWANGO, 1991; GROAT et al., 2000). HARTMANN und Mitarbeiter ermittelten in einer 2001 veröffentlichten Studie Sensitivitäten von 51,8 – 91,3 % und 2007 Werte von 92,1 – 96,8 % für die untersuchten FeLV-Testsysteme (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007). Die Sensitivität der ELISA kann abhängig vom gewählten Referenztest variieren (LUTZ et al., 1983b). Vermeintlich falsch positive Testsysteme treten gehäuft auf, wenn der Bestätigungstest einen unterschiedlichen Infektionsstatus nachweist. JARRETT und Mitarbeiter (1991) beschrieben, dass bei etwa 10 % der FeLV-infizierten Katzen diskrepante Testergebnisse bei verschiedenen Tests auftraten (JARRETT, 1991). Ursachen hierfür sind die unterschiedlichen Verlaufsformen der FeLV-Infektion und nicht die mangelnde Sensitivität der Referenztests. Bei transienter Verlaufsform kann die Virämie durch eine effektive Immunantwort der Katze beendet werden, noch bevor das Knochenmark infiziert ist. Mithilfe eines FeLV-Antigen-Tests kann die Infektion nachgewiesen werden, von einem IFT wird sie nicht erkannt.

In der vorliegenden Studie wurden alle FeLV-positiven ELISA- und

Immunochromatografie-Testergebnisse (insgesamt 15 FeLV-positive Proben) durch ein positives Ergebnis in der TaqMan real-time PCR bestätigt. Folglich ergaben sich für beide untersuchten Testsysteme keine falsch positiven Resultate. Dieses Ergebnis stimmt mit der Studie von TANDON und Mitarbeitern (2005) überein, in der bei allen natürlich infizierten *p27*-positiven Katzen provirale DNA nachgewiesen wurde (TANDON et al., 2005). Beim Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test wurden neun, beim SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIV Test sieben negative Ergebnisse durch die TaqMan real-time PCR nicht als negativ bestätigt und so als falsch negativ betrachtet. Sechs der Antigen-negativen PCR-positiven Katzen waren in beiden FeLV-Antigen-Tests negativ. Eine Erklärung hierfür liegt im Verlauf der FeLV-Infektion. Beide Testsysteme weisen *p27*-Antigen nach. Die verwendete PCR hingegen sucht nach viraler DNA. Die Mehrheit der FeLV-infizierten Katzen entwickelt eine regressive Infektion mit einer transienten Virämie, die in den meisten Fällen durch eine effektive Antwort des Immunsystems beendet wird (HOOVER & MULLINS, 1991). Charakteristisch für eine latente Infektion ist das Fehlen der Virämie und eine persistierende Infektion des Knochenmarks, die nicht durch einen FeLV-Antigen-Test nachgewiesen werden kann (ROJKO et al., 1982). Da sechs Proben in beiden Antigen-Tests negativ getestet wurden, der PCR-Test jedoch positiv war, ist davon auszugehen, dass diese sechs Katzen, tatsächlich Antigen-negativ sind, aber latent FeLV-infiziert waren.

Mit der Wahl der TaqMan real-time PCR wurde die derzeit sensitivste und spezifischste Referenzmethode ausgewählt, die in den ABCD Guidelines on prevention and management der FeLV-Infektion zur Überprüfung von fragwürdigen *p27*-Testergebnissen empfohlen wird (LUTZ et al., 2009). Die hohe Zahl der falsch negativen Ergebnisse ist nicht auf eine tatsächlich niedrige Sensitivität der Testsysteme zurückzuführen, sondern auf eine mögliche latente Infektion der Katzen. Die Tiere haben die FeLV-Infektion bereits durchgemacht und Immunität entwickelt. Die FeLV-DNA bleibt aber in den Knochenmarkzellen integriert, da die Katzen PCR-positiv sind. Diese Überlegung stimmt mit der Studie von HOFMANN-LEHMANN und Mitarbeitern überein, in der 10 % der PCR-positiven Katzen antigen-negativ sind (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001).

Seit Einführung der quantitativen real-time PCR stellt diese Methode das am

häufigsten eingesetzte PCR-Verfahren dar. Sie ermöglicht die Quantifizierung von Provirus- und Virus-Loads. Bisherige Studien zeigen, dass der Verlauf der Virus-Loads bei der FIV-Infektion dem der HIV-Infektion entspricht (PIATAK et al., 1993c; DIEHL et al., 1996; GOTO et al., 2002). Der Verlauf der Viruskonzentrationen der HIV- und der experimentellen FIV-Infektion sind charakteristisch. Zu Beginn der akuten Infektion kommt es zu einem Peak, diesem folgt ein Abfall der Viruskonzentration bis auf ein Plateau in der asymptomatischen Phase, in der die Viruskonzentration konstant bleibt (DIEHL et al., 1995). In der Humanmedizin ist der Plasma RNA-Load hinsichtlich eines Fortschreitens der HIV-Infektion von größerer Bedeutung (FISCUS et al., 1998; LATHEY et al., 1998).

In der zweiten Studie der Dissertation galt es zu zeigen, dass natürlich FIV-infizierte Katzen mit einem niedrigeren Karnofsky-Index und folglich schlechtem Gesundheitszustand einen hohen Provirus- und Virus-Load haben und umgekehrt. In Human- und Tiermedizin stehen eine Reihe von Indizes zur Bewertung der Lebensqualität zur Verfügung. Die objektive Beurteilung des Wohlbefindens von Katzen in einer fremden Umgebung gestaltet sich sehr schwierig. Der Einsatz eines geeigneten Beurteilungskriteriums speziell für die Lebensqualität der Katzen war aus diesem Grund besonders wichtig. Der modifizierte Karnofsky-Index (HARTMANN & KUFFER, 1998) für die Katze ermöglicht es die Lebensqualität und das Wohlbefinden von Katzen innerhalb eines Scores von 0 % (tot) bis 100 % (klinisch gesund und munter) zu bestimmen. Der Vorteil des Karnofsky-Index besteht darin, dass er aus zwei Teilen aufgebaut ist. Im ersten Teil wird das Wohlbefinden der Katzen durch den Besitzer in einem Fragenbogen beurteilt, im zweiten Teil wird das Allgemeinbefinden durch einen Tierarzt bestimmt (HARTMANN & KUFFER, 1998). Der Besitzer vergleicht das aktuelle Verhalten seiner Katze mit dem Verhalten, vor Auftreten der ersten Krankheitssymptome. Jede Frage kann von mit fünf (= das Verhalten wird nicht mehr gezeigt) bis null Punkten (das Verhalten wird genauso häufig wie vor Auftreten der Krankheitssymptome gezeigt) bewertet werden, dabei sind die einzelnen Fragen mit unterschiedlichen Faktoren gewichtet. Die Fragen sind in sechs Verhaltensbereiche eingeteilt: Nahrungsaufnahme, Kot- und Urinabsatz, Schlafen, Wohlbefinden, Spielen und Sozialverhalten. Im zweiten Teil erfolgt die Beurteilung der Lebensqualität der Katzen durch den Tierarzt. Auch hier konnte

jede Frage von mit fünf (= vollständig gesunde Katze) bis null (= tot) Punkten bewertet werden.

