

Vorkommen mutierter und nicht-mutierter feliner Coronaviren
bei Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis

von Laura Aliko Emmler

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

Vorkommen mutierter und nicht-mutierter feliner Coronaviren
bei Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis

von Laura Aliko Emmler
aus Panorama (Thessaloniki)

München 2020

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

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

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	10
II.	LITERATURÜBERSICHT	11
1.	Infektion mit feline Coronaviren ohne Entstehung von feline infektiöser Peritonitis.....	11
1.1.	Interaktion feline Coronaviren mit dem Wirt	11
1.1.1.	Übertragung.....	13
1.1.2.	Vermehrung.....	14
1.1.3.	Ausscheidung	15
1.2.	Vorkommen feline Coronaviren innerhalb einer Katze ohne feline infektiöse Peritonitis.....	16
1.2.1.	Körperflüssigkeiten	16
1.2.2.	Organe	22
1.2.3.	Kot.....	23
2.	Infektion mit feline Coronaviren mit Entstehung von feline infektiöser Peritonitis.....	24
2.1.	Mutationen feline Coronaviren	25
2.1.1.	Mutationen im open reading frame 3c	25
2.1.2.	Mutationen im Spike-Gen	26
2.2.	Vorkommen feline Coronaviren innerhalb einer Katze mit feline infektiöser Peritonitis	27
2.2.1.	Körperflüssigkeiten	36
2.2.1.1.	Blut.....	36
2.2.1.2.	Augenkammerwasser und Liquor cerbebrospinalis	37
2.2.1.3.	Erguss.....	37
2.2.2.	Organe	39
2.2.3.	Kot.....	40
III.	PUBLIKATION	41
IV.	DISKUSSION	51
V.	ZUSAMMENFASSUNG	62
VI.	SUMMARY.....	64

VII.	LITERATURVERZEICHNIS	65
VIII.	DANKSAGUNG	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
FCoV	felines Coronavirus
FECV	felines enterales Coronavirus
FeLV	felines Leukämievirus
FIP	feline infektiöse Peritonitis
FIPV	Feline-infektiöse-Peritonitis-Virus
FIV	felines Immunodefizienzvirus
FNA	Feinnadelaspirat
HCM	hypertrophic cardiomyopathy (hypertrophe Kardiomyopathie)
IB	Inzisionsbiopsie
IHC	Immunhistochemie/immunhistochemische Färbung
IZC	Immunzytochemie/immunzytochemische Färbung
M1058L	Aminosäuresubstitution von Methionin durch Leucin an Stelle 1058 im Spike-Protein
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
p. i.	post infectionem
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
S	Spike
S1060A	Aminosäuresubstitution von Serin durch Alanin an Stelle 1060 im Spike-Protein
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SPF	spezifisch pathogenfrei
ZNS	Zentralnervensystem

I. EINLEITUNG

Feline Coronaviren (FCoV) sind in den Katzenpopulationen weltweit verbreitet (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979). Als Auslöser der felines infektiösen Peritonitis (FIP) kommt ihnen eine besondere Bedeutung zu. Die Pathophysiologie der FIP ist noch immer nicht vollständig geklärt. Die *in-vivo*-Mutationshypothese besagt, dass eine harmlose FCoV-Variante, auch felines enterales Coronavirus (FECV) genannt, innerhalb des Wirts zu einem hochvirulenten Pathotyp, dem sogenannten Feline-infektiöse-Peritonitis-Virus (FIPV), mutiert (PEDERSEN et al., 1981; POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998; BROWN et al., 2009). Die Mutationen, die für die gesteigerte Virulenz verantwortlich sind, konnten bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine Kombination von Mutationen auf unterschiedlichen Genen ist wahrscheinlich. Als Hauptgrund für die gesteigerte Virulenz wird ein geänderter Zelltropismus angesehen, aufgrund dessen FCoV nicht länger Enterozyten, sondern Makrophagen infizieren und in diesen replizieren (DEWERCHIN et al., 2005; ROTTIER et al., 2005). In der Folge kommt es zur systemischen Ausbreitung der FCoV. Dies ist die Grundvoraussetzung der Entstehung von FIP. Das Spike (S)-Protein der FCoV spielt eine zentrale Rolle bei der Zellpenetration (BOSCH et al., 2003). Daher wurden Mutationen im S-Gen der FCoV als mögliche Ursache für den geänderten Zelltropismus und damit auch der Virulenz untersucht (LICITRA et al., 2013; LEWIS et al., 2015; SHIRATO et al., 2018). In einer Studie wurden spezifische Mutationen im FCoV-S-Gen identifiziert, die bei 96 % der FCoV von an FIP erkrankten Katzen nachgewiesen wurden. Diese Mutationen traten bei Katzen ohne FIP nicht auf (CHANG et al., 2012). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Vorkommens mutierter und nicht-mutierter FCoV bei 20 Katzen mit immunhistochemisch bestätigter FIP in verschiedenen Gewebe- und Körperflüssigkeitsproben. Gegenstand der Studie waren zwei real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR). Mittels der 7b-Gen-RT-PCR wurde das Vorkommen aller FCoV in den Proben untersucht. Die anschließend durchgeführte S-Gen-Mutations-RT-PCR ermöglichte den Nachweis der genannten S-Gen-Mutationen in FCoV und somit eine Differenzierung zwischen mutierten und nicht-mutierten FCoV.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Infektion mit feline Coronaviren ohne Entstehung von feliner infektiöser Peritonitis

Nicht jede Infektion mit feline Coronaviren (FCoV) führt zur Entstehung von feliner infektiöser Peritonitis (FIP). Feline Coronaviren kommen als zwei unterschiedliche Serotypen (Typ I und II) vor (PEDERSEN et al., 1984; HOHDATSU et al., 1991b; HOHDATSU et al., 1991a; HERREWEGH et al., 1998). FCoV Serotyp II kommt weltweit seltener vor als FCoV Serotyp I (KUMMROW et al., 2005; AN et al., 2011; WANG et al., 2014). Von beiden Serotypen existieren zwei Pathotypen: das nicht-mutierte feline enterale Coronavirus (FECV) und das mutierte Feline-infektiöse-Peritonitis-Virus (FIPV). FECV ist die weniger virulente FCoV-Variante. Eine Infektion mit FECV führt nicht zur Entstehung von FIP. Mutieren FECV innerhalb einer Katze jedoch zu FIPV, hat dies auch eine Steigerung der Virulenz zur Folge, und die potenziell tödlich verlaufende FIP kann entstehen (PEDERSEN et al., 1981; VENNEMA et al., 1998; PEDERSEN et al., 2008).

Dagegen geht eine FECV-Infektion lediglich mit milden gastrointestinalen Symptomen einher. Sie kann auch inapparent verlaufen (PEDERSEN et al., 1981; PEDERSEN et al., 2008). Es treten keine bis geringgradige Symptome, wie Durchfall, Erbrechen und Anorexie, auf. Die FECV-Infektion ist daher an sich harmlos (HAYASHI et al., 1982; MOCHIZUKI et al., 1999; PEDERSEN et al., 2008). Schwere Verläufe sind sehr selten. Von FECV-Infektionen mit Todesfolgen liegen lediglich Fallberichte vor (KIPAR et al., 1998a). Hierbei waren vor allem jüngere Tiere (< 18 Monate) betroffen. Schwere Verlaufsformen sind auch bei infizierten spezifisch pathogenfreien (SPF) Katzenwelpen beschrieben (PEDERSEN et al., 1981).

1.1. Interaktion feline Coronaviren mit dem Wirt

Die Prävalenz für FCoV-Antikörper in der Katzenpopulation weltweit ist hoch (HORZINEK & OSTERHAUS, 1979). Sie spricht für das ubiquitäre Vorkommen der Viren und schlussfolgernd daraus, der häufigen Interaktion zwischen Viren und Katzen. Der Anteil von Katzen mit nachweisbaren FCoV-Antikörpern variiert je nach Studie und Ursprungsland. Durchschnittlich beträgt sie ca. 30,0 % innerhalb

der untersuchten Populationen.

Tabelle 1: Prävalenz der Antikörper gegen feline Coronaviren (FCoV) bei unterschiedlichen Katzenpopulationen verschiedener Länder. (FIP: feline infektiöse Peritonitis)

Land	Studienpopulation	Prävalenz FCoV-Antikörper	Autor
Italien	82 Straßenkatzen	39,0 %	(SPADA et al., 2016)
Türkei	169 kranke Katzen (Klinikpopulation), davon 32 mit FIP-verdächtigen Symptomen	37,0 %	(TEKELIOGLU et al., 2015)
Taiwan	833, davon 760 klinisch gesunde Katzen, 43 Katzen mit bestätigter FIP, 30 Katzen mit FIP-Verdacht	34,5 % (davon FCoV Typ II 1,2 %)	(WANG et al., 2014)
Polen	676 Katzen (Klinikpopulation)	38,5 %	(RYPULA et al., 2014)
Vereinigtes Königreich	1088 Katzen mit Durchfall (Klinikpopulation)	56,9 %	(PARIS et al., 2014)
Japan	17 392 Katzen (Klinikpopulation)	37,0 % (Rassekatzen 66,7 %; nicht-Rassekatzen 31,2 %)	(TAHARAGUCHI et al., 2012)
Korea	212 Katzen (Klinik- und Tierheimpopulation); davon 129 klinisch gesunde Katzen und 83 kranke Katzen mit unterschiedlichen Symptomen	13,7 % (davon FCoV Typ II 1,9 %)	(AN et al., 2011)
Schweden	209 Katzen (klinisch gesunde Klinikpopulation)	31,0 % (Rassekatzen 65,0 %; nicht-Rassekatzen	(HOLST et al., 2006)

		17,0 %)	
Australien	306 Katzen (Klinikpopulation, klinisch gesunde und kranke Katzen zu gleichen Teilen) zudem 49 wildlebende Katzen	34,0 % wildlebende Katzen 0,0 %	(BELL et al., 2006)
Schweiz	639 Katzen (Klinikpopulation)	50,0 % (davon FCoV Typ II 4,4 %)	(KUMMROW et al., 2005)
Vereinigtes Königreich	2207 Katzen (Tierheimpopulation)	25,6 %	(CAVE et al., 2004)

Die Prävalenz für Antikörper gegen FCoV liegt in fast allen Ländern bei mindestens 30,0 %. Lediglich in einer Studie aus Korea (AN et al., 2011) sowie einer Studie aus dem Vereinigten Königreich (CAVE et al., 2004) wurde eine niedrigere Prävalenz festgestellt. Einige Autoren weisen darauf hin, dass die Zahl der Antikörper-positiven Tiere unter wildlebenden Katzen geringer (BELL et al., 2006), dagegen bei Rassekatzen (HOLST et al., 2006; TAHARAGUCHI et al., 2012) und Tieren aus Mehrkatzenhaushalten (KUMMROW et al., 2005) höher ist.

1.1.1. Übertragung

Die Übertragung von FECV erfolgt in der Regel fäkal-oral (PEDERSEN et al., 1981; FOLEY et al., 1997; PEDERSEN et al., 2008). Die fäkale Kontamination mit FECV von chronisch oder transient infizierte Katzen dient als Ansteckungsquelle (FOLEY et al., 1997). Ort der Ansteckung ist häufig die Katzentoilette. Dort kann es vor allem in Mehrkatzenhaushalten zu erhöhten Viruslasten kommen (ADDIE & JARRETT, 1992). Adäquates Hygienemanagement ist demnach essentiell, um die Übertragung von FCoV einzudämmen. Bereits die Übertragung geringer Virusmengen reicht aus, um eine Infektion hervorzurufen (VOGEL et al., 2010). Eine Infektion mit unterschiedlichen FCoV-Stämmen durch Superinfektion ist möglich (ADDIE et al., 2003).

Eine vertikale Übertragung von FECV tritt, wenn überhaupt, äußerst selten auf (ADDIE & JARRETT, 1990). In der Literatur liegt hierzu lediglich ein Fallbericht

vor (PASTORET & HENROTEAUX, 1978). In Studien mit Katzenwelpen von FECV-infizierten Müttern begannen die Welpen erst im Alter von 9 Wochen mit der Virusausscheidung. Dies spricht für eine fäkal-orale statt einer vertikalen Infektion, da bei einem vertikalen Infektionsweg von einer zeitlich früheren Virusausscheidung ausgegangen werden muss (PEDERSEN et al., 2008). Es wurde angenommen, dass die Katzenwelpen für einen gewissen Zeitraum durch maternale FCoV-Antikörper vor einer Infektion geschützt sind (ADDIE & JARRETT, 1992). Die Bedeutung dieses Schutzes ist jedoch nicht komplett geklärt, da bei einer Studie in Schweizer Mehrkatzenhaushalten eine FCoV-Infektion auch bei 2 Wochen alten Katzenwelpen nachweisbar war (LUTZ et al., 2002). Eine Übertragung über die Muttermilch konnte nicht nachgewiesen werden. Das Säugen der Katzenwelpen durch virusausscheidende Kätzinnen führte nicht zu einer Infektion der Welpen. Eine venerische Übertragung von FCoV ist wenig wahrscheinlich. FCoV war nicht im Sperma von Katern nachweisbar (STRANIERI et al., 2019).

1.1.2. Vermehrung

FECV werden oral aufgenommen und befallen anschließend die Enterozyten. Hier findet die Vermehrung der Viren statt. Studien konnten die *Lamina epithelialis mucosae* von Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon als Hauptort der Virusreplikation identifizieren (PEDERSEN et al., 1981; KIPAR et al., 2010). Die Spike (S)-Proteine spielen bei der Zellpenetration sämtlicher Coronaviren eine zentrale Rolle (BOSCH et al., 2003). Die S-Proteine verfügen über verschiedene Rezeptorbindungsdomänen (SCHWEGMANN-WESSELS & HERRLER, 2006; DESMARETS et al., 2014). Das S-Protein der FCoV besteht aus zwei Anteilen, S1 und S2. Das S1-Protein nutzt die feline Aminopeptidase N als Rezeptor und bindet so an die Zielzelle. Das S2-Protein sorgt für die Zellfusion (HOHDATSU et al., 1998; ROTTIER et al., 2005; PEDERSEN, 2014a, 2014b).

Das FECV besitzt eine sehr hohe Affinität für seine Zielzellen, die Enterozyten. FECV sind aber auch in der Lage, Makrophagen zu befallen und eine Monozyten-assoziierte Virämie zu verursachen (GUNN-MOORE et al., 1998; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006; KIPAR et al., 2010). Die Replikationsfähigkeit der FECV außerhalb der Enterozyten konnte bewiesen werden, da man Botenribonukleinsäure (mRNA) im Blut gesunder Katzen detektierte (CANSAHNA et al., 2007; FISH et al., 2018). Dennoch gelten die Enterozyten als Hauptort der Vermehrung, da *in vitro* die Replikationsrate der FECV in

Makrophagen gering war (STODDART & SCOTT, 1989; DEWERCHIN et al., 2005).

1.1.3. Ausscheidung

Die Ausscheidung von FECV über den Kot spielt in der Verbreitung von FCoV innerhalb einer Population die größte Rolle. Eine Ausscheidung von FECV kann auch über Speichel (ADDIE & JARRETT, 2001) und Urin (HOSKINS, 1993) erfolgen. Diese ist jedoch aufgrund der geringeren ausgeschiedenen Virusmenge weniger relevant (ADDIE & JARRETT, 2001).

Die fäkale Ausscheidung von FECV beginnt kurz nach der Infektion. Bei experimentell infizierten Katzen wurde eine Ausscheidung bereits an Tag 1 bis Tag 2 *post infectionem* (p. i.) nachgewiesen (MELI et al., 2004; VOGEL et al., 2010).

Je nach Infektion können verschiedene Formen der Ausscheidung vorkommen. Bei einer chronischen FECV-Infektion kommt es zu einer dauerhaften Ausscheidung von FECV mit dem Kot. Diese Dauerausscheider stellen das wichtigste Reservoir für FECV dar und sind somit, vor allem in Mehrkatzenhaushalten, die Hauptansteckungsquelle (ADDIE et al., 2009). Bei transienten Infektionen kommt es zu einer zeitlich begrenzten Ausscheidung von FECV, welche jedoch mehrere Monate andauern kann (ADDIE & JARRETT, 2001). Mit Elimination des Virus durch den Wirt sistiert auch die Virusausscheidung. Reinfektionen sind möglich (FOLEY et al., 1997; ADDIE et al., 2003; PEDERSEN et al., 2008).

Das Alter einer Katze zum Zeitpunkt der FCoV-Infektion beeinflusst die Menge der ausgeschiedenen Viren. Der Kot von Katzenwelpen weist durchschnittlich eine höhere Viruslast auf als der adulter Katzen (PEDERSEN et al., 2008). Weiterhin beeinflusst eine Infektion mit dem felines Immunodefizienzvirus (FIV) die FCoV-Ausscheidung. Die Menge fäkal ausgeschiedener FCoV bei FIV-infizierten Katzen war 10 bis 100 Mal so hoch wie die von nicht FIV-infizierter Katzen. Während die fäkal ausgeschiedenen FCoV bei nicht FIV-infizierten Katzen 4 Wochen nach experimenteller Infektion mit FECV nicht mehr oder nur noch in geringer Menge nachweisbar waren, war die Menge der fäkal ausgeschiedenen FCoV bei den mit FIV infizierten Katzen auch zu diesem Zeitpunkt hoch (POLAND et al., 1996).

1.2. Vorkommen feliner Coronaviren innerhalb einer Katze ohne feline infektiöse Peritonitis

Um das Vorkommen von FCoV innerhalb einer Katze ohne FIP beurteilen zu können, muss auf direkte Nachweismethoden (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR), immunhisto- (IHC) oder zytochemische Nachweise (IZC)) zurückgegriffen werden (ADDIE et al., 2009; TASKER, 2018). Die unterschiedlichen Lokalisationen (Körperflüssigkeiten, Organe, Kot), in denen FCoV bei Katzen ohne FIP nachgewiesen werden konnten, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

1.2.1. Körperflüssigkeiten

In verschiedenen Studien gelang der Nachweis von FCoV im Blut von Katzen ohne FIP. Can-Sahna et al. (2007) untersuchten EDTA- (Ethyldiamintetraacetat-) Vollblut und wiesen bei 13 von 24 gesunden Katzen FCoV-mRNA mittels RT-PCR nach (CAN-SAHNA et al., 2007). Die Mehrheit (19/25) der Katzen mit positivem FCoV-Nachweis in dieser Studie waren jünger als 3 Jahre. Fish et al. kamen 2017 im Rahmen einer bei kalifornischen Tierheimkatzen durchgeführten Studie zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier konnte FCoV-Ribonukleinsäure (RNA) mittels RT-PCR detektiert werden. Ein positives Ergebnis lag bei 9 von 205 gesunden Katzen vor (4,4 %) (FISH et al., 2018).

Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Forschergruppen publiziert. Gunn-Moore et al. (1998) wiesen FCoV-RNA mittels RT-PCR in Katzenblut nach. Sowohl bei 11 von 14 klinisch gesunden SPF-Katzen, die natürlich mit FCoV infiziert wurden und FCoV-Antikörpern aufwiesen, als auch bei 49 von 50 klinisch gesunden Katzen aus Haushalten, in denen FCoV endemisch war (GUNN-MOORE et al., 1998). Meli et al. (2004) untersuchten 15 experimentell mit FCoV infizierte SPF-Katzenwelpen sowie 8 natürlich mit FCoV infizierte Katzenwelpen. FCoV wurde im Vollblut von 8 der 15 experimentell infizierten Katzen und bei allen der natürlich infizierten Katzen mittels RT-PCR nachgewiesen (MELI et al., 2004).

Tabelle 2: Vorkommen feliner Coronaviren (FCoV) in unterschiedlichen Lokalisationen bei Katzen ohne feline infektiöse Peritonitis. (EDTA: Ethylendiamintetraacetat, SPF: spezifisch pathogenfrei, RT-PCR: Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, mRNA: Boten-Ribonukleinsäure, IZC: Immunzytochemie, ZNS: Zentralnervensystem)

Lokalisation (Proben mit nachgewiesenen FCoV/ alle untersuchte Proben)	Population	Nachweismethode	Autoren
Körperflüssigkeiten			
Blut			
EDTA-Vollblut (60/64; 93,8 %)	50 klinisch gesunde Katzen aus Mehrkatzenhaushalten, 14 klinisch gesunde SPF-Katzen	RT-PCR	GUNN-MOORE et al., 1998a
EDTA Vollblut (15/122; 12,3 %), Plasma (6/88; 6,8 %), Monozyten (10/83; 12,0 %)	31 klinisch gesunde SPF-Katzen	RT-PCR	MELI et al., 2004

EDTA-Vollblut (13/25; 52,0 %)	25 klinisch gesunde Katzen	mRNA-RT-PCR	CAN-SAHNA et al., 2007
Buffy Coat (9/205; 4,4 %)	205 klinisch gesunde Katzen (Tierheimpopulation)	RT-PCR und mRNA- RT-PCR	FISH et al., 2018
Erguss			
Erguss (2/7; 28,6 %)	7 kranke Katzen (Herzerkrankung oder Neoplasien)	Immunfluoreszenz	LITSTER et al., 2013
Erguss (8/25; 32,0 %)	25 kranke Katzen (Herzerkrankung, bakterielle Infektionen, Neoplasien)	IZC	FELTEN et al., 2017a
Erguss (8/29; 27,6 %)	29 kranke Katzen (Herzerkrankung, bakterielle Infektionen, Neoplasien)	RT-PCR	FELTEN et al., 2017b

Sonstige			
Speichel (10/144; 6,9 %)	144 klinisch gesunde Katzen	RT-PCR	ADDIE & JARRETT, 2001
Augenkammerwasser (2/11; 18,2 %)	11 kranke Katzen (bakterielle Infektionen, Neoplasien, ZNS-Erkrankungen)	IZC	FELTEN et al., 2018
Organe			
Darm (Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon), Gehirn, Knochenmark, Mesenteriallymphknoten, Milz (Probenanzahl nicht angegeben)	31 klinisch gesunde SPF-Katzen (experimentell oder natürlich FCoV-infiziert)	RT-PCR	MELI et al., 2004
Knochenmark, Mesenteriallymphknoten (11/13 von allen Proben; 84,6 %)	13 klinisch gesunde SPF-Katzen (natürlich FCoV-infiziert)	RT-PCR	KIPAR et al., 2006b

Darm (Duodenum (9), Jejunum (12), Ileum (14), Colon (28)), Gehirn (6), Haut (5), Knochenmark (8), Leber (21), Lunge (11), Mesenteriallymphknoten (19), Milz (10), Niere (12), Thymus (13), Tonsille (11), Skelettmuskel (2) (nur positive Proben angegeben, Gesamtanzahl der Proben nicht bekannt)	30 klinisch gesunde SPF-Katzen (experimentell FCoV-infiziert)	RT-PCR	KIPAR et al., 2010
Leber, Mesenteriallymphknoten, Milz, Netz, Niere (9/41 von allen Proben, keine Angaben zu einzelnen Organen vorliegend; 22,0 %)	16 kranke Katzen	RT-PCR	PORTER et al., 2014
Darm, Niere, Leber, Lunge, Lymphknoten, Milz, Nebenniere, Schilddrüse, Skelettmuskel (3/30 von allen Proben, keine Angaben zu einzelnen Organen vorliegend; 10,0 %)	30 kranke Katzen (Herzerkrankungen, bakterielle Infektionen, Neoplasien, ZNS-Erkrankungen)	RT-PCR	SANGL et al., 2018
Hoden (6/39; 15,4 %)	37 gesunde Kater, 2 kranke Kater (portosystemischer Shunt, Trauma)	RT-PCR	STRANIERI et al., 2019

Kot			
Kot (151/154; 98,1 %)	154 klinisch gesunde Katzen aus FCoV-positiven Haushalten	RT-PCR	ADDIE et al., 2001
Kot oder Rektaltupfer (211/344; 61,3 %)	31 klinisch gesunde SPF-Katzen (experimentell oder natürlich FCoV-infiziert)	RT-PCR	MELI et al., 2004
Kot (12/13; 92,3 %)	13 klinische gesunde Katzen aus FCoV-positiven Haushalten	RT-PCR	DYE et al., 2008
Kot oder Rektaltupfer (30/30; 100,0 %)	30 klinisch gesunde SPF-Katzen (experimentell FCoV-infiziert)	RT-PCR	KIPAR et al., 2010
Kot (6/10; 60,0 %)	10 kranke Katzen, die aufgrund ihrer Erkrankungen eingeschläfert wurden	RT-PCR	PORTER et al., 2014
Kot oder Rektaltupfer (28/50; 56,0 %)	50 klinische gesunde Tierheim-Katzen	RT-PCR	FISH et al., 2018

FCoV konnte auch in Augenkammerwasser von Katzen nachgewiesen werden, die aufgrund anderer Erkrankungen der Kontrollgruppe in FIP-Diagnostikstudien angehörten. So wurde mittels immunzytochemischer Methoden FCoV-Antigen in 2 von 11 Kontrollkatzen nachgewiesen. Diese litten an einem Lymphom sowie einem Adenokarzinom der Lunge (FELTEN et al., 2018). Das Vorkommen von FCoV in Speichel in seltenen Fällen konnte in einer Studie mittels RT-PCR-Nachweis belegt werden. In 10 von insgesamt 144 untersuchten Speichelproben lagen FCoV vor (ADDIE & JARRETT, 2001). Studien zum Vorkommen von FCoV in Milch laktierender Kätzinnen gibt es bislang nicht. Eine Studie von Pedersen et al., welche die FCoV-Ausscheidung von Welpen experimentell FCoV-infizierter Kätzinnen zum Gegenstand hatte, legt nahe, dass keine bis minimale Mengen FCoV in der Milch vorkommen (PEDERSEN et al., 2008). Das Säugen der Welpen reichte nicht aus, um eine FCoV-Infektion bei den Welpen hervorzurufen.

Auch in Körperhöhlenergüssen, die nicht durch FIP bedingt sind, können manchmal FCoV nachgewiesen werden. Die betroffenen Katzen gehörten in den aufgeführten Studien den Kontrollgruppen bestehend aus nicht an FIP erkrankter Katzen an. Das Vorkommen von FCoV-Antigen in Makrophagen aus Erguss konnte mittels Immunfluoreszenz bei 2 von 7 Katzen ohne FIP bestätigt werden (LITSTER et al., 2013). In einer anderen Studie konnte FCoV-Antigen im Erguss von 8 von 25 Katzen, die keine FIP hatten, mittels IZC nachgewiesen werden (FELTEN et al., 2017a). Die in diesen Studien positiv für FCoV in Erguss getesteten Katzen litten entweder an Neoplasien (Lymphom oder Karzinom) oder dekompensierten Herzerkrankungen. Felten et al. (2017b) untersuchten außerdem die Körperhöhlenergüsse nicht an FIP erkrankter Katzen mittels RT-PCR. Aus einer Kontrollgruppe von 25 Katzen wurden 24 Aszites- und Thoraxergussproben untersucht. Bei 3 von 24 Proben konnte FCoV nachgewiesen werden (FELTEN et al., 2017b). Bei 1 von 3 Proben wurde sogar mutiertes FCoV nachgewiesen. Diese Katze hatte eine chronische Nierenerkrankung, pathohistologisch lagen keine Hinweise auf eine FIP vor.

1.2.2. Organe

FCoV konnten auch bei nicht an FIP erkrankten Katzen in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Vergleicht man diese Katzen allerdings mit an FIP erkrankten Katzen, so wiesen die an FIP erkrankten Katzen höhere Viruslasten in

den jeweiligen Organen oder eine höhere Anzahl an befallenen Organen auf (KIPAR et al., 2006; PORTER et al., 2014; SANGL et al., 2018).

Im Darm wurden die höchsten Viruslasten nachgewiesen. Dies war sowohl bei den Katzen der Fall, die an einer durch FECV ausgelösten Enteritis litten (KIPAR et al., 1998a), als auch bei klinisch gesunden, FECV-infizierten Katzen (KIPAR et al., 2006). FCoV wurde am häufigsten im Colon lokalisiert. Bei persistierend infizierten Katzen spielt das Colon als Rückzugsort für die Viren eine besondere Rolle (MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010).

Weiterhin konnten FCoV in lymphatischen Organen bei Katzen ohne FIP nachgewiesen werden. Hier lieferten sowohl immunhistochemische Nachweismethoden als auch RT-PCR positive Ergebnisse in Milz, Mesenteriallymphknoten, Tonsillen und Thymus (MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2006; KIPAR et al., 2010). Weiterhin wurde in den bereits zitierten Studien von Kipar et al. (2006; 2010) und Meli et al. (2004) FCoV in Knochenmark nachgewiesen. Die Untersuchungen von Lungen, Leber, Nieren, Gehirn, Skelettmuskulatur und Haut lieferten zwar positive Ergebnisse, die FCoV-Lasten waren jedoch lediglich gering.

Weitere Studien untersuchten das Vorkommen von FCoV in Geweben von Katzen ohne FIP ausschließlich mittels RT-PCR (PORTER et al., 2014; SANGL et al., 2018). In den 2 Studien wurden unterschiedliche Materialien auf einmal untersucht, sodass die exakte Lokalisierung des positiven FCoV-Nachweises nicht angegeben werden konnte. Bei Sangl et al. (2008) wurden die Proben für die RT-PCR Blöcken aus Darm, Niere, Leber, Lunge, Milz, Lymphknoten, Muskulatur sowie aus Darm, Niere, Lunge, Milz, Muskulatur, Nebenniere, Schilddrüse entnommen. Bei Porter et al. (2014) wurden Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz, Nieren und Netz untersucht. In beiden Studien war nur ein geringer Anteil der Proben (10,0 % und 22,0 %) positiv für FCoV. In einer weiteren Studie konnte FCoV mittels RT-PCR im Hodengewebe bei 9 von 39 untersuchten Organen von nicht an FIP erkrankten Katzen nachgewiesen werden (STRANIERI et al., 2019).

1.2.3. Kot

Meli et al. (2004) konnten FCoV im Kot mittels RT-PCR bei Katzen unterschiedlicher Haushalte nachweisen (MELI et al., 2004). Den Autoren gelang weiterhin die Identifikation der verschiedenen FCoV-Ausscheidungstypen, je

nachdem ob eine Katze chronisch oder transient infiziert war, indem Kotproben einzelner Katzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wurden (ADDIE & JARRETT, 2001). Kipar et al. (2010) wiesen nicht nur FCoV im Kot klinisch gesunder SPF-Katzen nach. Sie konnten außerdem nachweisen, dass Katzen, die initial mit höheren FCoV-Dosen infiziert wurden ($\geq 10^6$ FCoV RNA Kopien), FCoV früher und in größeren Mengen mit dem Kot ausschieden als die Katzen, die mit niedrigeren FCoV-Dosen ($\leq 10^5$ FCoV RNA Kopien) infiziert wurden. Weiterhin wurde gezeigt, dass Katzen, die FCoV mit dem Kot ausschieden, höhere Viruslasten im Darm aufwiesen ($> 10x$ höher), als jene Katzen, die zwar FCoV-infiziert waren, aber keine FCoV ausschieden (KIPAR et al., 2010). Das Vorkommen von FCoV im Kot nicht an FIP erkrankter Katzen wurde außerdem bei 50 gesunden kalifornischen Tierheimkatzen (FISH et al., 2018) sowie 10 aufgrund anderer Grunderkrankungen eingeschläferten Katzen (PORTER et al., 2018) untersucht. Es wurden 56,0 % (Fish et al., 2018) sowie 60,0 % (Porter et al., 2014) der untersuchten Tiere positiv mittels RT-PCR für FCoV im Kot getestet. Die Prävalenz war in diesen Studien somit niedriger als bei den anderen genannten Studien, allerdings wurde pro Katze lediglich eine einmalige Kotprobe untersucht (PORTER et al., 2014; FISH et al., 2018). Bei Katzen aus Haushalten, in denen FCoV bekanntermaßen endemisch war, lag die Prävalenz mit 92,3 % höher (DYE et al., 2008).

2. Infektion mit felinen Coronaviren mit Entstehung von feliner infektiöser Peritonitis

Eine Infektion mit FCoV führt gemäß der *in-vivo*-Mutationshypothese erst dann zur Entstehung von FIP, wenn FECV innerhalb des infizierten Wirts zum hochvirulenten Pathotyp FIPV mutieren (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). Letztendlich kommt es nur bei 5,0 bis 12,0 % der FCoV-infizierten Katzen in Mehrkatzenhaushalten zur Entstehung einer FIP (ADDIE & JARRETT, 1992; ADDIE et al., 1995).