Bei allen in der Studie eingeschlossenen Katzen wurde der Karnofsky-Index bestimmt. Der Median des Karnofsky-Index war überraschend hoch (94 %) und die Mehrzahl der Katzen (69 %) hatten einen Karnofsky-Index von über 90 %. Dies lässt sich durch die lange asymptomatische Phase der FIV-Infektion und die lange Überlebenszeit von FIV-positiven Katzen aufgrund der geringeren Pathogenität im Vergleich zur HIV-Infektion erklären (ADDIE et al., 2000). Ist FIV in einer Katzenpopulation endemisch, bleibt die Anzahl von infizierten und gesunden Katzen konstant und die Katzenpopulation wird nicht dezimiert (COURCHAMP et al., 1995; COURCHAMP et al., 1997).

Zu erwarten wäre, dass Katzen mit einem hohen Karnofsky-Index und folglich guter Lebensqualität einen niedrigen Provirus und Virus Load aufweisen und umgekehrt. In der untersuchten Population konnten statistisch signifikante Werte (Provirus-Load:  $p = 0,036$ ; Virus-Load:  $p = 0,023$ ) mit allerdings nur einer schwachen Korrelation zwischen Karnofsky-Index und  $\ln$  Provirus-Load ( $- 0,301$ ) als auch zwischen Karnofsky-Index und  $\ln$  Virus-Load ( $- 0,324$ ) ermittelt werden. Im Gegensatz zur HIV-Infektion erscheint bei natürlich infizierten Katzen der Provirus-Load daher aussagekräftiger als der Virus-Load. Insgesamt weisen die Viruskonzentrationen von natürlich infizierten Katzen in dieser Studie geringere Korrelationen mit dem Karnofsky-Index auf als bei experimentell infizierten Katzen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten eine Vielzahl von Umweltfaktoren sein (wie z. B. Sekundärinfektionen und Stress), denen natürlich infizierte Katzen ausgesetzt sind. Obwohl die Mehrheit der untersuchten Katzen einen überraschend hohen Karnofsky-Index zeigte, war die ermittelte Spannweite sowohl für den Provirus- als auch für den Virus-Load sehr weit. Dadurch wird deutlich, Provirus- und Virus Loads scheinen bei natürlich infizierten Katzen großen Schwankungen ausgesetzt zu sein. Um den Langzeitverlauf von Provirus- und Virus Loads und die möglichen Einflüsse zu untersuchen, die zu den Schwankungen führen, sind weitere Studien notwendig.

In der vorliegenden Studie erfolgte der Ausschluss von 50 der ursprünglich 99 Katzen, 27 davon aufgrund eines nicht messbaren Provirus- und Virus-Loads. Umfangreiche Variationen im *gag*-Gen können PCR-Ergebnisse stark beeinflussen. Hohe Mutationsraten im FIV-Genom können zu

Sequenzunterschieden führen, die eine Höhe von bis zu 26 % erreichen (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996b). In einer Studie von BACHMANN und Mitarbeitern (1997), in der Blutproben unter anderem aus Deutschland untersucht wurden, gehörten über 80 % der deutschen Virusisolate zu den Subtypen-A und -B. In München tritt die breiteste Repräsentation von FIV-Subtypen auf, -A, -B und -C (BACHMANN et al., 1997). Aufgrund der hohen Variabilität der FIV-Stämme ist es besonders schwierig, passende Primer- und Sondensequenzen für die Untersuchung von FIV-Feldstämmen auszuwählen. Um dieses bekannte Problem zu verbessern, wurden in dieser Studie drei unterschiedliche Primer eingesetzt. Trotzdem gelang die Quantifizierung von Provirus- und Virus-Loads in 27 Fällen nicht. Bei diesen Katzen wurden mehrfach mittels ELISA FIV-Antikörper nachgewiesen. Die Katzen waren nicht gegen FIV geimpft und maternale Antikörper konnten ausgeschlossen werden. Gründe für die falsch negative Ergebnisse könnten Sequenzunterschiede im FIV-Genom aufgrund der hohen Variabilität der FIV-Stämme oder Viruskonzentrationen unter der Nachweisgrenze sein (KLEIN et al., 1999).

Die signifikante, allerdings nur schwache Korrelation zwischen Provirus- und Virus-Load mit dem Karnofsky-Index zeigt, dass DNA- und RNA-Konzentrationen im Vergleich zur HIV-Infektion des Menschen in der asymptomatischen Phase bei natürlich infizierten Katzen in hohem Maße variabel verlaufen. Der Gesundheitszustand und das Wohlbefinden von natürlich FIV-infizierten Katzen ist weder durch den Provirus- noch den Virus-Load gut beurteilbar.

Aufgrund der niedrigen Prävalenz der FIV- und FeLV-Infektion in Deutschland sollte ein positives Testergebnis immer durch ein spezifischeres Testverfahren oder durch einen weiteren Test überprüft werden. Beide in der Studie untersuchten FIV- und FeLV-Tests können für den Einsatz in der tierärztlichen Praxis als Routine- und Bestätigungstest empfohlen werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die feline Immunodefizienzvirus- (FIV-) und die feline Leukämievirus- (FeLV-) Infektion sind schwerwiegende, häufig tödlich verlaufende Erkrankungen bei Katzen. Bei den am häufigsten eingesetzten und empfohlenen Routinetests handelt es sich um Schnelltests, die auf ELISA- oder Immunochromatografiertechnologie beruhen. In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer FIV-/FeLV-Schnelltest mit dem derzeit am häufigsten Verwendeten verglichen.