Die genauen Mutationen, welche für die Entstehung von FIP verantwortlich sind, konnten bislang nicht identifiziert werden. Eine Kombination verschiedener Mutationen auf unterschiedlichen Genen könnte notwendig sein, um FIP auszulösen (CHANG et al., 2012; PEDERSEN et al., 2012; BANK-WOLF et al., 2014; BORSCHENSKY & REINACHER, 2014). Die FIPV, die bei Katzen mit FIP

identifiziert wurden, wiesen jeweils eine individuelle Genetik auf (PEDERSEN et al., 2009; PEDERSEN et al., 2012; BARKER et al., 2013).

2.1. Mutationen feliner Coronaviren

FCoV weisen als RNA-Viren und damit einhergehender Fehleranfälligkeit bei der Replikation eine hohe Mutationsrate auf (PEDERSEN et al., 2009; WOO et al., 2010; DESMARETS et al., 2016). Im Folgenden wird auf verschiedene Mutationen der FCoV eingegangen, die, basierend auf der *in-vivo*-Mutationshypothese (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998), mit FIP in Verbindung gebracht werden.

2.1.1. Mutationen im open reading frame 3c

Mutationen im open reading frame (ORF) 3c der FCoV wurden als potentielle Auslöser der FIP identifiziert (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). Vennema et al. (1998) konnten bei 11 von 13 FIPV aus Katzen mit FIP mutierte 3c-Gene feststellen. Spätere Studien konnten ebenfalls FCoV mit mutierten 3c-Genen bei Katzen mit FIP nachweisen (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; HSIEH et al., 2013). Bei 59,4 % der untersuchten FIPV lagen unterschiedliche Mutationen im 3c-Gen vor; Nukleotiddeletionen und –insertionen führten zu Leserastermutationen, Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) führten zu vorzeitigen Stopp-Codons. Bei all diesen Mutationen handelte es sich um sogenannte trunkierende Mutationen, welche eine Verkürzung des 3c-Proteins zur Folge hatten. Bei einem Drittel der FIPV mit mutiertem 3c-Gen wurden jedoch nicht-trunkierende Mutationen festgestellt (PEDERSEN et al., 2012). Nur trunkierende Mutationen, die zu einem verkürzten Genprodukt führten, hatten auch einen Einfluss auf den Zelltropismus und wurden in FIPV aus Makrophagen identifiziert (CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012). Daraus lässt sich schließen, dass zwar für die Replikation im Darmepithel ein intaktes, nicht-verkürztes 3c-Protein benötigt wird, nicht allerdings für die Replikation in Makrophagen. In einer Studie wurde jedoch auch bei einer Katze mit FIP mit trunkiertem 3c-Gen replizierendes FCoV im Darm nachgewiesen (HORA et al., 2016). Eine Replikation der FIPV in Enterozyten wird aufgrund eines trunkierten 3c-Gens also nicht komplett unterbunden, der Hauptort der Replikation verlagert sich jedoch in die Makrophagen. Allerdings wurden bei vielen FIPV auch nicht-mutierte 3c-Gene detektiert. Das Vorkommen sowohl mutierter als auch nicht-

mutierter 3c-Gene bei Katzen mit FIP belegt, dass Mutationen im 3c-Gen zwar an der Entstehung des geänderten Zelltropismus von FCoV und damit an der FIP-Pathogenese beteiligt sein können, sie jedoch nicht alleiniger auslösender Faktor sind (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; BANK-WOLF et al., 2014; BORSCHENSKY & REINACHER, 2014).

2.1.2. Mutationen im Spike-Gen

Auch das S-Gen der FCoV wurde als Lokalisierung möglicher mit FIP assoziierter Mutationen untersucht (ROTTIER et al., 2005; CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013). Das S-Protein spielt mit seinen Fusionspeptiden eine zentrale Rolle bei der Zellpenetration von FCoV (BOSCH et al., 2003) und somit auch bei einer Änderung des Zelltropismus (HULSWIT et al., 2016). Der S2-Abschnitt des S-Gens der FCoV ist bei der Zellfusion und Infektion von Makrophagen von Bedeutung (SHIRATO et al., 2018). Dies konnte nachgewiesen werden, indem man den S2-Abschnitt bei FIPV durch das entsprechende Pendant eines FECV ersetzte. Die Folge war eine Reduktion der Infektions- und Replikationsrate in den Makrophagen (ROTTIER et al., 2005). Der Austausch anderer Genabschnitte in FIPV durch ihre FECV-Pendants wirkte sich dagegen nicht auf die Infektions- und Replikationsrate aus (ROTTIER et al., 2005). Somit können Mutationen im S-Gen Änderungen im Zelltropismus der FCoV verursachen. Die erfolgreiche Infektion von und Replikation in Monozyten und Makrophagen ist Voraussetzung für die Virulenz der FIPV und somit ein Schlüsselereignis in der FIP-Pathogenese (DEWERCHIN et al., 2005; ROTTIER et al., 2005).

Im Rahmen der Studie von Chang et al. (2012) wurden insgesamt 118 FIPV und 183 FECV sequenziert. Dabei wurde eine Besonderheit im Nukleotid an der Position 23531 des S-Gens festgestellt. Während dieses bei allen untersuchten FECV die Base Adenin im Codon aufwies, lag bei 108 der 118 untersuchten FIPV eine Punktmutation vor. Bei 96 der FIPV (81,4 %) wurde statt Adenin Thymin und bei 12 der FIPV (10,2 %) statt Adenin Cytosin nachgewiesen. In beiden Fällen führte der vorhandene SNP zur Substitution der Aminosäure Methionin durch Leucin an Position 1058 im S-Protein (M1058L). Jene 10 FIPV, bei denen an Position 23531 keine Mutation im Nukleotid nachweisbar war, wurden zusätzlich phylogenetisch analysiert. Fünf dieser 10 FIPV wiesen eine Mutation an Stelle 23537, also in unmittelbarer Umgebung zur zuvor identifizierten Mutation, auf. Dort lag abermals eine Punktmutation vor, im Rahmen derer statt der Base Thymin

Guanin im Codon vorlag, wodurch an Position 1060 im S-Protein Serin durch Alanin ersetzt wurde (S1060A). Somit gelang es Chang et al. (2012), Mutationen im S-Gen der FCoV zu identifizieren, die in 95,8 % der untersuchten Fälle (113/118) mit dem Vorliegen der Erkrankung FIP korrelierten. Bei keinem der insgesamt 183 untersuchten FECV, welche im Kot von nicht an FIP erkrankten Katzen detektiert wurden, wurde an den Nukleotidposition 23531 oder 23537 des S-Gens eine Mutation nachgewiesen (CHANG et al., 2012).

Auch Licitra et al. (2013) konnten bei FIPV Mutationen im S-Gen feststellen. Diese Autoren untersuchten vor allem die S1/S2-Genabschnitte, auf denen eine Furin-Spaltungsstelle für die S1- und S2-Einheiten des S-Proteins codiert ist. Bei 100,0 % der untersuchten FECV war der Genbereich der S1/S2-Spaltungsstelle komplett konserviert, also mutationsfrei. Eine größere Variabilität lag stattdessen bei den FIPV vor. Bei 10 von 11 untersuchten Katzen mit FIP lagen bei den nachgewiesenen FIPV im Genbereich der S1/S2-Spaltungsstelle eine oder mehrere Punktmutationen vor. Die vorliegenden Mutationen wirkten sich auf die Spaltung der Proteine durch Furin aus, so dass es entweder zu einer verstärkten oder reduzierten Spaltung kam. Die Mutationen an der S1/S2-Spaltungsstelle lag jedoch bei weniger FIPV (22 FIPV) vor als die zuvor beschriebenen S-Gen-Mutationen an Nukleotidposition 23531 (96 FIPV) und 23537 (5 FIPV) (CHANG et al., 2012). Es bestand zudem eine Variabilität in der Anzahl (15 FIPV mit einer Punktmutation, 5 FIPV mit zwei Punktmutationen) und Art der Mutationen. Daraus ergab sich eine einzigartige Genetik aller untersuchter FIPV (LICITRA et al., 2013). Diese Mutationen können also nur mittels Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Ein Fallbericht dokumentierte eine Punktmutation (Aminosäuresubstitution) im Bereich der Furin-Spaltungsstelle des S1/S2-Genabschnitts bei einer Katze mit Manifestation der FIP im Zentralnervensystem (ZNS) (ANDRE et al., 2019).

2.2. Vorkommen feliner Coronaviren innerhalb einer Katze mit feliner infektiöser Peritonitis

FIPV infizieren Monozyten/Makrophagen und replizieren sich darin effektiver als FECV. Dadurch besitzen FIPV die Fähigkeit, sich im gesamten Organismus systemisch auszubreiten (GUNN-MOORE et al., 1998; DEWERCHIN et al., 2005). Bei Katzen mit FIP kommen FIPV also in verschiedenen Lokalisationen vor. Die größten Virusmengen liegen dabei innerhalb der Läsionen vor (KIPAR et al., 1998b; PEDERSEN et al., 2015). Diese durch FIP verursachten Läsionen betreffen

unterschiedliche Organe und Organsysteme. Es können die serösen Häute, aber auch parenchymatöse Organe wie Niere, Leber, Milz und Lymphknoten sowie das ZNS und die Augen betroffen sein (MONTALI & STRANDBERG, 1972; HARTMANN, 2005). Daher empfiehlt sich zum Nachweis von FCoV bei an FIP erkrankten Katzen Probenmaterialien aus den Lokalisationen zu entnehmen, welche infolge der Erkrankung Läsionen aufweisen (BARKER et al., 2017).

Um das Vorkommen von FCoV nachzuweisen, stehen direkte Nachweismethoden zur Verfügung. Diese Untersuchungsmethoden umfassen den Nachweis viraler RNA mittels RT-PCR sowie immunologische Nachweismethoden wie immunhistochemische, immunzytochemische und immunfluoreszierende Färbungen (KIPAR et al., 1998b; HARTMANN et al., 2003; SHARIF et al., 2010; FELTEN & HARTMANN, 2019). In der Tabelle 3 sind Studien aufgeführt, die das Vorkommen von FCoV mittels direkter Nachweismethoden in unterschiedlichen Lokalisationen bei Katzen mit FIP untersucht haben.

Tabelle 3: Vorkommen feliner Coronaviren in unterschiedlichen Lokalisationen bei Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis. (RT-PCR: Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, EDTA: Ethylendiamintetraacetat, SPF: spezifisch pathogenfrei, mRNA: Boten-Ribonukleinsäure, PBMC: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, S-Gen: Spike-Gen, IZC: Immunzytochemie, IHC: Immunhistochemie)

Lokalisation	Population	Nachweismethode	Studie
Körperflüssigkeiten			
Blut			
Serum (9/18, 50,0 %), Plasma (3/4, 75,0 %)	18 Katzen	RT-PCR	HERREWEGH et al., 1995
EDTA/Heparin-Vollblut (27/32, 84,4 %), EDTA/Heparin-Plasma (9/12, 75,0 %), Serum (6/8, 75,0 %)	47 Katzen (davon 17 SPF)	RT-PCR	GUNN-MOORE et al., 1998a
Serum (17/25, 68,0 %)	25 Katzen	RT-PCR	HARTMANN et al., 2003
PBMC (75/81, 92,6 %)	81 Katzen	mRNA-RT-PCR	SIMONS et al., 2005
PBMC (6/21, 28,6 %), Serum (5/26, 19,2 %)	43 Katzen	RT-PCR	DOENGES et al., 2017
Serum oder Plasma (2/14, 14,3 %)	38 Katzen	RT-PCR, S-Gen-Mutations-RT-PCR	FELTEN et al., 2017b

Serum oder Plasma (2/31, 6,5 %)	64 Katzen	RT-PCR, S-Gen-Sequenzierung	FELTEN et al., 2017c
Augenkammerwasser			
Augenkammerwasser (10/32, 31,3 %)	32 Katzen	RT-PCR	SANGL et al., 2016
Augenkammerwasser (1/2, 50,0 %)	57 Katzen	RT-PCR	BARKER et al., 2017
Augenkammerwasser (16/25, 64,0 %)	25 Katzen	IZC	FELTEN et al., 2018
Liquor cerebrospinalis			
Liquor cerebrospinalis (1/1, 100,0 %)	1 Katze	IZC	IVES et al., 2013
Liquor cerebrospinalis (8/19, 42,1 %)	19 Katzen	RT-PCR	DOENGES et al., 2016
Liquor cerebrospinalis (7/14, 50,0 %)	57 Katzen	RT-PCR	BARKER et al., 2017
Liquor cerebrospinalis (17/21, 81,0 %)	21 Katzen	IZC	GRUENDL et al., 2017
Erguss			
Aszites oder Thoraxerguss (20/21, 95,2 %)	21 Katzen	Immunfluoreszenz	PARODI et al., 1993
Aszites oder Thoraxerguss (34/49, 69,4 %)	49 Katzen	Immunfluoreszenz	HIRSCHBERGER et al., 1995

Aszites oder Thoraxerguss (75/79, 94,9 %)	79 Katzen	Immunfluoreszenz	PALTRINIERI et al., 1999
Aszites oder Thoraxerguss (80/109, 73,4 %)	109 Katzen	Immunfluoreszenz	HARTMANN et al., 2003
Aszites (9/9, 100,0 %), Thoraxerguss (1/1, 100,0 %)	10 Katzen	Immunfluoreszenz	LITSTER et al., 2013
Aszites oder Thoraxerguss (23/27, 85,2 %)	27 Katzen	IZC	FELTEN et al., 2017a
Erguss (Aszites 5/5, 100,0 %)	5 Katzen	RT-PCR	HERREWEGH et al., 1995
Aszites oder Thoraxerguss (11/12, 91,7 %)	12 Katzen	RT-PCR	GAMBLE et al., 1997
Aszites oder Thoraxerguss (5/5, 100,0 %)	5 Katzen	RT-PCR	HARTMANN et al., 2003
Aszites (17/18), Thoraxerguss (9/9, 100,0 %)	51 Katzen	RT-PCR	TSAI et al., 2011
Aszites (15/19, 94,4 %)	19 Katzen	RT-PCR	BANK-WOLF et al., 2014
Aszites (19/19, 100,0 %)	19 experimentell infizierte FIP-Katzen	RT-PCR	PEDERSEN et al., 2015
Aszites (21/23, 91,3 %), Thoraxerguss (9/9, 100,0 %), Perikarderguss (1/2, 50,0 %)	57 natürlich infizierte FIP-Katzen	RT-PCR	BARKER et al., 2017

Aszites (19/19, 100,0 %), Thoraxerguss (9/11, 81,8 %), beides (4/6, 66,7 %)	43 natürlich infizierte FIP-Katzen	RT-PCR	DOENGES et al., 2017
Aszites oder Thoraxerguss (34/35, 97,1 %)	38 natürlich infizierte FIP-Katzen	RT-PCR, Sequenzanalyse	FELTEN et al., 2017b
Aszites oder Thoraxerguss (32/49, 65,3 %)	64 natürlich infizierte FIP-Katzen	RT-PCR, S-Gen-Mutations-RT-PCR	FELTEN et al., 2017c
Aszites (11/14, 78,6 %), Thoraxerguss (5/5, 100,0 %), Perikarderguss (1/1, 100,0 %)	20 natürlich infizierte FIP-Katzen	RT-PCR	LONGSTAFF et al., 2017
Organe			
Leber, Lunge, Mesenteriallymphknoten, Milz, Netz (Anzahl der Proben nicht bekannt)	7 experimentell infizierte FIP-Katzen	Immunfluoreszenz	WEISS & SCOTT, 1981b
Darm (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon), Mesenteriallymphknoten, Peritoneum (Anzahl der Proben nicht bekannt)	2 experimentell infizierte FIP-Katzen (SPF)	Immunfluoreszenz	STODDART et al., 1988
Leber, Meningen, Milz, Netz, Nieren, Peritoneum, Pleura (Anzahl der Proben nicht bekannt)	23 Katzen	IHC	KIPAR et al., 1998a