Viele Schnelltests zur Diagnose der FIV- und FeLV-Infektion sind für die Anwendung in der Tierarztpraxis erhältlich. Seit kurzem ist ein neuer FIV- und FeLV-Schnelltest in Deutschland verfügbar. Das Ziel dieser Studie war es, die Vor- und Nachteile des neuen Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit (Animal Genetics Inc, Kyenggi-do, Korea) im Vergleich zu dem derzeit am häufigsten verwendeten SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV/FIV Antikörpertest (IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Deutschland) zu untersuchen. Dazu wurden 300 Serumproben von zufällig ausgewählten Katzen mit beiden Schnelltests und mit dem jeweiligen Goldstandard (Western Blot zum Nachweis von AK gegen FIV und TaqMan real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von FeLV-Genom) getestet. Antikörper gegen FIV wurden in 9/300 Proben (Prävalenz: 3,0 %) mittels Western Blot bestätigt. In 15/300 Proben konnte FeLV-DNA nachgewiesen werden (Prävalenz: 5,0 %). Für den Nachweis von Antikörper gegen FIV wurde für den Anigen<sup>®</sup> Rapid Test eine Sensitivität von 88,9 %, eine Spezifität von 99,7 %, ein positiver prädiktiver Wert von 100 % und ein negativer prädiktiver Wert von 96,7 % ermittelt. Für den Nachweis von FeLV-Antigen wurde für den Anigen<sup>®</sup> Rapid Test eine Sensitivität von 40,0 %, eine Spezifität sowie ein positiver prädiktiver Wert von 100 % und ein negativer prädiktiver Wert von 96,9 % ermittelt. Die diagnostische Richtigkeit entsprach dem SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus Test. Der neue Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test kann daher für den Einsatz in der Tierarztpraxis empfohlen werden.

Der Verlauf des Plasma Virus-Loads bei der FIV-Infektion entspricht dem der HIV-Infektion. Bei experimentell infizierten Katzen wird eine Korrelation zwischen dem Virus-Load und dem Wohlbefinden der Katzen beschrieben. Ziel

der Arbeit war es daher, die Korrelation des Provirus- (DNA) und Virus-Load (RNA) mit dem Wohlbefinden von natürlich FIV-infizierten Katzen zu untersuchen. Dazu wurden 49 Katzen in Privatbesitz aus Süddeutschland in die Studie eingeschlossen. Der modifizierte Karnofsky-Index zur Bestimmung des Wohlbefindens und der Lebensqualität der Katzen wurde am selben Tag bestimmt, an dem die Blutproben für die PCR genommen wurden. Provirus- und Virus-Loads wurden mittels TaqMan real-time PCR bestimmt. Um Provirus- und Virus-Loads in allen mit möglicherweise unterschiedlichen FIV-Subtypen infizierten Katzen nachzuweisen, wurden drei unterschiedliche *gag*-spezifische PCR-Assays eingesetzt (FIV 1416, FIV 1010 und FIV 1372). Zum Zeitpunkt der Vorstellung in der Klinik war der Median des Karnofsky-Index 94 %. Ein hoher Prozentsatz der Katzen war asymptomatisch zum Zeitpunkt der Vorstellung und hatte einen Karnofsky-Index zwischen 90 und 100 %. Eine Erklärung hierfür ist die lange Überlebenszeit von FIV-infizierten Katzen und die lange asymptomatische Phase der Infektion. Der Mittelwert des Virus-Loads betrug 88,588 virions/ml Plasma, durchschnittlich waren 2,8 % der Lymphozyten im Blut infiziert. Für den Provirus- und Virus-Load konnte eine signifikante (Virus-Load:  $p = 0,023$ ; Provirus-Load:  $p = 0,036$ ), allerdings nur schwache Korrelation mit dem Karnofsky-Index bestimmt werden (Karnofsky-Index und  $\ln$  Virus-Load:  $-0,324$ , Karnofsky-Index und  $\ln$  Provirus-Load:  $-0,301$ ). Die signifikante, aber schwache Korrelation zwischen Provirus- und Virus-Load mit dem Karnofsky-Index zeigt, dass DNA- und RNA-Konzentrationen im Vergleich zu HIV-infizierten Menschen in der asymptomatischen Phase bei natürlich infizierten Katzen in hohem Maße variabel sind. Weder der Provirus- noch der Virus-Load stellen einen guten Marker für den Gesundheitszustand von natürlich FIV-infizierten Katzen dar.

## VI. SUMMARY

Feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) infection, both, cause severe, often fatal diseases in domestic cats. The preferred and recommended routine test systems are fast-performing in-house tests, such as ELISA or immunochromatographic tests. The first study compares a new FIV-/FeLV-in-house test system with the most common test system used today.

Many in-house tests for the diagnosis of FIV and FeLV infection are licensed for use in veterinary practice. A new test with unknown performance has recently appeared on the market. The aim of this study was to define the efficacy of the new in-clinic test system, the Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag test, and to compare it to the current leading in-clinic test, the SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus FeLV Antigen/FIB Antibody test. Three-hundred serum samples from randomly selected healthy and diseased cats presented to the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians University Munich, were tested using both, the Anigen<sup>®</sup> Rapid test and the SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus test. Diagnostic sensitivity, specificity, as well as positive and negative predictive values were calculated for both tests, applying Western Blot as the gold standard for verification of FIV infection and polymerase chain reaction (PCR) as the gold standard for FeLV infection. The presence of antibodies against FIV was confirmed by Western Blot in 9/300 samples (prevalence 3.0 %). FeLV DNA was detected by PCR in 15/300 samples (prevalence 5.0 %). For FIV infection the Anigen<sup>®</sup> Rapid test had a sensitivity of 88.9 %, a specificity of 99.7 %, a positive predictive value of 88.9 %, and a negative predictive value of 99.7 %. For FeLV infection, the Anigen<sup>®</sup> Rapid test had a sensitivity of 40.0 %, specificity of 100 %, a positive predictive value of 100 %, and a negative predictive value of 96.9 %. Diagnostic accuracy was similar to that of the SNAP<sup>®</sup> Kombi Plus test. The new Anigen<sup>®</sup> Rapid FIV Ab/FeLV Ag test performed very well and can be recommended for use in veterinary practice.