Leber, Lymphknoten, Milz, Netz, Niere, Peritoneum, Zentralnervensystem (Anzahl der Proben nicht bekannt)	48 Katzen	IHC	PALTRINIERI et al., 1998
Mesenteriallymphknoten (Anzahl der Proben nicht bekannt)	12 Katzen (davon 3 SPF)	IHC	KIPAR et al., 1999
Gehirn, Mesenteriallymphknoten, Milz, Nieren, Peritoneum, Pleura, Thymus (Anzahl der Proben nicht bekannt)	24 Katzen (davon 7 SPF)	IHC	KIPAR et al., 2001
Leber (14/25, 56,0 %), Nieren (6/25, 24,0 %)	25 Katzen	IHC	GIORDANO et al., 2005
Zentralnervensystem (3/4, 75,0 %)	4 Katzen	IHC	WANG et al., 2018
Darm, Leber, Lunge, Milz, Nieren (Anzahl der Proben nicht bekannt)	94 Katzen	RT-PCR	BENETKA et al., 2004
Knochenmark (10/15, 66,7 %), Mesenteriallymphknoten (13/15, 86,7 %), Milz (9/15, 60,0 %)	15 Katzen	RT-PCR	KIPAR et al., 2006

Darm, Gehirn, Leber, Lunge, Lymphknoten, Milz, Netz, Nieren, Pankreas, Perikard (43/45 von allen Proben, keine Angaben zu einzelnen Organen vorliegend, 95,6 %)	27 Katzen	RT-PCR und Sequenzanalyse	PORTER et al., 2014
Caecum, Herz, Ileum, Leber, Lunge, Mesenteriallymphknoten, Milz, Netz (Anzahl der Proben nicht bekannt)	19 Katzen	RT-PCR	PEDERSEN et al., 2015
Darm, Gehirn, Leber, Lunge, Lymphknoten, Milz, Netz, Nieren, Pankreas, Perikard (235/260 von allen Proben, keine Angaben zu einzelnen Organen vorliegend, 90,4 %)	57 Katzen	RT-PCR und Sequenzanalyse	BARKER et al., 2017
Darm, Herz, Leber, Lunge, Lymphknoten, Milz, Muskulatur, Nebennieren, Nieren, Pankreas, Schilddrüse (32/34 Katzen, keine Angaben zu einzelnen Organen oder Proben vorliegend, 94,1 %)	34 Katzen	RT-PCR	SANGL et al., 2018

Kot			
Kot (8/8, 100,0 %)	8 Katzen	RT-PCR	PEDERSEN et al., 2009
Kot (14/14, 100,0 %)	14 Katzen	RT-PCR	BANK-WOLF et al., 2014
Kot (19/19, 100,0 %)	19 Katzen	RT-PCR	PEDERSEN et al., 2015
Kot (13/16, 81,3 %)	15 Katzen	RT-PCR und Sequenzanalyse	PORTER et al., 2015
Kot oder Rektaltupfer (31/48, 64,6 %)	48 Katzen	RT-PCR und Sequenzanalyse	BARKER et al., 2017

2.2.1. Körperflüssigkeiten

Nachfolgend wird das Vorkommen von FCoV in Blut, Liquor cerebrospinalis, Augenkammerwasser sowie Erguss bei Katzen mit FIP erläutert. Der positive RT-PCR-Nachweis von FCoV aus Maulhöhlen- (4/16 positiv), Nasen- (4/15 positiv) und Konjunktivaltupfern (4/42 positiv) lässt auf das mögliche Vorkommen des Virus in geringer Menge in Speichel und Tränenflüssigkeit schließen (TSAI et al., 2011).

2.2.1.1. Blut

Blutproben können selbst bei schwer erkrankten, FIP-verdächtigen Patienten einfach gewonnen werden und stellen daher ein beliebtes Untersuchungsmaterial dar, das bereits Gegenstand vieler Studien war. Bereits Mitte der neunziger Jahre gelang in verschiedenen Studien der RT-PCR-Nachweis von FCoV in Vollblut, Serum oder Plasma von an FIP erkrankten Katzen (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995; GUNN-MOORE et al., 1998). Die Sensitivität der Methode war sehr unterschiedlich und reichte von 56,0 % (HERREWEGH et al., 1995) bis 91,0 % (GUNN-MOORE et al., 1998). Auch in späteren Studien wurden unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Sensitivität der RT-PCR erzielt; diese lagen eher niedriger im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen. Es wurden Sensitivitäten von 9,7 % (Serum und Plasma) (FELTEN et al., 2017c) 15,4 % (Serum), 28,6 % (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC)) (DOENGES et al., 2017) bis hin zu 53,0 % (Serum) (HARTMANN et al., 2003) erzielt. In einem Versuchsansatz mit experimentell mit FIPV infizierten SPF-Katzen, die anschließend an FIP erkrankten, konnte sogar in keiner der Vollblut- oder Plasmaproben FCoV mittels RT-PCR nachgewiesen werden (PEDERSEN et al., 2015). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass zellarme Materialien, wie Serum, weniger zum RT-PCR-Nachweis von FCoV geeignet sind. Weiterhin heben sie hervor, dass das Vorkommen von FCoV im peripheren Blut von an FIP erkrankten Katzen Schwankungen unterliegt.

Der Nachweis von FCoV-mRNA gilt als Beweis für das Vorkommen replizierender FCoV (KIPAR & MELI, 2014). Die mRNA konnte erfolgreich bei Katzen mit FIP in PBMC (SIMONS et al., 2005) nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigten, dass FCoV bei Katzen mit FIP häufiger und in größeren Mengen im peripheren Blut replizieren als bei Katzen ohne FIP. Eine Replikation in

geringerem Ausmaß ist jedoch auch bei Katzen, die nicht an FIP erkrankt sind, möglich (FISH et al., 2018).

2.2.1.2. Augenkammerwasser und Liquor cerebrospinalis

Weitere Körperflüssigkeiten, die auf das Vorkommen von FCoV bei an FIP erkrankten Katzen untersucht wurden, sind Augenkammerwasser und Liquor cerebrospinalis. Zur Untersuchung des Vorkommens von FCoV im Augenkammerwasser liegen zwei Studien vor, die einen RT-PCR-Nachweis durchführten (SANGL et al., 2016; BARKER et al., 2017). Zusätzlich untersuchten Sangl et al. (2016) die vorliegenden FCoV auf vorhandene S-Gen-Mutationen und konnten diese in 9,4 % der Fälle nachweisen (SANGL et al., 2016). Auch Barker et al. (2017) untersuchten das S-Gen nachgewiesener FCoV mittels Pyrosequenzierung. Es wurde jedoch nicht veröffentlicht, ob sich S-Gen-Mutationen in den FCoV aus Augenkammerwasser nachweisen ließen (BARKER et al., 2017). Ein anderer Ansatz zur Untersuchung des Augenkammerwassers auf das Vorkommen von FCoV ist die immunzytologische Untersuchung, bei der FCoV-Antigen innerhalb von Makrophagen angefärbt wird (FELTEN et al., 2018).

In einem Fallbericht von 2013 wurde erstmals FCoV-Antigen mittels IZC in Makrophagen im Liquor cerebrospinalis einer vier Monate alten Europäisch Kurzhaarkatze mit progressiv neurologischen Symptomen nachgewiesen (IVES et al., 2013). Die postmortem durchgeführte pathohistologische Untersuchung bestätigte das Vorliegen von FIP. In den Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis auf das Vorkommen von FCoV mittels RT-PCR von Doenges et al. (2016) wurden sowohl Katzen mit als auch ohne neurologische oder ophthalmologische Symptome eingeschlossen (DOENGES et al., 2016). Wurden bei der Ermittlung der Sensitivität der RT-PCR ausschließlich Patienten mit neurologischen oder ophthalmologischen Symptomen berücksichtigt, erhöhte sich die Sensitivität für das Stellen der Diagnose FIP auf diesem Weg von 42,1 % auf 85,7 %. Dies belegt, dass die Viruslast in den Läsionen und ihrer Umgebung am höchsten ist (DOENGES et al., 2016). Der von Ives et al. (2013) verwendete Ansatz des FCoV-Nachweises mittels IZC wurde in einer Studie mit 21 Liquorproben von an FIP erkrankten Katzen untersucht (IVES et al., 2013; GRUENDL et al., 2017).

2.2.1.3. Erguss

Das Vorkommen von FCoV im Erguss an FIP erkrankter Katzen konnte bereits

1978 bestätigt werden. Es liegt ein Fallbericht vor, in dem Aszites einer sieben Monate alten Katze mit spontaner FIP elektronenmikroskopisch untersucht wurde und dabei "Coronavirus-ähnliche Partikel" entdeckt wurden (HAYASHI et al., 1978). Nachfolgend wurde der FCoV-Nachweis mittels Immunfluoreszenz in verschiedenen Studien untersucht (PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003). Es ergaben sich Sensitivitäten für die Immunfluoreszenz von 57,0 bis 95,0 %. Eine neuere Studie von Litster et al. (2013) erreichte sogar eine Sensitivität von 100,0 % (LITSTER et al., 2013), jedoch lag die Spezifität in dieser Studie mit 71,0 % deutlich unter den 100,0 % der vorherigen Studien. Die Autoren führten das hohe Risiko für Kreuzkontaminationen im Rahmen der Untersuchung als mögliche Ursache für die niedrigere Spezifität an (LITSTER et al., 2013). Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen auch Felten et al. (2017), die 27 Ergussproben von an FIP erkrankten Katzen mittels IZC untersuchten (FELTEN et al., 2017a). Die Sensitivität für den IZC-Nachweis von FCoV-Antigen lag bei 85,2 % (23/27), die Spezifität lag jedoch nur bei 72,4 %. Für den FCoV-Nachweis in Erguss ist die RT-PCR spezifischer als die immunologischen Nachweismethoden. Seit Mitte der neunziger Jahre wurden mehrere Studien durchgeführt, welche das Vorkommen von FCoV im Erguss mittels RT-PCR bestätigten (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995; GAMBLE et al., 1997; HARTMANN et al., 2003). Neueren Studien gelang der FCoV-Nachweis mittels RT-PCR sowohl in Erguss von natürlich infizierten Katzen mit FIP (TSAI et al., 2011; DOENGES et al., 2017) als auch im Erguss von Katzen mit experimentell induzierter FIP (PEDERSEN et al., 2015).

Weiterhin legen neuere Studien ein besonderes Augenmerk auf den Nachweis mutierter FCoV im Erguss. Bank-Wolf et al. (2014) entdeckten FCoV mit mutierten 3c- und S-Genen im Erguss von FIP-Katzen (BANK-WOLF et al., 2014). Die S-Gen-Mutationen, die zuvor mit FIP in Verbindung gebracht worden sind (CHANG et al., 2012), wurden in weiteren Studien auch in den aus Erguss stammenden FCoV identifiziert. Felten et al. detektierten die S-Gen-Mutationen mittels zweier unterschiedlicher Ansätze, Sequenzanalyse und RT-PCR. In der ersten Studie konnten in 32 von 50 untersuchten Ergussproben FCoV mit S-Gen-Mutationen mittels Sequenzanalyse nachgewiesen werden (FELTEN et al., 2017c). In der zweiten Studie waren 24 von 35 Ergussproben in der RT-PCR positiv für FCoV mit

S-Gen-Mutationen (FELTEN et al., 2017b). Weitere Forschergruppen konnten das Vorkommen mutierter FCoV im Erguss von an FIP erkrankten Katzen ebenfalls bestätigen (BARKER et al., 2017; LONGSTAFF et al., 2017).

2.2.2. Organe

Das Vorkommen von FCoV innerhalb der Organe an FIP erkrankter Katzen wurde erstmals mittels Immunfluoreszenz bestätigt. FCoV konnten in Leber, Lunge, Mesenteriallymphknoten, Milz und Netz von Katzen mit experimentell induzierter FIP nachgewiesen werden (WEISS et al., 1980; WEISS & SCOTT, 1981a). Dieselbe Forschergruppe konnte in einem anderen Versuch mit Katzen, die ebenfalls an einer experimentell induzierten FIP litten, FCoV in unterschiedlichen Lokalisationen nachweisen. Die Anzahl der positiven Lokalisationen nahm zu mit fortschreitender Zeit p. i. FIPV wurde initial mittels Aerosol verabreicht und konnte an Tag 2 p. i. in Tracheobronchiallymphknoten, Lunge und Trachea nachgewiesen werden; an Tag 3 p. i. in Leber und Milz; an Tag 4 p. i. in Niere und Netz sowie anschließend in den Nasenmuscheln, abdominalen und thorakalen Lymphknoten, Thymus, Knochenmark, Ohrspeicheldrüse, Augen und Gehirn (WEISS & SCOTT, 1981b). Die Ergebnisse bestätigen die Fähigkeit von FIPV, sich systemisch auszubreiten und unterschiedliche Organe zu befallen. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz von Stoddart et al. (1988), welche bei einer Katze mit experimentell induzierter FIP FCoV in verschiedenen Lokalisationen (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, Mesenteriallymphknoten, Peritoneum) finden konnten (STODDART et al., 1988).

Im weiteren Verlauf wurde der Nachweis mittels Immunfluoreszenz von der IHC abgelöst. Der Nachweis des FCoV-Vorkommens in Organen mittels IHC gilt mittlerweile als Goldstandard, um die Diagnose FIP zu stellen (HARTMANN et al., 2003). Typische FIP-Läsionen zeichnen sich durch eine Vaskulitis oder Perivaskulitis unter Beteiligung von Plasmazellen, Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aus. Die IHC gilt als positiv, wenn in den an der Läsion beteiligten Makrophagen FCoV-Antigen detektiert werden kann (TAMMER et al., 1995; KIPAR et al., 1998b). In Tabelle 3 sind die Studien aufgeführt, denen ein positiver FCoV-Nachweis mittels IHC in verschiedenen Organen gelang (KIPAR et al., 1998b; PALTRINIERI et al., 1998; KIPAR et al., 1999b; KIPAR et al., 2001; GIORDANO et al., 2005; WANG et al., 2018).

FCoV in Organen können auch mittels RT-PCR nachgewiesen werden (BENETKA et al., 2004; KIPAR et al., 2006). Pedersen et al. (2015) arbeiteten den Unterschied zwischen Organen mit und ohne Läsionen bei Katzen mit experimentell induzierter FIP heraus. Sie wiesen FCoV in geringer Menge in Organen ohne Läsionen (Herzmuskel, Leber, Lunge, Niere, Popliteallymphknoten) und in großer Menge in Organen mit Läsionen (Mesenteriallymphknoten, Milz, Netz) nach (PEDERSEN et al., 2015). Weitere Studien wiesen neben FCoV allgemein auch mutierte FCoV mittels RT-PCR in unterschiedlichen Organen nach. Leider wurde in den Publikationen nicht genau aufgeführt, welche Organe positiv getestet wurden (PORTER et al., 2014; BARKER et al., 2017) oder es wurden in einer Studie Schnitte von mehreren, in Paraffin eingebetteten Organen untersucht, so dass eine Zuordnung der positiven Ergebnisse zu einzelnen Organen nicht möglich war (SANGL et al., 2018). In der Studie von Porter et al. (2014) konnten in 39 der 43 positiven Organproben die Aminosäuresubstitution M1058L mittels Pyrosequenzierung identifiziert werden. Im Pleuralgewebe einer weiteren Katze mit FIP wurde zudem die Aminosäuresubstitution S1060A identifiziert (PORTER et al., 2014). Sangl et al. (2018) konnten bei 23 der Katzen mutiertes FCoV mit der Aminosäuresubstitution M1058L nachweisen. Bei einer Katze lag sowohl mutiertes als auch nicht-mutiertes FCoV vor (SANGL et al., 2018). Barker et al. (2017) bestätigten in 196 der FCoV-positiven Organproben das Vorliegen der S-Gen-Mutationen mit der Aminosäuresubstitution M1058L und in 6 dieser Proben die Aminosäuresubstitution S1060A mittels Pyrosequenzierung.