Kinetics of plasma virus loads during FIV infection resembles that of human immunodeficiency virus infection, and a correlation between virus load and health status was found in experimentally FIV-infected cats. The aim of the second study was to evaluate the correlation of provirus (DNA) and virus (RNA) load with the

health status in naturally FIV-infected cats. Forty-nine privately owned FIV-infected cats from Southern Germany were included in the study. The modified Karnofsky's score that evaluates well-being and quality of life in cats was determined at the time when blood samples were obtained. Provirus and virus load were measured using TaqMan real-time PCR. In order to detect provirus and virus in all cats potentially infected with different FIV subtypes and to overcome genetic diversity, three different probes (FIV 1416p, FIV 1010p, FIV 1372p) were used. The median Karnofsky's score of the cats at time of presentation was 94 %. Mean virus load in the cats was 88,588 virions/ml plasma, and a mean of 2.8 % blood lymphocytes were infected. Provirus as well as virus load showed a significant (virus load:  $p = 0.023$ ; provirus load:  $p = 0.036$ ) but only weak correlation with the Karnofsky's score (Karnofsky's score and  $\ln$  virus load:  $-0.324$ ,  $\ln$  provirus load:  $-0.301$ ). A high percentage of the cats (69 %) were asymptomatic and had a high Karnofsky's score between 90 and 100 % at time of presentation. This is caused by the long survival of FIV-infected cats and the long asymptomatic stage. The significant but weak correlation between provirus and virus load with the Karnofsky's score suggests that DNA and RNA levels are highly variable in the asymptomatic phase in naturally infected cats, and that, other than in HIV-infected humans, clinical status is not predictive of virus loads. Thus, neither provirus nor virus load are good predictors of the health status in naturally FIV-infected cats.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Ackley CD, Yamamoto JK, Levy N, Pedersen NC, Cooper MD. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1990; 64: 5652-5.

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.

Albert J, Fenyo EM. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1560-4.

Allenspach K, Amacker M, Leutenegger CM, Hottiger M, Hofmann-Lehmann R, Hubscher U, Pistello M, Lutz H. [Quantification of proviral FIV DNA using competitive PCR]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1996; 138: 87-92.

Anderson MM, Lauring AS, Burns CC, Overbaugh J. Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science* 2000; 287: 1828-30.

ANONYMUS. IDEXX GmbH, Snap Combi Plus FeLV Antigen/FIV Antibody Test, 71636 Ludwigsburg, Germany. 2008;

ANONYMUS. Animal Genetics Inc., Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit, 404-5, Kyunggi-do, Korea. January 2008;

Bachmann MH, Mathiason-Dubard C, Learn GH, Rodrigo AG, Sodora DL, Mazzetti P, Hoover EA, Mullins JI. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *J Virol* 1997; 71: 4241-53.

Barr MC, Pough MB, Jacobson RH, Scott FW. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1377-81.

Barr MC. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1996; 11: 144-53.

Bastien P, Chabbert E, Lachaud L. Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference? *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2272.

Bandinelli M, Pistello M, Lombardi S, Poli A, Garzelli C, Matteucci D, Ceccherini-Nelli L, Malvaldi G, Tozzini F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 87-112.

Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 289-99.

Busch MP, Devi BG, Soe LH, Perbal B, Baluda MA, Roy-Burman P. Characterization of the expression of cellular retrovirus genes and oncogenes in feline cells. *Hematol Oncol* 1983; 1: 61-75.

Calzolari M, Young E, Cox D, Davis D, Lutz H. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46: 83-92.

Charreyre C, Pedersen NC. Study of feline leukemia virus immunity. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1316-24.

Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, Manzin A, Valenza A, Varaldo PE. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Appl* 1993; 2: 191-6.

Connell S. Manufacturer addresses concerns about FIV vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222: 149.

Cotter SM. Feline viral neoplasia. In: *Infectious diseases of dog and cat*. Greene CE, ed. Philadelphia: WB Saunders Co 1998: 71-84.

Courchamp F, Pontier D, Langlais M, Artois M. Population dynamics of feline immunodeficiency virus within cat populations. *J Theor Biol* 1995; 175: 553-60.

Courchamp F, Suppo C, Fromont E, Bouloux C. Dynamics of two feline retroviruses (FIV and FeLV) within one population of cats. *Proc Biol Sci* 1997; 264: 785-94.

Courchamp F, Say L, Pontier D. Detection, identification, and correction of a bias in an epidemiological study. *J Wildl Dis* 2000; 36: 71-8.

Crawford PC, Slater MR, Levy JK. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 1503-7.

Crawford PC, Levy JK. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007a; 37: 335-50, vii.

Crawford PC, Levy JK. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007b; 37: 335-50.

Dandekar S, Beebe AM, Barlough J, Phillips T, Elder J, Torten M, Pedersen N. Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats. *J Virol* 1992; 66: 4040-9.

de Noronha F, Poco A, Post JE, Rickard CG. Virus isolation test for feline

leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 129-31.

De Ronde A, Stam, J.G., Boers, P., Langedijk, H., Meloen, R., Hesselink, W., Keldermans, L.C.E.J.M., van Vliet, A., Verschoor, E.J., Horzinek, M.C., Egberink, H. F. Antibody response in cats to the envelope proteins of feline immunodeficiency virus: identification of an immunodominant neutralisation domain. *Virology* 1994; 198: 257-64.

de Wolf F, Spijkerman I, Schellekens PT, Langendam M, Kuiken C, Bakker M, Roos M, Coutinho R, Miedema F, Goudsmit J. AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count and function: markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion. *AIDS* 1997; 11: 1799-806.

del Fierro GM, Bundesen P, Martin S, Jones S, Beetson S, Robinson WF. Evaluation of an autologous red cell agglutination test, VetRED FIV, for the presence of FIV antibody in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46: 93-101.

Diehl LJ, Mathiason-DuBard CK, O'Neil LL, Hoover EA. Longitudinal assessment of feline immunodeficiency virus kinetics in plasma by use of a quantitative competitive reverse transcriptase PCR. *J Virol* 1995; 69: 2328-32.

Diehl LJ, Mathiason-Dubard CK, O'Neil LL, Hoover EA. Plasma viral RNA load predicts disease progression in accelerated feline immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1996; 70: 2503-7.

Egberink HF, Lutz H, Horzinek MC. Use of western blot and radioimmunoprecipitation for diagnosis of feline leukemia and feline immunodeficiency virus infections. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1339-42.

Egberink HF, Keldermans CE, Koolen MJ, Horzinek MC. Humoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *Am J Vet Res* 1992; 53: 1133-8.

Enger C, Graham N, Peng Y, Chmiel JS, Kingsley LA, Detels R, Munoz A. Survival from early, intermediate, and late stages of HIV infection. *JAMA* 1996; 275: 1329-34.

English RV, Nelson P, Johnson CM, Nasisse M, Tompkins WA, Tompkins MB. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994; 170: 543-52.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871-4.

Essex M, Cotter SM, Sliski AH, Hardy WD, Jr., Stephenson JR, Aaronson SA, Jarrett O. Horizontal transmission of feline leukemia virus under natural conditions in a feline leukemia cluster household. *Int J Cancer* 1977; 19: 90-6.

Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, Giorgi JV. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990; 322: 166-72.

Fantoni M, Izzi I, Del Borgo C, Del Forno A, Damiano F, Pezzotti P, Franzetti M, Negri C, Quirini T, Zambelli A. Inter-rater reliability of a modified Karnofsky Scale of Performance Status for HIV-infected individuals. *AIDS Patient Care STDS* 1999; 13: 23-8.

Fischinger PJ, Blevins CS, Nomura S. Simple, quantitative assay for both xenotropic murine leukemia and ecotropic feline leukemia viruses. *J Virol* 1974; 14: 177-9.

Fischl MA, Richman DD, Hansen N, Collier AC, Carey JT, Para MF, Hardy WD, Dolin R, Powderly WG, Allan JD, et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group. *Ann Intern Med* 1990; 112: 727-37.

Fiscus SA, Hughes MD, Lathey JL, Pi T, Jackson B, Rasheed S, Elbeik T, Reichman R, Japour A, Byington R, Scott W, Griffith BP, Katzenstein DA, Hammer SM. Changes in virologic markers as predictors of CD4 cell decline and progression of disease in human immunodeficiency virus type 1-infected adults treated with nucleosides. AIDS Clinical Trials Group Protocol 175 Team. *J Infect Dis* 1998; 177: 625-33.

Floyd K, Suter PF, Lutz H. Granules of blood eosinophils are stained directly by anti-immunoglobulin fluorescein isothiocyanate conjugates. *Am J Vet Res* 1983; 44: 2060-3.

Förster VT. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann.Phys.* 1948; 2: 55-75.

Furuya T, Hasegawa A, Miyazawa T, Miki K, Mikami T. Detection of anti-gag antibodies of feline immunodeficiency virus in cat sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Arch Virol* 1992; 124: 355-61.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6: 995-1001.

Gleich S, Hartmann K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 552-8.

Gleich SE, Krieger S, Hartmann K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg* 2009;

Goto Y, Nishimura Y, Mizuno T, Endo Y, Baba K, Momoi Y, Watari T, Hasegawa A, Tsujimoto H. Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1609-13.

Goto Y, Nishimura Y, Baba K, Mizuno T, Endo Y, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Association of plasma viral RNA load with prognosis in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 2002; 76: 10079-83.

Grant CK, Essex M, Gardner MB, Hardy WD, Jr. Natural feline leukemia virus infection and the immune response of cats of different ages. *Cancer Res* 1980; 40: 823-9.

Groat R, Madsen R, Bartol B, Skvorak P, Serlemitsos K, Monn M (2000) Upgraded IDEXX Diagnostic Products for Simultaneous Detection of Antibodies to Feline Immunodeficiency Virus (FIV) gag and env Proteins in Feline Blood samples. 25 th World Small Animal Veterinary Association / 6th Federation of European Companion Animal Veterinary Association / Voorjaarsdagen Congress. Amsterdam, the Netherlands

Gruffydd-Jones TJ, Hopper CD, Harbour DA, Lutz H. Serological evidence of feline immunodeficiency virus infection in UK cats from 1975-76. *Vet Rec* 1988; 123: 569-70.

Harbour DA, Williams PD, Gruffydd-Jones TJ, Burbridge J, Pearson GR. Isolation of a T-lymphotropic lentivirus from a persistently leucopenic domestic cat. *Vet Rec* 1988; 122: 84-6.

Hardy WD, Jr., Old LJ, Hess PW, Essex M, Cotter S. Horizontal transmission of feline leukaemia virus. *Nature* 1973a; 244: 266-9.

Hardy WD, Jr., Hirshaut Y, Hess P. Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. *Bibl Haematol* 1973b; 39: 778-99.

Hardy WD, Jr., Hess PW, MacEwen EG, McClelland AJ, Zuckerman EE, Essex M, Cotter SM, Jarrett O. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res* 1976; 36: 582-8.

Hardy WD, Jr., Zuckerman EE. Development of the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1327-35.

Hartley JL, Rashtchian A. Dealing with contamination: enzymatic control of carryover contamination in PCR. *PCR Methods Appl* 1993; 3: S10-4.

Hartmann K, Hinze K. Epidemiology and clinical aspects of FIV infection in Bavaria. *Tierarztl Prax* 1991; 19: 545-51.

Hartmann K, Kuffer M, Egberink H, Lutz H, Kraft W. Diagnosis of FIV infection. *Tierarztl Prax* 1994; 22: 268-72.

Hartmann K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet J* 1998; 155: 123-37.

Hartmann K, Kuffer M. Karnofsky's score modified for cats. *Eur J Med Res* 1998; 3: 95-8.

Hartmann K, Werner RM, Egberink H, Jarrett O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Vet Rec* 2001; 149: 317-20.

Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, Greene CE, Vidyashankar AN, Jarrett O, Egberink HF. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 439-45.

Hartmann K, Hein J (2008) *Infektionskrankheiten der Katze*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG, Hannover

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-94.

Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, Boretti F, Sigrist B, Lutz H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J Gen Virol* 2001; 82: 1589-96.

Hofmann-Lehmann R, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Willi B, Cattori V, Gomes-Keller MA, Ossent P, Golder MC, Flynn JN, Lutz H. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine* 2006; 24: 1087-94.

Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Riond B, Pepin AC, Willi B, Ossent P, Lutz H. Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine* 2007; 25: 5531-9.

Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Riond B, Lutz H. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123: 119-23.

Hohdatsu T, Yamada M, Okada M, Fukasawa M, Watanabe K, Ogasawara T, Takagi M, Aizawa C, Hayami M, Koyama H. Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1992; 30: 113-23.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7276-80.

Hoover EA, Olsen RG, Hardy WD, Jr., Schaller JP, Mathes LE, Cockerell GL. Biologic and immunologic response of cats to experimental infection with feline leukemia virus. *Bibl Haematol* 1975: 180-3.

Hoover EA, Olsen RG, Mathes LE, Schaller JP. Relationship between feline leukemia virus antigen expression and viral infectivity in blood, bone marrow,

and saliva of cats. *Cancer Res* 1977; 37: 3707-10.

Hoover EA, Mullins JI. Feline leukemia virus infection and diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1287-97.