2.2.3. Kot

Das Vorkommen von FCoV konnte sowohl im Kot von natürlich an FIP erkrankten Katzen als auch im Kot von Katzen mit experimentell induzierter FIP nachgewiesen werden (PEDERSEN et al., 2009; BANK-WOLF et al., 2014; PORTER et al., 2014; PEDERSEN et al., 2015; BARKER et al., 2017). Auch mutierte FCoV wurden im Kot von an FIP erkrankten Katzen nachgewiesen. Im ORF 3c der aus Kotproben isolierten FIPV lagen SNP und Deletionen vor (PEDERSEN et al., 2009; BANK-WOLF et al., 2014). Im S-Gen der aus Kotproben isolierten FIPV lagen die Aminosäuresubstitutionen M1058L und S1060A vor (BANK-WOLF et al., 2014; PORTER et al., 2014; BARKER et al., 2017). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kotkonsistenz (Durchfall oder geformter Kot) keinen Einfluss auf die darin enthaltene Viruslast hatte (PEDERSEN et al., 2009).

III. PUBLIKATION

Feline coronavirus with and without spike gene mutations detected by real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions in cats with feline infectious peritonitis

Laura Emmler¹, Sandra Felten¹, Kaspar Matiasek², Hans-Joerg Balzer³, Nikola Pantchev³, Christian Leutenegger⁴ and Katrin Hartmann¹

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

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

³IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

⁴IDEXX Laboratories Inc., West Sacramento, US

Der Artikel wurde am 16. November 2019 im Journal of Feline Medicine and Surgery online veröffentlicht.



Original Article

Feline coronavirus with and without spike gene mutations detected by real-time RT-PCRs in cats with feline infectious peritonitis

Journal of Feline Medicine and Surgery
1–9

© The Author(s) 2019

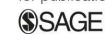
Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/1098612X19886671

journals.sagepub.com/home/jfm

This paper was handled and processed by the European Editorial Office (ISFM) for publication in JFMS



Laura Emmeler¹ , Sandra Felten¹, Kaspar Matiasek², Hans-Joerg Balzer³, Nikola Pantchev³, Christian Leutenegger⁴ and Katrin Hartmann¹

Abstract

Objectives Feline infectious peritonitis (FIP) emerges when feline coronaviruses (FCoVs) mutate within their host to a highly virulent biotype and the immune response is not able to control the infection. FCoV spike (*S*) gene mutations are considered to contribute to the change in virulence by enabling FCoV infection of and replication in macrophages. This study investigated the presence of FCoV with and without *S* gene mutations in cats with FIP using two different real-time RT-PCRs on different samples obtained under clinical conditions.

Methods Fine-needle aspirates (FNAs) and incisional biopsies (IBs) of popliteal and mesenteric lymph nodes, liver, spleen, omentum and kidneys (each $n = 20$), EDTA blood ($n = 13$), buffy coat smears ($n = 13$), serum ($n = 11$), effusion ($n = 14$), cerebrospinal fluid ($n = 16$), aqueous humour ($n = 20$) and peritoneal lavage ($n = 6$) were obtained from 20 cats with FIP diagnosed by immunohistochemistry. Samples were examined by RT-PCR targeting the FCoV *7b* gene, detecting all FCoV, and *S* gene mutation RT-PCR targeting mutations in nucleotides 23531 and 23537. The prevalence of FCoV detected in each sample type was calculated.

Results In 20/20 cats, FCoV with *S* gene mutations was present in at least one sample, but there was variation in which sample was positive. FCoV with mutations in the *S* gene were most frequently found in effusion (64%, 95% confidence interval [CI] 39–89), followed by spleen, omentum and kidney IBs (50%, 95% CI 28–72), mesenteric lymph node IBs and FNAs (45%, 95% CI 23–67), and FNAs of spleen and liver and liver IBs (40%, 95% CI 19–62).

Conclusions and relevance In these 20 cats with FIP, FCoVs with *S* gene mutations were found in every cat in at least one tissue or fluid sample. This highlights the association between mutated *S* gene and systemic FCoV spread. Examining a combination of different samples increased the probability of finding FCoV with the mutated *S* gene.

Keywords: FCoV; FIP; RT-PCR; *S* gene; IHC; immunohistochemistry

Accepted: 14 October 2019

Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) is one of the most important infectious diseases in cats, but its pathophysiology is still not fully understood. According to the internal mutation theory, FIP emerges when feline coronaviruses (FCoVs) mutate within their host to a highly virulent biotype^{1,2} and the host's immune system is not able to control the infection.^{3,4}

The exact nature of mutations that are responsible for the development of FIP is not known yet. A combination of different mutations on different genes is likely as mutations that have been identified to date do not qualify as

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

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

³IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

⁴IDEXX Laboratories, West Sacramento, CA, USA

Corresponding author:

Laura Emmeler, Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, Veterinärstr. 13, Munich, 80539, Germany
Email: lauraemmler@gmail.com

sole causes for FIP.⁵⁻⁸ This results in FCoV strains with different genome sequences in each cat with FIP,^{6,9,10} highlighting that there are multiple pseudo-strains of FCoV within an individual cat and that a single consistent mutation responsible for all cases of FIP does not exist. Following mutation, increased virulence of FCoV is the result of a change in viral cell tropism from enterocytes to macrophages and efficient replication within these cells.^{11,12} As the FCoV spike (S) protein plays a key role in viral cell entry,¹³ studies have investigated the mutations in the S gene as possible contributing reasons for the change in virulence.¹⁴⁻¹⁶ One study identified mutations in close proximity in the S gene's nucleotides 23531 and 23537, causing two different amino acid substitutions in the S protein.⁵ In contrast to other S gene mutations,¹⁴ mutations in nucleotide 23531 and 23537 were identified in 96% of FCoVs isolated from cats with FIP in that study. These mutations were not identified in faecal samples of clinically healthy control cats in that study; however, no organ samples from these control cats were analysed.⁵

Immunological staining of viral antigen within tissue lesions is considered the reference standard for diagnosing FIP,¹⁷⁻¹⁹ but it requires invasive sampling. Molecular methods, such as real-time RT-PCR, have evolved in the past years. RT-PCR detecting FCoV is only partially useful,²⁰⁻²² as viral RNA also circulates within asymptomatic FCoV-infected cats not suffering from FIP.^{20,23,24} Detection of the abovementioned FCoV S gene mutations⁵ might help in the diagnosis of FIP as studies examining detection of these S gene mutations via RT-PCR and/or pyrosequencing confirmed that these mutations are present in the majority of cats with FIP.²⁵⁻²⁷ However, the same mutations were also detected in cats without FIP.^{28,29} Therefore, the presence or detection of FCoV with S gene mutations in samples does not automatically equate to the presence of FIP. Sensitivity and specificity of diagnosing FIP by detecting these mutations in specific fluids (eg, serum or effusion) and tissue samples have already been investigated,²⁵⁻²⁹ but only a few studies compared different sample types.

The present study investigated 20 cats with FIP confirmed by tissue immunohistochemistry (IHC). The study aimed to evaluate the presence of FCoV with and without S gene mutations in a variety of different tissue and fluid samples that can be obtained under clinical conditions. Methods used were two different RT-PCRs using primers to detect all FCoV (7b gene RT-PCR) and primers detecting S gene mutations in nucleotides 23531 and 23537 (S gene mutation RT-PCR).

Materials and methods

Cats

Twenty cats were prospectively included (Table 1). All cats were presented for suspected FIP from 2015 to 2017

and were euthanased owing to poor general condition. FIP was confirmed by histopathology and immunostaining of FCoV antigen in tissue macrophages in all 20 cats. Only cats with positive IHC were included. IHC was performed using clone FIPV3-70 antibody (Linaris Medizinische Produkte GmbH) on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.³⁰ For signal detection, the streptavidin-biotin complex method was implemented (VECTASTAIN ABC Kit; Vector Laboratories). Negative controls were included in which the antibody was substituted by phosphate buffered saline (PBS). Samples were considered as positive if typical histological lesions were present (eg, granulomatous vasculitis or granulomatous inflammation in tissues) and FCoV antigen was detected in macrophages in those lesions. Tissues with positive IHC results are listed in Table 1.

Blood samples (EDTA blood, buffy coat smear, serum) were obtained ante mortem for diagnostic purposes in all cats. Effusion was obtained ante mortem for diagnostic and therapeutic purposes. Cerebrospinal fluid (CSF) and aqueous humour were obtained by paracentesis directly after euthanasia. Peritoneal lavage was performed post mortem with 20 ml/kg sodium chloride solution (0.9%) in cats that did not have effusion. Fine-needle aspirates (FNAs) and incisional biopsies (IBs) of all organs were obtained post mortem during necropsy, independently of the presence of lesions. IBs were stored in Eppendorf tubes with sodium chloride solution (0.9%). FNAs were layered on slides without staining. All samples were stored at 4°C until shipping. Refrigeration has no impact on RNA degradation but was performed for logistic reasons. Shipping was performed without refrigeration. Time between sampling and examination never exceeded 72h.

RT-PCRs

RT-PCRs were performed at a commercial laboratory (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany). RT-PCRs were performed with six quality controls. Extraction of total nucleic acid (TNA) was performed using QIAamp DNA Blood BioRobot MDx Kit on an automated Qiagen platform, according to the manufacturer's instructions. TNA was extracted from 200 µl of any kind of liquid diagnostic sample. EDTA blood and serum were applied without prior treatment following the extraction protocol of the manufacturer. Effusion, CSF, aqueous humour and peritoneal lavage samples were centrifuged and the sediment resuspended in 200 µl of remaining sample fluid introduced into the extraction procedure. Clinical material on slides was dissolved with 200 µl of PBS and the obtained suspension was used for TNA extraction.

In the case of tissue samples, 20 mg was pretreated with Proteinase K according to the manufacturer's protocol. Firstly, the 7b gene RT-PCR targeting FCoV 7b gene was performed to quantify the viral load.³¹ Secondly, the two RT-PCRs were performed targeting the M1058L

Table 1 Cats with feline infectious peritonitis (FIP) included in the study

Cat	Breed	Sex	Age	Effusion	Neurological or ocular signs	Tissues with FIP-typical lesions and positive IHC
1	DSH	MI	10 mo	Yes	Neurological and ocular signs	Liver, spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes
2	DSH	MN	1.5 y	Yes	No	Kidneys, omentum
3	DSH	MN	3 y	No	No	Spleen, omentum
4	Birman	MN	2.5 y	No	No	Kidneys, mesenteric lymph nodes
5	Birman	FI	7 mo	No	No	Liver, kidneys, mesenteric lymph nodes
6	DSH	MN	7 y	Yes	No	Liver, spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes, omentum
7	DSH	FI	1 y	Yes	No	Mesenteric lymph nodes
8	DSH	FI	5 mo	Yes	No	Mesenteric lymph nodes, omentum
9	DSH	MI	2 y	Yes	No	Liver, spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes, omentum
10	DSH	FI	6 mo	Yes	Neurological signs	Liver, omentum
11	DSH	MI	7 mo	Yes	No	Liver, spleen, mesenteric lymph nodes, omentum
12	DSH	MI	3 y	Yes	No	Liver, spleen, mesenteric lymph nodes, omentum
13	Persian	FI	1.5 y	No	No	Mesenteric lymph nodes
14	DSH	FI	1.5 y	Yes	No	Spleen
15	DSH	MN	6 y	No	No	Spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes, omentum
16	DSH	FI	5 mo	Yes	No	Spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes, omentum
17	DSH	MI	9 mo	Yes	No	Liver, spleen, mesenteric lymph nodes, omentum
18	Mix	FI	6 mo	No	Ocular signs	Spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes, omentum
19	DSH	MN	10 mo	Yes	No	Mesenteric lymph nodes, omentum
20	DSH	MN	14 y	Yes	No	Mesenteric lymph nodes, omentum

IHC = immunohistochemistry; DSH = domestic shorthair; MI = male intact; MN = male neutered; FI = female intact; mo = months; y = years

and S1060A single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the fusion peptide of the S protein (IDEXX Laboratories, unpublished data). The S gene mutation RT-PCRs allow the typing of an FCoV strain based on the presence or absence of one of two SNPs within the fusion peptide of the S gene. The paired S gene mutation RT-PCRs were previously validated analytically using synthetic DNA positive controls (IDT DNA), as well as clinically using samples collected from cats originally used to identify the two S gene mutations: (1) FCoV-infected and shedding, but otherwise healthy; and (2) affected by FIP.³²

Additional studies have evaluated RT-PCR detection of FCoV mutations in paraffin-embedded tissues and effusion from cats with confirmed FIP.^{27,33} Briefly, highly

specific hydrolysis probes were used, detecting either the mutation at position 3174 (A→C/T) or 3180 (T→G) on the FCoV genome, corresponding to amino acid positions 1058 and 1060, nucleotide 23531 and 23537, and M1058L and S1060A of reference sequence FJ938051, respectively, or non-mutated sequences by using an allelic discrimination approach (IDEXX Laboratories, unpublished data). Probes for mutated and non-mutated S gene sequences were fluorophore-labelled (6-FAM and VIC, respectively). Results were analysed detecting the 6-FAM:VIC (mutated:non-mutated) fluorescence ratio emitted by the hydrolysis probes.

S gene mutation RT-PCR was considered positive for either mutation when fluorescence in the mutation probe was at least two-fold higher than in the non-mutated

probe. *S* gene mutation RT-PCR was classified as negative if: (1) no FCoV was detected; (2) FCoV without one of the two *S* gene mutations was detected; (3) FCoV load was below the cut-off of 1.5 million RNA equivalents per ml, which did not allow a successful differentiation of the FCoV strains via *S* gene mutation RT-PCR; or (4) no further differentiation via *S* gene mutation RT-PCR was possible despite a high FCoV load (above 1.5 million RNA equivalents per ml of sample). *S* gene mutation RT-PCR was considered as positive if: (1) FCoV with a mutated *S* gene (either mutation in nucleotide 23531 or 23537); or (2) both mutated and non-mutated *S* genes were detected in the same sample.

Data analysis

The prevalence of positive results for *7b* gene RT-PCR and *S* gene mutation RT-PCRs in different tissues and body fluids were calculated by dividing the number of positive results by the total number of examined samples of that specific tissue or fluid. Ninety-five per cent confidence intervals (CIs) were calculated.

Results

FCoV with a mutated *S* gene was detected in all 20 cats in at least one tissue or fluid. The type of samples with a positive *S* gene mutation RT-PCR result differed from cat to cat (Tables 2 and 3). The prevalence of FCoV with and without a mutated *S* gene detected by RT-PCR in each tissue and fluid are listed in Table 4. *S* gene mutation RT-PCR was less commonly positive than *7b* gene RT-PCR. *S* gene mutation RT-PCR was most commonly positive in effusion (64.3%). Serum samples and buffy coat smears showed no positive results for *S* gene mutation RT-PCR in any cats. The percentages of positive results of both RT-PCRs were similar or even identical for FNAs and IBs in intra-abdominal organs. All samples positive in *S* gene mutation RT-PCRs had the mutation in nucleotide 23531; in none of the examined samples was a mutation in nucleotide 23537 present.

The probability of finding FCoV with *S* gene mutations in an individual cat increased when specific samples were combined for analysis. Combining different organ IBs (mesenteric lymph nodes, liver, spleen, omentum, kidneys), which can be collected in a patient during laparotomy, increased the probability of finding FCoV with a mutated *S* gene to up to 80.0%. When only samples obtained by minimally invasive techniques (EDTA blood, effusion if present, fine-needle aspiration of mesenteric lymph nodes, liver, spleen) were considered, the probability of finding FCoV with mutated *S* gene increased to up to 70.0% in a patient with effusion and to up to 60.0% in a patient without effusion.

In four cats, a high FCoV load was detected by *7b* gene RT-PCR in up to seven different sample types, but no further differentiation was possible by *S* gene

mutation RT-PCR; therefore, these samples were considered as negative for *S* gene mutations.

Discussion

This study investigated the presence of FCoV with and without *S* gene mutations in different tissue and body fluid samples from cats with IHC-confirmed FIP via real-time RT-PCR.

The study was able to confirm results of previous studies, in which FCoV with mutated *S* gene were detected in effusion but not in serum or plasma from cats with FIP.^{25–27} The prevalence of FCoV with *S* gene mutations detected by RT-PCR was 64.3% in effusion, which is similar to the results of other studies (68.6% and 65.3%, respectively),^{25,27} while in one study, the prevalence was even higher (85.0%).²⁶ Other fluids examined (EDTA blood, peritoneal lavage, buffy coat smears, CSF, aqueous humour) showed only low-to-moderate numbers of positive RT-PCR results for FCoV with and without *S* gene mutations. Earlier studies obtained similar results.^{27,34,35} As only 3/20 patients of this study's population suffered from ocular or neurological symptoms, a higher prevalence of FCoV with and without *S* gene mutations might be expected in CSF or aqueous humour of patients with corresponding signs. In a previous study examining CSF, the prevalence of all FCoV detected by RT-PCR increased from 42.1% in all cats to 85.7% when considering only cats with neurological or ocular signs.³⁶ In the present study, FCoV with a mutated *S* gene was detected in the CSF of both cats with neurological signs.