Horzinek MC (1990) Virusinfektionen bei Katzen, Stuttgart, Deutschland

Hosie MJ, Robertson C, Jarrett O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 1989; 125: 293-7.

Hosie MJ, Jarrett O. Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus. *AIDS* 1990; 4: 215-20.

Hosie MJ, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 575-84.

Ishida T, Washizu T, Toriyabe K, Motoyoshi S, Tomoda I, Pedersen NC. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194: 221-5.

Ishida T, Tomoda I. Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection. *Nippon Juigaku Zasshi* 1990; 52: 645-8.

Jacquemin PC, Saxinger C, Gallo RC, Hardy WD, Jr., Essex M. Antibody response in cats to feline leukemia virus reverse transcriptase under natural conditions of exposure to the virus. *Virology* 1978; 91: 472-6.

Jarrett O, Laird HM, Crighton GW, Jarrett WF, Hay D. Advances in feline leukemia. *Bibl Haematol* 1968; 30: 244-54.

Jarrett O, Hardy WD, Jr., Golder MC, Hay D. The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. *Int J Cancer* 1978; 21: 334-7.

Jarrett O. Feline leukaemia virus diagnosis. *Vet Rec* 1980; 106: 513.

Jarrett O, Golder MC, Stewart MF. Detection of transient and persistent feline leukaemia virus infections. *Vet Rec* 1982a; 110: 225-8.

Jarrett O, Golder MC, Weijer K. A comparison of three methods of feline leukaemia virus diagnosis. *Vet Rec* 1982b; 110: 325-8.

Jarrett O. Overview of feline leukemia virus research. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1279-81.

Jarrett O, Pacitti AM, Hosie MJ, Reid G. Comparison of diagnostic methods for feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1362-4.

Jarrett O. Detection of FeLV antigen. *Vet Rec* 1995; 137: 127.

Jarrett WF, Crawford EM, Martin WB, Davie F. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature* 1964; 202: 567-9.

Jarrett WF, Mackey LJ, Jarrett O, Laird HM. Feline leukaemia virus infection-the spectrum of associated disease and its relevance to the pathogenesis and immunology of leukaemia. *Bibl Haematol* 1973; 39: 93-101.

Jurriaans S, Van Gemen B, Weverling GJ, Van Strijp D, Nara P, Coutinho R, Koot M, Schuitemaker H, Goudsmit J. The natural history of HIV-1 infection: virus load and virus phenotype independent determinants of clinical course? *Virology* 1994; 204: 223-33.

Kakinuma S, Motokawa K, Hohdatsu T, Yamamoto JK, Koyama H, Hashimoto

H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. *J Virol* 1995; 69: 3639-46.

Katzenstein DA, Hammer SM, Hughes MD, Gundacker H, Jackson JB, Fiscus S, Rasheed S, Elbeik T, Reichman R, Japour A, Merigan TC, Hirsch MS. The relation of virologic and immunologic markers to clinical outcomes after nucleoside therapy in HIV-infected adults with 200 to 500 CD4 cells per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Virology Study Team. *N Engl J Med* 1996; 335: 1091-8.

Kemp DJ, Smith DB, Foote SJ, Samaras N, Peterson MG. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2423-7.

Klein D, Janda P, Steinborn R, Muller M, Salmons B, Gunzburg WH. Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *Electrophoresis* 1999; 20: 291-9.

Klein D, Leutenegger CM, Bahula C, Gold P, Hofmann-Lehmann R, Salmons B, Lutz H, Gunzburg WH. Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26: 8-20.

Kociba GJ. Hematologic consequences of feline leukemia virus infection. In: *Current Veterinary Therapy*. RW K, ed. Philadelphia: Saunders 1986: 448.

Kovacevic S, Kipar A, Kremendahl J, Teebken-Schuler D, Grant CK, Reinacher M. Immunohistochemical diagnosis of feline leukemia virus infection in formalin-fixed tissue. *Eur J Vet Pathol* 1997; 3: 13-9.

Lathey JL, Hughes MD, Fiscus SA, Pi T, Jackson JB, Rasheed S, Elbeik T,

Reichman R, Japour A, D'Aquila RT, Scott W, Griffith BP, Hammer SM, Katzenstein DA. Variability and prognostic values of virologic and CD4 cell measures in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with 200-500 CD4 cells/mm<sup>3</sup> (ACTG 175). AIDS Clinical Trials Group Protocol 175 Team. *J Infect Dis* 1998; 177: 617-24.

Leutenegger CM, Klein D, Hofmann-Lehmann R, Mislin C, Hummel U, Boni J, Boretti F, Guenzburg WH, Lutz H. Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan fluorogenic real-time detection system. *J Virol Methods* 1999; 78: 105-16.

Leutenegger CM, Higgins J, Matthews TB, Tarantal AF, Luciw PA, Pedersen NC, North TW. Real-time TaqMan PCR as a specific and more sensitive alternative to the branched-chain DNA assay for quantitation of simian immunodeficiency virus RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 243-51.

Levy J, Crawford C, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Little S, Sundahl E, Thayer V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *J Feline Med Surg* 2008a; 10: 300-16.

Levy J, Lorentzen L, Shields J, Lewis H (2006) Long-term outcome of cats with natural FeLV and FIV infection. 8th International Feline Retrovirus Research Symposium. Washington, DC

Levy J, Richards J., Edwards D., et al. Feline retrovirus testing and management. . *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2001; 23: 652-7.

Levy J, Richards J., Edwards D., et al. Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management. *J Feline Med Surg* 2003: 3-10.

Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993; 57: 183-289.

Levy JK, Crawford PC, Collante WR, Papich MG. Use of adult cat serum to correct failure of passive transfer in kittens. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 1401-5.

Levy JK, Crawford PC, Slater MR. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 1558-61.

Levy JK, Scott HM, Lachtara JL, Crawford PC. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228: 371-6.

Levy JK, Crawford PC, Kusuhara H, Motokawa K, Gemma T, Watanabe R, Arai S, Bienzle D, Hohdatsu T. Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. *J Vet Intern Med* 2008b; 22: 330-4.

Levy JK, Crawford, P.C. Feline leukemia virus. In: *Textbook of veterinary internal medicine*. Ettinger SJ, Feldman, E.C., ed. Philadelphia: WB Saunders Co 2005: 653-9.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-62.

Loar AS. Feline leukemia virus. Immunization and prevention. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1993; 23: 193-211.

Lombardi S, Poli A, Massi C, Abramo F, Zaccaro L, Bazzichi A, Malvaldi G, Bendinelli M, Garzelli C. Detection of feline immunodeficiency virus p24 antigen and p24-specific antibodies by monoclonal antibody-based assays. *J Virol Methods* 1994; 46: 287-301.

Lopez NA, Jacobson RH. False-positive reactions associated with anti-mouse activity in serotests for feline leukemia virus antigen. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 741-6.

Lottspeich F, Engels J, Simeon A (2006) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Martinsried

Lutz H, Pedersen N, Higgins J, Hubscher U, Troy FA, Theilen GH. Humoral Immune Reactivity to Feline Leukemia Virus and Associated Antigens in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus. *Cancer Res* 1980; 40: 3642-51.

Lutz H, Pedersen NC, Theilen GH. Course of feline leukemia virus infection and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay and monoclonal antibodies. *Am J Vet Res* 1983a; 44: 2054-9.

Lutz H, Pedersen NC, Durbin R, Theilen GH. Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in enzyme-linked immunosorbent assay of p27. *J Immunol Methods* 1983b; 56: 209-20.

Lutz H. Infection with feline leukemia virus: immunology and serodiagnosis as a basis for the prevention of infection. 2. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1984; 126: 91-109.

Lutz H, Arnold P, Hubscher U, Egberink H, Pedersen N, Horzinek MC. Specificity assessment of feline T-lymphotropic lentivirus serology. *Zentralbl Veterinarmed B* 1988; 35: 773-8.

Lutz H, Lehmann R, Winkler G, Kottwitz B, Dittmer A, Wolfensberger C, Arnold P. [Feline immunodeficiency virus in Switzerland: clinical aspects and epidemiology in comparison with feline leukemia virus and coronaviruses]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1990; 132: 217-25.

Lutz H, Leutenegger C, Hofmann-Lehmann R. The role of polymerase chain

reaction and its newer developments in feline medicine. *J Feline Med Surg* 1999; 1: 89-100.

Lutz H, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 565-74.

Lyamichev V, Brow MA, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 1993; 260: 778-83.

Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Jr., Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, Gupta P. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122: 573-9.

Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-70.

Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR, Jr. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 126: 946-54.

Menzo S, Bagnarelli P, Giacca M, Manzin A, Varaldo PE, Clementi M. Absolute quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1752-7.

Mermer B, Hillman P, Harris R, Krogmann T, Tonelli Q, Palin W, Andersen P. A recombinant-based feline immunodeficiency virus antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 35: 133-41.

Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, Al BJ, Roos M, Lange JM, Danner SA, Goudsmit J, et al. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988; 82: 1908-14.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-73.

O'Connor TPJ, Tanguay S, Steinman R, Smith R, Barr MC, Yamamoto JK, Pedersen NC, Andersen PR, Tonelli QJ. Development and evaluation of immunoassay for detection of antibodies to the feline T-lymphotropic lentivirus (feline immunodeficiency virus). *J Clin Microbiol* 1989; 27: 474-9.

Overbaugh J, Donahue PR, Quackenbush SL, Hoover EA, Mullins JI. Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science* 1988; 239: 906-10.

Pacitti AM, Jarrett O, Hay D. Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. *Vet Rec* 1986; 118: 381-4.

Pecoraro MR, Tomonaga K, Miyazawa T, Kawaguchi Y, Sugita S, Tohya Y, Kai C, Etcheverrigaray ME, Mikami T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1996a; 77 ( Pt 9): 2031-5.

Pecoraro MR, Tomonaga K, Miyazawa T, Kawaguchi Y, Sugita S, Tohya Y, Kai C, Etcheverrigaray ME, Mikami T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1996b; 77 2031-5.

Pedersen NC, Johnson L, Birch D, Theilen GH. Possible immunoenhancement of persistent viremia by feline leukemia virus envelope glycoprotein vaccines in challenge-exposure situations where whole inactivated virus vaccines were protective. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 11: 123-48.

Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 1987; 235: 790-3.

Pedersen NC, Yamamoto JK, Ishida T, Hansen H. Feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 21: 111-29.

Pedersen NC, Barlough JE. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1298-305.

Pedersen NC. The feline immunodeficiency virus. In: *The Retroviridae*. Levy JA, ed. New York: Plenum Press 1993: p.181-228.

Perryman LE, Hoover EA, Yohn DS. Immunologic reactivity of the cat: immunosuppression in experimental feline leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49: 1357-65.

Phipps AJ, Hayes KA, Al-dubaib M, Roy-Burman P, Mathes LE. Inhibition of feline leukemia virus subgroup A infection by coinoculation with subgroup B. *Virology* 2000; 277: 40-7.

Piatak M, Jr., Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993a; 259: 1749-54.

Piatak M, Jr., Luk KC, Williams B, Lifson JD. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 1993b; 14: 70-81.

Piatak MJ, Luk KC, Williams B, Lifson JD. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 1993c; 14: 70-81.

Pistello M, Menzo S, Giorgi M, Da Prato L, Cammarota G, Clementi M, Bendinelli M. Competitive polymerase chain reaction for quantitating feline immunodeficiency virus load in infected cat tissues. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 229-34.

Polzin DJ, Lund, E., Walter, P, Klausner, J. From journal to medicine: evidence bases medicine. In *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice*. Ed J. D. Bonagura. Philadelphia, W.B. Saunders Company. . 1999: 2-8.

Reid G, Rigby MA, McDonald M, Hosie MJ, Neil JC, Jarrett O. Immunodiagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant viral p17 and p24. *AIDS* 1991; 5: 1477-83.

Reid RW, Barr MC, Scott FW. Retrospective serologic survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELISA and IFA techniques. *Cornell Vet* 1992; 82: 359-69.

Reinacher M, Theilen G. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am J Vet Res* 1987; 48: 939-45.

Rimmelzwaan GF, Siebelink KH, Broos H, Drost GA, Weijer K, van Herwijnen R, Osterhaus AD. gag- and env-specific serum antibodies in cats after natural and experimental infection with feline immunodeficiency virus. *Vet Microbiol* 1994; 39: 153-65.

Rimstad E, Hornes E, Olsvik O, Hyllseth B. Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2275-8.

Rimstad E, Ueland K. Detection of feline immunodeficiency virus by a nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992; 36: 239-48.

Rojko JL, Hoover EA, Mathes LE, Olsen RG, Schaller JP. Pathogenesis of

experimental feline leukemia virus infection. *J Natl Cancer Inst* 1979; 63: 759-68.