The study was also able to confirm previous results regarding the prevalence of the two different *S* gene mutations investigated. In the present study, only *S* gene mutation in nucleotide 23531 (resulting in amino acid substitution M1058L) was identified; *S* gene mutation in nucleotide 23537 (resulting in amino acid substitution S1060A) was not identified in any of the examined samples. Already, when those specific *S* gene mutations were detected for the first time, amino acid substitution M1058L was more common ($n = 108/118$) than S1060A ($n = 5/118$) in all examined FCoVs.⁵ Later studies confirmed these findings and only detected few^{25–27} or no FCoV at all with S1060A.³³ As such, M1058L is the more common *S* protein substitution, which is also reflected by the results of the present study.

The present study detected a higher number of samples with FCoV by *7b* gene RT-PCR (detecting any FCoV) than by *S* gene mutation RT-PCR (detecting FCoV with mutated *S* gene) as only those positive in *7b* gene RT-PCR were analysed by *S* gene mutation RT-PCR. For example, *7b* gene RT-PCR was commonly positive in intra-abdominal organs (mesenteric lymph nodes, liver, spleen, kidneys, omentum; prevalence of all FCoV 80–95%). This is in accordance with other studies, in which

Table 2 Results of *7b* gene and *spike* gene mutation RT-PCRs in different tissues

Cat	Sample	Popliteal lymph node	Mesenteric lymph node	Liver	Spleen	Omentum	Kidneys
1	FNA	M1058L*	Neg [†]	M1058L	Low [‡]	–	–
	IB	Low	Low	Low	Low	M1058L	M1058L
2	FNA	Low	M1058L	Low	M1058L	–	–
	IB	Low	M1058L	Low	Low	M1058L	Low
3	FNA	Neg	M1058L	Neg	Neg	–	–
	IB	Neg	M1058L	Neg	Neg	Neg	Neg
4	FNA	Low	Neg	Low	Low	–	–
	IB	Mixed FCoV [§]	Neg	Neg	Neg	Low	Mixed FCoV
5	FNA	Low	Low	Low	Low	–	–
	IB	Neg	Low	M1058L	Low	Low	Low
6	FNA	Neg	Low	M1058L	M1058L	–	–
	IB	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L
7	FNA	Low	Low	Low	Low	–	–
	IB	Neg	Non-mutated <i>S</i> gene [¶]	Low	Low	Low	Neg
8	FNA	Low	High [⊗]	High	High	–	–
	IB	Low	High	Low	M1058L	M1058L	Mixed FCoV
9	FNA	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L	–	–
	IB	Low	M1058L	Mixed FCoV	Mixed FCoV	M1058L	Low
10	FNA	Low	Low	Low	Low	–	–
	IB	M1058L	High	Low	High	Low	M1058L
11	FNA	Neg	M1058L	Mixed FCoV	M1058L	–	–
	IB	Neg	M1058L	M1058L	M1058L	Low	M1058L
12	FNA	Low	M1058L	M1058L	M1058L	–	–
	IB	Low	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L
13	FNA	Neg	Mixed FCoV	Neg	Neg	–	–
	IB	Low	High	Neg	Neg	Neg	Neg
14	FNA	Neg	Low	Low	Neg	–	–
	IB	Neg	Low	Neg	Neg	Low	Low
15	FNA	Neg	Neg	Neg	Neg	–	–
	IB	Neg	Low	Low	Mixed FCoV	Mixed FCoV	Non-mutated <i>S</i> gene
16	FNA	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L	–	–
	IB	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L	M1058L
17	FNA	Neg	Mixed FCoV	Mixed FCoV	Mixed FCoV	–	–
	IB	Mixed FCoV	M1058L	Mixed FCoV	Mixed FCoV	Mixed FCoV	Mixed FCoV
18	FNA	Low	High	Low	Low	–	–
	IB	Low	High	High	High	High	High
19	FNA	Low	M1058L	Mixed FCoV	Mixed FCoV	–	–
	IB	Mixed FCoV	Mixed FCoV	M1058L	Mixed FCoV	Mixed FCoV	Mixed FCoV
20	FNA	Low	Low	Low	Low	–	–
	IB	Low	Low	Low	Mixed FCoV	Low	Low

*M1058L = positive *S* gene mutation RT-PCR resulting in amino acid substitution M1058L

[†]Neg = negative *7b* gene RT-PCR

[‡]Low = positive *7b* gene RT-PCR with viral load below cut-off (therefore no further differentiation possible)

[§]Mixed FCoV = feline coronavirus with and without *S* gene mutations

[¶]Non-mutated *S* gene = positive *7b* gene RT-PCR but negative *S* gene RT-PCR

[⊗]High = positive *7b* gene RT-PCR with high viral load but no further differentiation possible

FNA = fine-needle aspirate; IB = incisional biopsy

omentum, mesenteric lymph nodes and spleen were identified as the organs with highest viral loads.³⁷

In contrast, the percentage of samples positive in *S* gene mutation RT-PCR only ranged from 40% to 50% in intra-abdominal organs. One reason for this could be

the presence of *S* gene mutations that remain undetected by RT-PCR because of a FCoV load below the cut-off for successful differentiation. This has already been observed in other studies using the same method.^{27,33} Another reason could be the absence of the particular *S*

Table 3 Results of *7b* gene and *spike* gene mutation RT-PCRs in different body fluids

Cat	EDTA blood	Buffy coat smear	Serum	Effusion	Peritoneal lavage	CSF	Aqueous humour
1	Low*	Low	–	Low	–	M1058L [†]	M1058L
2	M1058L	Low	Low	M1058L	–	Neg [‡]	Neg
3	–	Neg	–	–	Neg	–	Neg
4	Neg	Neg	Neg	–	Mixed FCoV [§]	Mixed FCoV	Neg
5	Low	Low	Neg	–	Neg	Low	Neg
6	M1058L	Neg	–	M1058L	–	M1058L	Neg
7	Low	Neg	Low	Mixed FCoV	–	Neg	Neg
8	Low	Low	Low	M1058L	–	Neg	Low
9	Low	–	–	M1058L	–	Low	Neg
10	Low	Low	Low	High [¶]	–	M1058L	High
11	–	–	–	Neg	–	M1058L	Neg
12	–	Neg	–	M1058L	–	–	Neg
13	Neg	–	–	–	Neg	Neg	Neg
14	–	–	Neg	Neg	–	M1058L	Neg
15	Neg	Neg	Neg	–	Neg	M1058L	Mixed FCoV
16	–	–	Neg	M1058L	–	Neg	Neg
17	–	–	–	Mixed FCoV	–	Neg	Neg
18	M1058L	Low	Neg	–	Low	High	Low
19	Low	Low	Neg	Mixed FCoV	–	–	Neg
20	–	–	–	Low	–	–	Neg

*Low = positive *7b* gene RT-PCR with viral load below cut-off (therefore no further differentiation possible)

[†]M1058L = positive *S* gene mutation RT-PCR resulting in amino acid substitution M1058L

[‡]Neg = negative *7b* gene RT-PCR

[§]Mixed FCoV = feline coronavirus with and without *S* gene mutations

[¶]High = positive *7b* gene RT-PCR with high viral load but no further differentiation possible

CSF = cerebrospinal fluid

Table 4 Percentages of positive results of RT-PCR detecting feline coronavirus without (*7b* gene RT-PCR) and with *spike* gene mutations (*S* gene mutation RT-PCR) in different tissues and body fluids and of immunohistochemistry (IHC) in different tissues

Sample		n	<i>7b</i> gene RT-PCR (%)	<i>S</i> gene mutation RT-PCR (% [95% CI])	IHC (%)
Popliteal lymph node	FNA	20	65	15 (0–30.6)	–
	IB	20	70	30 (9.9–50.1)	NA
Mesenteric lymph node	FNA	20	85	45 (23.2–66.8)	–
	IB	20	95	45 (23.2–66.8)	80
Liver	FNA	20	85	40 (18.5–61.5)	–
	IB	20	80	40 (18.5–61.5)	60
Spleen	FNA	20	80	40 (18.5–61.5)	–
	IB	20	80	50 (28.1–71.9)	75
Omentum	IB	20	90	50 (28.1–71.9)	70
Kidneys	IB	20	85	50 (28.1–71.9)	45
EDTA blood		13	76.9	23.1 (0.2–46.0)	–
Buffy coat smear		13	53.9	0	–
Serum		11	36.4	0	–
Effusion		14	85.7	64.3 (39.2–89.4)	–
Peritoneal lavage		6	33.3	16.7 (0–46.5)	–
CSF		16	62.5	43.8 (19.4–68.1)	–
Aqueous humour		20	25	10 (0–23.1)	–

CI = confidence interval; FNA = fine-needle aspirate; IB = incisional biopsy; NA = not available; CSF = cerebrospinal fluid

gene mutations examined here and the presence of other mutations involved in FIP pathogenesis instead.^{6,8,9,14,15,38,39} Some other mutations, such as in the *3c* gene, have been discussed as playing a role in FIP pathogenesis, but a clear causal relationship to FIP still has not been identified.^{6,7,40,41} Most likely, a combination of different mutations leads to the FCoV virulence change and, ultimately, to the development of FIP. As such, some of the cats in the present study might have experienced other mutations in their viral genome and therefore had negative results in *S* gene mutation RT-PCR.

Infection with serotype II FCoV could be another reason for a negative *S* gene mutation RT-PCR despite a high viral load, as *S* gene mutation RT-PCR is specific for serotype I only. Serotype II is not as common as serotype I in central European cats,⁴² but studies showed that mono-infection with serotype II occurs in cats with FIP, as does a concurrent infection with both serotypes.^{43,44} Multiple mutations in the *S* gene of serotype II FCoV that contribute to FIP development have previously been identified.¹⁶ Furthermore, mutations or sequence variations occurring at the primer binding site could cause negative *S* gene mutation RT-PCR results.

These reasons could explain the negative results in four cats (numbers 8, 10, 13, 18) in which FCoV load was high in some samples, but FCoV with *S* gene mutations was not detected. Interestingly, although *S* gene mutation RT-PCR was negative despite a high virus load in one sample, FCoV with *S* gene mutation or mixed FCoV (both FCOVs with and without *S* gene mutations) were detected in at least one different tissue or fluid in all of the four cats. For example, cat 18 had a high FCoV load in multiple organ samples, but *S* gene mutation RT-PCR was negative in these samples. However, FCoV with mutated *S* gene was detected in EDTA blood. This cat had histological lesions typical for FIP and positive IHC in the majority of organs, which confirms that FIP was present. These findings emphasise that a concurrent infection with different FCoV strains (non-mutated and mutated) is obviously possible and that in terms of virus kinetics, the process of evolving FIP in a patient is not a stable state.

The fact that non-mutated FCoV was detected in mesenteric lymph nodes and kidneys of cats 7 and 15 also highlights fluctuating virus kinetics. It is either possible that the non-mutated FCoV detected was circulating non-mutated FCoV that had already been present in these cats before FIP evolved or that a superinfection with non-mutated FCoV had occurred which led to systemic spread of non-mutated FCoV as described previously.²⁴ Detection of mutated and non-mutated FCoV within one cat in the present study confirms that coexistence of varying FCoV strains is common within one animal. Those findings have to be considered when performing RT-PCR. A 'negative' result of the *S* gene mutation RT-PCR does not rule out that the cat has FIP.

Furthermore, the present study investigated which sample types (IBs, FNAs) are appropriate for virus detection. Percentages of positive RT-PCR results were similar for FNAs and IBs in most intra-abdominal organs and identical in mesenteric lymph nodes and liver for *S* gene mutation RT-PCR and in spleen for *7b* gene RT-PCR. This is an unexpected but important result, as obtaining an IB is highly invasive and usually cannot be performed without anaesthesia. An earlier study examined whether FNA and tissue biopsies taken with a needle core device of liver and kidneys would be equally useful for diagnosing FIP via immunostaining (IHC or immunocytochemistry) and, in contrast to the findings of the present study, reported that sensitivities of immunostaining in the minimally invasive FNA and tissue biopsies were not satisfactory (11–31%).⁴⁵ In the present study, the percentage of positive *7b* gene RT-PCR results in both FNA and IB was similar to or sometimes even higher than the percentage of positive IHC in the respective organs (Table 4). This demonstrates the advantage of RT-PCR detecting small amounts of virus,³¹ whereas immunostaining requires more material and intact cells. Of course, histopathology and IHC, which are performed in combination, have the advantage of giving indicators to the presence of other disease processes and not just presence or absence of FCoV. But when only minimally invasive sampling is possible and cytology is non-diagnostic, RT-PCR should be preferred over immunostaining to detect FCoV. Another advantage of FNA is the possibility of targeting various locations; for example, ultrasound-guided sampling of several lesions or regions within organs. This is beneficial, as virus distribution can be inhomogeneous within an organ.

One limitation to this study was the fact that collection of some samples occurred post mortem. Samples collected ante mortem might have provided higher amounts of viable viral RNA. Furthermore, unclassified FCoV strains detected by *7b* gene RT-PCR (eg, in cats with high viral loads but negative *S* gene mutation RT-PCR) were not further analysed by an RNA sequencing approach, so it is unknown whether and which other mutations might have been present. Next generation sequencing of the *S2* region would be very valuable in the future, in order to obtain insights into other possible mutations involved in FIP pathogenesis.

Conclusions

FCoVs with mutated *S* genes were detected in all examined cats with FIP in at least one tissue or body fluid. Serum and buffy coat smears were the only sample types in which FCoV with mutated *S* gene was never detected. The prevalence of FCoV with a mutated *S* gene was highest in effusion. Non-mutated and mixed FCoV infections were detected in some cats, highlighting the possibility that several FCoV strains can be present within one host.

Considering FCoV detection, 7b gene RT-PCR can be an alternative to IHC in tissues with histopathological changes consistent with FIP. In this study, it provided a higher number of positive results for FCoV than IHC. Furthermore, it can be used on samples obtained by minimally invasive techniques if tissue biopsies and thus IHC is not possible.

Author note Part of the results were presented as an oral presentation at the 26th annual meeting 'Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik' of the German Veterinary Society (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft) in Hanover, Germany, 2–3 February 2018.

Conflict of interest Christian Leutenegger was Director of Molecular Diagnostics at IDEXX Laboratories, Sacramento. Hans-Joerg Balzer is Head of Molecular Diagnostics at IDEXX Laboratories, Ludwigsburg. Nikola Pantchev is employed at IDEXX Laboratories, Ludwigsburg. The RT-PCR used in this study was performed by IDEXX Ludwigsburg. However, IDEXX was not involved in study design, in collection and interpretation of data, or in the decision to submit the manuscript for publication. There is no commercial conflict of interest. The study solely served scientific purposes. The authors declare no competing interests.

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

Ethical approval This study was approved by the ethics committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München (#54-10-16-2015).

Informed consent Informed consent (either verbal or written) was obtained from the owner or legal custodian of all animal(s) described in this study for the procedure(s) undertaken. No animals or humans are identifiable within this publication, and therefore additional informed consent for publication was not required.

ORCID iD Laura Emmler  <https://orcid.org/0000-0002-9085-8945>

References

- Vennema H, Poland A, Foley J, et al. **Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses.** *Virology* 1998; 243: 150–157.
- Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, et al. **Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus.** *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1445–1452.
- Addie DD, Kennedy LJ, Ryvar R, et al. **Feline leucocyte antigen class II polymorphism and susceptibility to feline infectious peritonitis.** *J Feline Med Surg* 2004; 6: 59–62.
- Kipar A, Meli ML, Failing K, et al. **Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection.** *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 112: 141–155.
- Chang HW, Egberink HF, Halpin R, et al. **Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence.** *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1089–1095.
- Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, et al. **Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats.** *Virus Res* 2012; 165: 17–28.
- Bank-Wolf BR, Stallkamp I, Wiese S, et al. **Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis.** *Vet Microbiol* 2014; 173: 177–188.
- Borschensky CM and Reinacher M. **Mutations in the 3c and 7b genes of feline coronavirus in spontaneously affected FIP cats.** *Res Vet Sci* 2014; 97: 333–340.
- Pedersen NC, Liu H, Dodd KA, et al. **Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis.** *Viruses* 2009; 1: 166–184.
- Barker EN, Tasker S, Gruffydd-Jones TJ, et al. **Phylogenetic analysis of feline coronavirus strains in an epizootic outbreak of feline infectious peritonitis.** *J Vet Intern Med* 2013; 27: 445–450.
- Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, et al. **Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein.** *J Virol* 2005; 79: 14122–14130.
- Dewerchin HL, Cornelissen E and Nauwynck HJ. **Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes.** *Arch Virol* 2005; 150: 2483–2500.
- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, et al. **The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex.** *J Virol* 2003; 77: 8801–8811.
- Licitra BN, Millet JK, Regan AD, et al. **Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus.** *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1066–1073.
- Lewis CS, Porter E, Matthews D, et al. **Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis.** *J Gen Virol* 2015; 96: 1358–1368.
- Shirato K, Chang HW and Rottier PJM. **Differential susceptibility of macrophages to serotype II feline coronaviruses correlates with differences in the viral spike protein.** *Virus Res* 2018; 255: 14–23.
- Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, et al. **Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis.** *J Vet Intern Med* 2003; 17: 781–790.
- Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, et al. **Diagnostic methods for feline coronavirus: a review.** *Vet Med Int* 2010; 809480. DOI: 10.4061/2010/809480.
- Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, et al. **Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis.** *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 65: 243–257.
- Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ and Harbour DA. **Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis.** *Vet Microbiol* 1998; 62: 193–205.

- 21 Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A, et al. **Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR.** *J Clin Microbiol* 1995; 33: 684–689.
- 22 Li X and Scott FW. **Detection of feline coronaviruses in cell cultures and in fresh and fixed feline tissues using polymerase chain reaction.** *Vet Microbiol* 1994; 42: 65–77.
- 23 Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, et al. **Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats.** *J Gen Virol* 2010; 91: 1698–1707.
- 24 Fish EJ, Diniz PPV, Juan YC, et al. **Cross-sectional quantitative RT-PCR study of feline coronavirus viremia and replication in peripheral blood of healthy shelter cats in Southern California.** *J Feline Med Surg* 2018; 20: 295–301.
- 25 Felten S, Weider K, Doenges S, et al. **Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose feline infectious peritonitis.** *J Feline Med Surg* 2017; 19: 321–335.
- 26 Longstaff L, Porter E, Crossley VJ, et al. **Feline coronavirus quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction on effusion samples in cats with and without feline infectious peritonitis.** *J Feline Med Surg* 2017; 19: 240–245.
- 27 Felten S, Leutenegger CM, Balzer HJ, et al. **Sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction detecting feline coronavirus mutations in effusion and serum/plasma of cats to diagnose feline infectious peritonitis.** *BMC Vet Res* 2017; 13: 228. DOI: 10.1186/s12917-017-1147-8.
- 28 Porter E, Tasker S, Day MJ, et al. **Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis.** *Vet Res* 2014; 45: 49. DOI: 10.1186/129-9716-45-49.
- 29 Barker EN, Stranieri A, Helps CR, et al. **Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis.** *Vet Res* 2017; 48: 60. DOI: 10.1186/s13567-017-0467-9.
- 30 Felten S, Matiasek K, Gruendl S, et al. **Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis.** *J Feline Med Surg* 2017; 19: 410–418.
- 31 Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, et al. **One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses.** *J Virol Methods* 1999; 77: 37–46.
- 32 IDEXX Laboratories Inc. **IDEXX FIP Virus RealPCR™ test validation studies.** www.idexx.com/FIPValidationStudies (2016, accessed July 26, 2019).
- 33 Sangl L, Matiasek K, Felten S, et al. **Detection of feline coronavirus mutations in paraffin-embedded tissues in cats with feline infectious peritonitis and controls.** *J Feline Med Surg* 2019; 21: 133–142.
- 34 Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, et al. **Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis.** *J Feline Med Surg* 2017; 19: 344–350.
- 35 Sangl L, Felten S, Bergmann M, et al. **Diagnostischer Nutzen der Mutations-PCR auf das feline Coronavirus unter Verwendung von Kammerwasser.** Proceedings of the 24th Annual Meeting for Internal Medicine and Clinical Laboratory Diagnostics of the German Veterinary Society; 2006 Jan 29–30; Berlin, Germany.
- 36 Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, et al. **Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs.** *J Feline Med Surg* 2016; 18: 104–109.
- 37 Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H, et al. **Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection.** *Vet Microbiol* 2015; 175: 157–166.
- 38 Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, et al. **Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene.** *J Gen Virol* 2010; 91: 415–420.
- 39 Hsieh LE, Huang WP, Tang DJ, et al. **3C protein of feline coronavirus inhibits viral replication independently of the autophagy pathway.** *Res Vet Sci* 2013; 95: 1241–1247.
- 40 Hora AS, Asano KM, Guerra JM, et al. **Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses?** *ScientificWorldJournal* 2013. DOI: 10.1155/2013/572325.
- 41 Hora AS, Tonietti PO, Taniwaki SA, et al. **Feline coronavirus 3c protein: a candidate for a virulence marker?** *Biomed Res Int* 2016. DOI: 10.1155/2016/8560691.
- 42 Kummrow M, Meli ML, Haessig M, et al. **Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1209–1215.
- 43 Benetka V, Kubber-Heiss A, Kolodziejek J, et al. **Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis.** *Vet Microbiol* 2004; 99: 31–42.
- 44 Li C, Liu Q, Kong F, et al. **Circulation and genetic diversity of feline coronavirus type I and II from clinically healthy and FIP-suspected cats in China.** *Transbound Emerg Dis* 2019; 66: 763–775.
- 45 Giordano A, Paltrinieri S, Bertazzolo W, et al. **Sensitivity of Tru-cut and fine needle aspiration biopsies of liver and kidney for diagnosis of feline infectious peritonitis.** *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 368–374.

IV. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine prospektive, klinische Studie, die das Vorkommen mutierter und nicht-mutierter FCoV in Katzen mit FIP mittels RT-PCR untersuchte. Gegenstand der Studie waren zwei verschiedene real-time RT-PCR. Zuerst wurde die 7b-Gen-RT-PCR angewandt, deren Primer das konservierte 7b-Gen von FCoV des Serotyp I detektierten und dadurch alle FCoV des Serotyp I (mutierte und nicht-mutierte) nachwiesen. Bei der zweiten RT-PCR, die aus allen 7b-Gen-RT-PCR-positiven Proben durchgeführt wurde, handelte es sich um die S-Gen-Mutations-RT-PCR, welche FCoV mit Mutationen an den Nukleotidpositionen 23531 und 23537 im S-Gen detektierte. Die untersuchten Materialien umfassten verschiedene Gewebe- (Feinnadelaspirate (FNA) und Inzisionsbiopsien (IB) der Popliteal- und Mesenteriallymphknoten, Leber und Milz sowie IB von Netz und Nieren) sowie Körperflüssigkeitsproben (EDTA-Vollblut, Serum, Buffy-Coat-Ausstriche, Liquor cerebrospinalis, Augenkammerwasser, Ergussflüssigkeit, Peritoneallavageflüssigkeit) von insgesamt 20 Katzen mit immunhistochemisch bestätigter FIP. Das Ziel der Studie war die Untersuchung des Vorkommens mutierter und nicht-mutierter FCoV in unterschiedlichen Lokalisationen bei Katzen mit FIP.

Die RT-PCR ist eine gut geeignete Methode zum Nachweis von FCoV in verschiedenen Proben eines Patienten. Betrachtet man die untersuchten Probenmaterialien im Einzelnen, lieferte die S-Gen-Mutations-RT-PCR im Erguss die meisten positiven Ergebnisse (64,3 %). 12 von 14 untersuchten Ergussproben waren positiv in der 7b-Gen-RT-PCR (85,7 %). Davon wiesen jedoch 2 Ergussproben niedrige Viruslasten auf, welche eine weitere Differenzierung mittels S-Gen-Mutations-RT-PCR nicht erlaubten. Eine weitere Probe konnte trotz hoher Viruslast nicht mittels S-Gen-Mutations-RT-PCR weiter differenziert werden. Der Nachweis von FCoV mit mutiertem S-Gen in 64,3 % der Ergussproben korreliert mit den Beobachtungen anderer Studien, in denen die RT-PCR in Erguss Sensitivitäten von 65,3 % und 68,6 % aufwies (FELTEN et al., 2017b; FELTEN et al., 2017c). In der Studie von Longstaff et al. (2017) erzielte sie sogar eine Sensitivität von 85,0 % (LONGSTAFF et al., 2017). Bei Katzen, die ultrasonografisch keine oder eine nicht punktierbare Menge Erguss aufwiesen, wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Ziel dieses Vorgehens war es,

minimalinvasiv ein dem Aszites vergleichbares Probenmaterial zu gewinnen. Die Sensitivität beider RT-PCR lag jedoch in einem nicht zufriedenstellenden Bereich (33,3 % für die 7b-Gen-RT-PCR, 16,7 % für die S-Gen-Mutations-RT-PCR), weswegen Peritoneallavageflüssigkeit kein geeignetes Probenmaterial darstellt.

Der FCoV-Nachweis mittels 7b-Gen-RT-PCR verlief bei 76,9 % der untersuchten EDTA-Vollblutproben positiv. Eine weitere Differenzierung der FCoV im Vollblut konnte nur in 3 der 10 FCoV-positiven Katzen mittels S-Gen-Mutations-RT-PCR erfolgen. In diesen 3 Fällen war der Nachweis der Mutation im Nukleotid 23531 positiv (23,1 %). Grund für die geringere Anzahl positiver S-Gen-Mutations-RT-PCR war vermutlich die generell niedrige Viruslast im Blut. Dies zeigten auch die Untersuchungen von Serum- und Buffy-Coat-Proben. Hier war die 7b-Gen-RT-PCR bei 36,4 % und 53,9 % der Proben positiv. In jeder der positiv getesteten Proben waren lediglich geringe Viruslasten nachweisbar. Die S-Gen-Mutations-PCR verlief in keiner der untersuchten Serum- oder Buffy-Coat-Proben positiv. Ähnliche Ergebnisse erzielten frühere Studien (DOENGES et al., 2017; FELTEN et al., 2017b). Da Monozyten und Makrophagen die Zielzellen der FIPV darstellen (PEDERSEN et al., 2015), kann die Viruslast in Proben mit niedriger Zellularität, wie z. B. Serum, für die Analyse nicht ausreichen.

Die Problematik der niedrigen Zellularität und damit niedrigeren Viruslast trifft auch auf Augenkammerwasser als Probenmaterial zu. Der Anteil positiver RT-PCR-Ergebnisse war niedrig (25,0 % für 7b-Gen-RT-PCR, 10,0 % für S-Gen-Mutations-RT-PCR) und somit vergleichbar mit der einer früheren Studie, in der die Sensitivität der S-Gen-Mutations-RT-PCR bei 9,4 % lag (SANGL et al., 2016). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass nur ein Patient der Studienpopulation an einer Uveitis litt (Katze # 1). Bei dieser Katze war im Augenkammerwasser mutiertes FCoV nachweisbar. Bei der Katze mit ophthalmologischen Symptomen (Katze # 18, Anisokorie, Augenausfluss) ohne Uveitis-Hinweise waren lediglich FCoV in geringer Konzentration mittels 7b-Gen-RT-PCR nachweisbar. Bei Patienten mit ophthalmologischen Symptomen könnte also eine höhere Sensitivität erwartet werden.

Im Liquor cerebrospinalis verlief die 7b-Gen-RT-PCR bei 62,5 % der Proben, die S-Gen-Mutations-RT-PCR bei 43,8 % der Proben positiv. Jedoch waren nur zwei Katzen (Katze # 1 und # 10) der Studienpopulation neurologisch auffällig, sodass auch hier eine höhere Sensitivität der RT-PCR bei Patienten mit neurologischen

Störungen zu erwarten sein könnte. Dies zeigte sich bereits in den Untersuchungen von Doenges et al. (2016). Die Autoren wandten eine RT-PCR an, welche alle FCoV detektierte. Es wurde eine Sensitivität von 42,1 % im Liquor cerebrospinalis erreicht. Bei ausschließlicher Berücksichtigung der Patienten mit neurologischen oder ophthalmologischen Auffälligkeiten, stieg die Sensitivität der RT-PCR auf 85,7 % (DOENGES et al., 2016). In der vorliegenden Studie lag im Liquor beider neurologisch auffälliger Katzen mutiertes FCoV vor. Schlussfolgernd ist die Gewinnung und Analyse von Liquor bei Patienten mit neurologischen Auffälligkeiten zu empfehlen.

Verglichen mit den anderen Organen, waren die 7b-Gen- und S-Gen-Mutations-RT-PCR bei den FNA und IB der Popliteallymphknoten am seltensten positiv (65,0 % und 15,0 %). Die Popliteallymphknoten wurden aufgrund ihrer für die Probengewinnung einfach zu erreichende Lokalisation in die Auswahl der Studienmaterialien eingeschlossen. Ihre anatomische Position, fernab der Hauptherde der immunmedierten Entzündungen (PEDERSEN, 2009), erklärt jedoch die niedrige Viruslast innerhalb der Proben und dadurch die niedrige Prävalenz der FCoV. Pedersen et al. (2015) erzielten bei der 7b-Gen-RT-PCR-Untersuchung der Popliteallymphknoten von Katzen mit experimentell induzierter FIP ähnliche Ergebnisse (PEDERSEN et al., 2015). Daher stellen Proben der Popliteallymphknoten kein geeignetes Untersuchungsmaterial dar.

Vergleicht man die Ergebnisse der RT-PCR in den intraabdominalen Organen, lagen diese für FNA und IB in ähnlichen Bereichen (7b-Gen-RT-PCR 80,0 – 95,0 %; S-Gen-Mutations-RT-PCR 40,0 – 50,0 %). Im Fall von Mesenteriallymphknoten und Leber waren die Ergebnisse der S-Gen-Mutations-RT-PCR in FNA und IB sogar gleich (Mesenteriallymphknoten 45,0 %, Leber 40,0 %). Dies ist ein überraschendes Ergebnis. Die Gewinnung von IB mittels Probeparotomie ist invasiv und kann nicht ohne Allgemeinanästhesie erfolgen. Häufig erlaubt der instabile Allgemeinzustand an FIP erkrankter Katzen jedoch keine invasiven Maßnahmen. Die Untersuchung minimalinvasiv gewonnener Proben, wie z. B. durch FNA, ist daher oftmals zu bevorzugen. Ein weiterer Vorteil der FNA ist die Möglichkeit der flexiblen Beprobung unterschiedlicher Lokalisationen wie z. B. die ultraschallgestützte Punktion mehrerer Läsionen oder Regionen innerhalb eines Organs. Aufgrund der inhomogenen Virusverteilung innerhalb eines Organs kann dies von Vorteil sein. Eine frühere Studie untersuchte

die Sensitivität immunologischer Methoden zum Nachweis von FIP in minimalinvasiv gewonnenen Proben. Giordano et al. (2005) entnahmen Katzen mit FIP Leber- und Nierenbiopsien mittels FNA und weitleumiger Hohlbiopsienadeln (*Tru-Cut*[®]) und untersuchten diese mittels IZC und IHC. Die erreichten Sensitivitäten der immunologischen Nachweismethoden betragen in den minimalinvasiv gewonnenen Proben nur 11,0 bis 31,0 % (GIORDANO et al., 2005). Möglicherweise sind FNA von Mesenteriallymphknoten besser zum FCoV-Nachweis mittels IZC geeignet als FNA von Leber und Nieren. Eine neue Studie erzielte mit der IZC eine Sensitivität von 53,0 % in FNA von Mesenteriallymphknoten. Das Auftreten eines falsch positiven Ergebnisses bei einer Kontrollkatze mit Lymphom ließ die Autoren jedoch an der Spezifität der IZC zweifeln (FELTEN et al., 2019). In der vorliegenden Studie bestand zwischen den RT-PCR-Ergebnissen der minimalinvasiv gewonnenen FNA und der IB wenig Diskrepanz. Die 7b-Gen-RT-PCR war zudem häufiger positiv als die IHC in Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz, Nieren und Netz (7b-Gen-RT-PCR 80,0 – 95,0 %; IHC 45,0 – 80,0 %). Eine ähnlich hohe Sensitivität erzielte der RT-PCR-Nachweis von FCoV aus FNA der Mesenteriallymphknoten in einer früheren Studie (90,0 %) (DUNBAR et al., 2018). Die Detektion bereits geringer Virusmengen (GUT et al., 1999) stellt einen Vorteil der RT-PCR verglichen mit der IHC dar. Immunologische Nachweismethoden benötigen im Gegensatz zur RT-PCR mehr Material und intakte Zellen. Die Durchführung der IHC setzt eine invasive Probengewinnung voraus. Daher stellt die RT-PCR die zu bevorzugende Alternative dar, wenn der Zustand eines Patienten lediglich minimalinvasive Verfahren erlaubt. So fielen zwar in der Studie von Dunbar et al. (2018) die nachgewiesenen RNA-Mengen in den FNA-Proben geringer (3 – 199 ng/μl) aus verglichen mit den RNA-Mengen in IB (178 – 1855 ng/μl), die RT-PCR konnte jedoch in allen FNA-Proben erfolgreich durchgeführt werden (DUNBAR et al., 2018). Eine positive IHC in Geweben mit FIP-typischen Läsionen bleibt jedoch der Goldstandard der FIP-Diagnostik (KIPAR et al., 1998b; HARTMANN et al., 2003; SHARIF et al., 2010; FELTEN & HARTMANN, 2019). Da mit der IHC immer eine histologische Untersuchung der Gewebeproben einhergeht, ermöglicht sie nicht nur den Nachweis von FCoV, sondern auch eine ausführliche Beurteilung histologischer Gewebeveränderungen und somit den Ausschluss von Erkrankungen, die als Differentialdiagnosen von FIP in Frage kommen.