Rojko JL, Hoover EA, Quackenbush SL, Olsen RG. Reactivation of latent feline leukaemia virus infection. *Nature* 1982; 298: 385-8.

Rojko JL, Kociba GJ. Pathogenesis of infection by the feline leukemia virus. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1305-10.

Saag MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, Jacobsen DM, Shaw GM, Richman DD, Volberding PA. HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med* 1996; 2: 625-9.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.

Saito T, Suzuki K, Imai M, Inaba Y. Measurement of reverse transcriptase of feline immunodeficiency virus by poly A-linked colorimetric assay. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 425-9.

Sarma PS, Log T. Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology* 1973; 54: 160-9.

Sarma PS, Jain D, Hill PR. In vitro host range of feline leukemia virus. *Bibl Haematol* 1975: 489-92.

Schaller JP, Essex M, Yohn DS, Olsen RG. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. V. Humoral immune response to virus and cell membrane antigens in cats inoculated with Gardner-Arnstein feline sarcoma virus. *J Natl Cancer Inst* 1975; 55: 1373-8.

Schüpbach JDMV, F., Gallo, R.C. Human Retroviruses. In: *Clinical Virology Manual* Amsterdam, Niederlande: Elsevier 1986: 451-90.

Settele J Vergleichende Untersuchungen mit kommerziellen ELISA-Testkits zur Diagnose der FeLV-Infektion aus Vollblut, Plasma und Speichel, Diss. med. vet. 1998 Wien

Siebelink KH, Chu IH, Rimmelzwaan GF, Weijer K, van Herwijnen R, Knell P, Egberink HF, Bosch ML, Osterhaus AD. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in the cat as a model for HIV infection in man: FIV-induced impairment of immune function. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; 6: 1373-8.

Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature* 1992; 359: 557-8.

Sodora DL, Shpaer EG, Kitchell BE, Dow SW, Hoover EA, Mullins JI. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *J Virol* 1994; 68: 2230-8.

Stein DS, Korvick JA, Vermund SH. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis* 1992; 165: 352-63.

Steinman R, Dombrowski J, O'Connor T, Montelaro RC, Tonelli Q, Lawrence K, Seymour C, Goodness J, Pedersen NC, Andersen PR. Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1990; 71 701-6.

Steinrigl A, Klein D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *J Gen Virol* 2003; 84: 1301-7.

Steinrigl A, Ertl R, Langbein I, Klein D. Phylogenetic analysis of European FIV-sequences suggests independent introduction of subtypes A and B and identifies the need for a reevaluation of FIV subtyping. *Vet Immunol Immunopathol* (accepted) 2009;

Suzuki K, Craddock BP, Okamoto N, Kano T, Steigbigel RT. Poly A-linked colorimetric microtiter plate assay for HIV reverse transcriptase. *J Virol Methods* 1993; 44: 189-98.

Swango LJ. Evaluation of feline leukemia virus diagnostic tests available for in-office use by veterinarians. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1386-9.

Tandon R, Cattori V, Gomes-Keller MA, Meli ML, Golder MC, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2005; 130: 124-32.

Tilton GK, O'Connor TP, Jr., Seymour CL, Lawrence KL, Cohen ND, Andersen PR, Tonelli QJ. Immunoassay for detection of feline immunodeficiency virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 898-904.

Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology* 2005; 332: 272-83.

Torres AN, O'Halloran KP, Larson LJ, Schultz RD, Hoover EA. Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123: 81-9.

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

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4.

Uchio E, Aoki K, Saitoh W, Itoh N, Ohno S. Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis on conjunctival swabs by 10-minute immunochromatography.

Ophthalmology 1997; 104: 1294-9.

Uhl EW, Heaton-Jones TG, Pu R, Yamamoto JK. FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review FIV vaccine 2002 update and review. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 90: 113-32.

Vahlenkamp TW, Egberink HF, van Eijk MJ, Slotboom-Kamphorst AM, Verschoor EJ, Horzinek MC, de Ronde A. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction for quantitation of feline immunodeficiency virus. *J Virol Methods* 1995; 52: 335-46.

van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antibody--enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1974; 43: 215-8.

Verschoor EJ, Hulskotte EG, Ederveen J, Koolen MJ, Horzinek MC, Rottier PJ. Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. *Virology* 1993; 193: 433-8.

Vlahov D, Graham N, Hoover D, Flynn C, Bartlett JG, Margolick JB, Lyles CM, Nelson KE, Smith D, Holmberg S, Farzadegan H. Prognostic indicators for AIDS and infectious disease death in HIV-infected injection drug users: plasma viral load and CD4+ cell count. *JAMA* 1998; 279: 35-40.

Weijer K, Pfauth A, van Herwijnen R, Jarrett O, Meloen RH, Tomee C, Osterhaus AD. Induction of feline leukaemia virus-neutralizing antibodies by immunization with synthetic peptides derived from the FeLV env gene. *Vaccine* 1993; 11: 946-56.

Wilhelm N Vergleichende Untersuchung zum therapeutischen Einsatz von (R)-9-(2-Phosphorylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurin (PMPDAP) und Mellitin bei natürlich FIV-infizierten Katzen, Diss. med. vet. 1996 München

Wilson KM, Robinson WF, Mitchelhill KI, Bundesen PG, Kemp BE. Autologous

red cell agglutination test for antibodies to feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 42: 253-63.

Yamamoto JK, Sparger E, Ho EW, Andersen PR, O'Connor TP, Mandell CP, Lowenstine L, Munn R, Pedersen NC. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1246-58.

Yamamoto JK, Hansen H, Ho EW, Morishita TY, Okuda T, Sawa TR, Nakamura RM, Pedersen NC. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194: 213-20.

## VIII. DANKSAGUNG

Diese Arbeit ist durch Initiative und Unterstützung meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann möglich geworden. Ganz herzlich möchte ich mich bei ihr für die gute Zusammenarbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Bei allen KollegenInnen und vor allem bei meinen MitdoktorandenInnen möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die praktische und moralische Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht an die Doktoranden, die mich bei der Sammlung der Proben unterstützt haben.

Für die großartige Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Herman Egberink vom Institut für Virologie der Fakultät für Tiermedizin in Utrecht, Niederlande und bei seiner hilfsbereiten Laborassistentin Nancy Schuurman ganz herzlich.

Prof. Dr. Dieter Klein und seinen Mitarbeitern vom Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und für die Durchführung der real-time PCR.

Dr. Carola Sauter-Louis danke ich vielmals für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie und an meine Freunde für die Unterstützung und Hilfe und dass sie immer für mich da waren.