Die Interpretation von RT-PCR-Ergebnissen hinsichtlich einer möglichen FIP-Diagnose sollte mit Vorsicht erfolgen. Der alleinige FCoV-Nachweis innerhalb einer Katze bestätigt nicht das Vorliegen einer FIP. Nicht-mutierte FCoV kommen auch in Geweben und Körperflüssigkeiten von nicht an FIP leidenden Katzen vor (KIPAR et al., 2006). Auch das Vorkommen von FCoV mit S-Gen-Mutationen konnte bei Katzen, die nicht an FIP erkrankt waren, mittels Pyrosequenzierung nachgewiesen werden (PORTER et al., 2014; BARKER et al., 2017). RT-PCR bieten dennoch Möglichkeiten, die Verdachtsdiagnose einer FIP zu erhärten, wie z. B. durch die quantitative Messung der vorliegenden FCoV-Last. Es konnte gezeigt werden, dass die FCoV-Last bei Katzen mit FIP meist höher ist als bei gesunden, FCoV-infizierten Katzen (KIPAR et al., 2006). Weiterhin erhöht sich durch den Nachweis der S-Gen-Mutationen die Spezifität (BARKER et al., 2017). In einigen Studien erzielte die S-Gen-Mutations-RT-PCR eine sehr hohe Spezifität (95,8 – 100,0 %) für den Nachweis von FIP (FELTEN et al., 2017b; SANGEL et al., 2018). Die höhere Spezifität kommt dadurch zustande, dass die S-Gen-Mutationen FCoV dazu befähigen, Makrophagen zu infizieren und erfolgreich darin zu replizieren (ROTTIER et al., 2005; CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013). Die daraus resultierende systemische FCoV-Ausbreitung und –Replikation stellt eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung der FIP dar. Der Nachweis dieser Mutationen kann somit hilfreich sein, an FIP erkrankte Katzen von FCoV-infizierten, aber nicht an FIP erkrankten Katzen zu unterscheiden (PORTER et al., 2014; FELTEN et al., 2017b; LONGSTAFF et al., 2017). Andere Nachweismethoden, wie z. B. die immunologische Färbung von FCoV-Antigen in Makrophagen aus Erguss oder anderen Körperflüssigkeiten, wiesen im Vergleich zu Untersuchungen mittels RT-PCR häufiger falschpositive Ergebnisse auf (LITSTER et al., 2013; FELTEN et al., 2017a; GRUENDL et al., 2017; FELTEN et al., 2018). Daher ist die RT-PCR in diesen Probenmaterialien der IZC vorzuziehen. Optimalerweise beschränkt man sich dabei nicht auf den reinen FCoV-Nachweis, sondern führt zusätzlich eine Virusquantifizierung oder einen Nachweis von Mutationen durch. Bei der S-Gen-Mutations-RT-PCR handelt es sich somit um hilfreiches Untersuchungsverfahren, das auch in Fällen, in denen eine IHC nicht durchführbar ist, Hinweise auf eine mögliche FIP liefern kann. Bei einer Krankheit wie FIP, die ohne adäquate Behandlung tödlich verläuft, stellt die Spezifität den wichtigsten Parameter zur Beurteilung eines Tests dar. Nur so lässt sich eine zielgerichtete Therapie ermöglichen oder die Euthanasie fehldiagnostizierter Katzen vermeiden.

Vergleicht man die 7b-Gen-RT-PCR mit der S-Gen-Mutations-RT-PCR, lieferte letztere häufiger negative Ergebnisse. Grund dafür war, dass die S-Gen-Mutations-RT-PCR lediglich in den Proben mit positivem 7b-Gen-RT-PCR-Ergebnis durchgeführt wurde. Die 7b-Gen-RT-PCR erzielte in den untersuchten intraabdominalen Organen (Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz, Nieren, Netz) in 80,0 bis 95,0 % der untersuchten Proben ein positives Ergebnis für FCoV und war somit hochsensitiv. Dieses Ergebnis stimmt mit dem einer früheren Studie überein, in der Netz, Mesenteriallymphknoten und Milz als die Organe mit der höchsten FCoV-Last identifiziert wurden (PEDERSEN et al., 2015). Im Gegensatz dazu war die S-Gen-Mutations-RT-PCR in den 40,0 bis 50,0 % der intraabdominalen Organen positiv.

Dies kann mehrere Gründe haben. Ein möglicher Grund für den verringerten Erfolg der S-Gen-Mutations-RT-PCR war die geringe Viruslast in manchen Proben. Eine weiterführende Differenzierung zwischen FCoV mit und ohne S-Gen-Mutation ist bei unzureichender Menge an Analysematerial nicht sicher möglich. Dies wurde bereits in anderen Studien, die dieselbe Methode verwendeten, festgestellt (FELTEN et al., 2017b; SANGL et al., 2018). Weiterhin ist zu beachten, dass mit Hilfe der verwendeten S-Gen-Mutations-RT-PCR lediglich zwei bestimmte S-Gen-Mutationen in FCoV nachgewiesen werden können, nämlich jene, die die Aminosäuresubstitutionen M1058L oder S1060A verursachen. In den untersuchten Proben der vorliegenden Studie wurde dabei nur die S-Gen-Mutation M1058L nachgewiesen, was sich mit früheren Studienergebnissen deckt. Die Mutation M1058L war weitaus häufiger als die Mutation S1060A nachzuweisen (FELTEN et al., 2017b; FELTEN et al., 2017c; LONGSTAFF et al., 2017; SANGL et al., 2018). Die Beteiligung anderer FCoV-Mutationen oder einer Kombination verschiedener Mutationen bei der FIP-Pathogenese wurde in verschiedenen Studien untersucht. FCoV mit Mutationen im 3c-Gen (CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; HSIEH et al., 2013; BANK-WOLF et al., 2014; HORA et al., 2016) oder anderen Genen (PEDERSEN et al., 2009; LICITRA et al., 2013; LEWIS et al., 2015) werden durch die S-Gen-Mutations-PCR nicht nachgewiesen. Beim Vorliegen anderer FCoV-Mutanten liefert die S-Gen-Mutations-RT-PCR also ein negatives Ergebnis. Ein weiterer Grund für ein negatives Ergebnis der S-Gen-Mutations-RT-PCR bei einer Katze mit FIP ist das Vorliegen von Mutationen im Bereich der Primerbindungsstelle. Diese müssen nicht zwangsläufig mit der

Entstehung der FIP im Zusammenhang stehen, sondern verhindern lediglich das Ansetzen des RT-PCR-Primers. FCoV weisen aufgrund ihrer Natur als RNA-Viren und damit einhergehender Fehleranfälligkeit bei der Replikation eine hohe Mutationsrate auf (PEDERSEN et al., 2009; WOO et al., 2010; DESMARETS et al., 2016). Der Wirt versucht die Infektion zu eliminieren. Da Mutationen eine Möglichkeit liefern, diesem Immundruck zu entkommen, treten sie bei FCoV immer wieder auf (DESMARETS et al., 2016), gerade auch im Bereich des S-Gens, da das S-Protein eine entscheidende Rolle im Rahmen der Zellpenetration spielt (BOSCH et al., 2003).

Das Vorliegen anderer Mutationen könnte die negativen Ergebnisse der S-Gen-Mutations-RT-PCR bei vier Katzen (# 8, 10, 13, 18) erklären. In manchen Proben dieser Katzen lag zwar eine hohe FCoV-Last vor, FCoV mit S-Gen-Mutationen wurden in diesen Proben jedoch nicht nachgewiesen. Der Nachweis der FCoV mit den spezifischen S-Gen-Mutationen gelang allerdings bei allen vier Katzen in anderen Lokalisationen. Bei Katze # 18, zum Beispiel, lag in mehreren Organen eine hohe Viruslast bei negativer S-Gen-Mutations-RT-PCR vor. Mutiertes FCoV konnte jedoch in der EDTA-Blutprobe dieser Katze identifiziert werden. Im Rahmen der pathohistologischen Untersuchung wies Katze # 18 FIP-typische Läsionen sowie ein positives IHC-Ergebnis auf. Diese Befunde heben hervor, dass eine Koinfektion mit unterschiedlichen FCoV-Stämmen (sowohl nicht-mutierte als auch mutierte) innerhalb eines Patienten möglich ist und dass sich die Viruskinetik innerhalb eines Patienten bei der Entstehung und Manifestation von FIP nicht in einem stabilen Zustand befindet. Diese genetische Variabilität der FCoV wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben (PEDERSEN et al., 2009; PEDERSEN et al., 2012). Auch bei nicht an FIP erkrankten, FCoV-infizierten Katzen konnte eine Koinfektion mit unterschiedlichen FCoV-Stämmen nachgewiesen werden (ADDIE et al., 2003). Die hohe Mutationsrate der FCoV sowie ihre Fähigkeit zur Rekombination wirken dabei begünstigend. Mutanten des FCoV, welche sich nicht negativ auf die Viabilität des Virus auswirken, können sich dadurch durchsetzen. Durch Rekombination unterschiedlicher Stränge entstehen zusätzliche genetische Variationen. Bekanntestes Beispiel für die Rekombination ist FCoV-Serotyp II, welcher durch die Rekombination des Serotyp I mit kaninen Coronaviren entstand (HERREWEGH et al., 1998).

Eine Infektion mit FCoV vom Serotyp II kann in der vorliegenden Studie ebenfalls

der Grund für den Nachweis einer hohen Viruslast nicht näher identifizierbarer FCoV sein, da die S-Gen-Mutation-RT-PCR spezifisch für FCoV vom Serotyp I ist. Der Serotyp II ist in Zentraleuropa zwar nicht so häufig wie Serotyp I (KUMMROW et al., 2005), aber Studien zeigten, dass bei Katzen mit FIP sowohl Monoinfektionen mit Serotyp I oder Serotyp II, als auch Koinfektionen mit beiden Serotypen vorliegen können (BENETKA et al., 2004; LI et al., 2019).

Der Nachweis nicht-mutierter FCoV in den Mesenteriallymphknoten und Nieren der Katzen # 7 und # 13 belegt ebenfalls die Variabilität der vorkommenden FCoV-Stämme. Dabei kommen verschiedene Gründe in Frage, um den Nachweis nicht-mutierter FCoV bei Katzen mit FIP zu erklären. Möglicherweise zirkulierte nicht-mutiertes FCoV in der Katze bereits vor der Entwicklung der FIP (GUNN-MOORE et al., 1998; MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010) oder es erfolgte eine Superinfektion mit nicht-mutiertem FCoV, nachdem die Katze bereits FIP entwickelt hatte. Die FCoV-Superinfektion einer Katze mit FIP wurde bereits in der Literatur beschrieben (FISH et al., 2018) und es ist anzunehmen, dass sowohl eine Superinfektion als auch eine systemische Ausbreitung nicht-mutierter FCoV durch die durch FIP entstehende Immunsuppression begünstigt werden könnten. Der gleichzeitige Nachweis sowohl mutierter als auch nicht-mutierter FCoV innerhalb einer Katze mit FIP, welcher in der vorliegenden Studie gelungen ist, spricht dafür, dass eine Koexistenz unterschiedlicher Virusstämme innerhalb einer Katze häufig vorkommt. Diese Erkenntnis muss bei der Anwendung von RT-PCR berücksichtigt werden. Ein „negatives“ Ergebnis der S-Gen-Mutations-RT-PCR kann das Vorliegen von FIP bei einer Katze nicht ausschließen.

Um die Wahrscheinlichkeit, mutierte FCoV innerhalb einer Katze nachzuweisen, zu erhöhen und dadurch die diagnostische Sensitivität der S-Gen-Mutations-RT-PCR zu steigern, wird die Untersuchung einer Kombination unterschiedlicher Proben empfohlen. Tabelle 4 zeigt die Zusammenstellung der Empfehlungen. Für die Probenauswahl wurde berücksichtigt, mit welchen Symptomen sich eine Katze mit FIP darstellt und welche Proben aufgrund Verfügbarkeit und Zustand des Patienten gewinnbar sind. Nach wie vor bleibt die Diagnose der an FIP erkrankten Katzen ohne Erguss am herausforderndsten im Vergleich zu jenen Patienten, welche klassisch mit Körperhöhlenergüssen oder mit neurologischen oder ophthalmologischen Symptomen vorstellig werden (KIPAR et al., 1999a; PEDERSEN, 2009; SHARIF et al., 2010).

Tabelle 4: Probenempfehlungen bei Katzen mit Verdacht auf feline infektiöse Peritonitis und erwartete Sensitivität des Nachweises feliner Coronaviren mit Spike (S)-Gen-Mutationen mittels real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). (EDTA: Ethylendiamintetraacetat, FNA: Feinnadelaspirat, IB: Inzisionsbiopsie)

Patient	Proben	Sensitivität S-Gen- Mutations- RT-PCR
Katze mit Erguss	EDTA-Vollblut, Erguss, FNA von Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz	70,0 %
Katze mit neurologischen Symptomen	EDTA-Vollblut, Liquor cerebrospinalis, FNA von Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz	70,0 %
Katze mit ophthalmologischen Symptomen	EDTA-Vollblut, Augenkammerwasser, FNA von Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz	65,0 %
Katze ohne Erguss und ohne neurologische/ ophthalmologische Symptome	EDTA-Vollblut, FNA von Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz	60,0 %
Katze ohne Erguss und ohne neurologische/ophthalmologische Symptome in Laparotomie	IB von Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz, Netz, Nieren (ohne Nieren)	80,0 % (70,0 %)

Durch Kombination von EDTA-Vollblut sowie FNA von Mesenteriallymphknoten, Leber und Milz erreicht die S-Gen-Mutations-RT-PCR eine Sensitivität von 60,0 %, welche durch die Ergänzung von Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit

neurologischen Auffälligkeiten auf 70,0 % gesteigert werden kann. Weist der Patient Erguss auf, erhöht sich die Sensitivität der S-Gen-Mutations-RT-PCR bei gepoolter Untersuchung aller genannten Proben (EDTA-Vollblut, Ergussflüssigkeit, FNA von Mesenteriallymphknoten, Leber und Milz) ebenfalls auf 70,0 %. 70,0 % werden auch erreicht, wenn in der Laparotomie entnommene IB von Mesenteriallymphknoten, Leber, Milz und Netz untersucht werden. Die höchste Sensitivität für die S-Gen-Mutations-RT-PCR wird durch die zusätzliche Untersuchung einer Niereninzisionsbiopsie erzielt (80,0 %). Die Entnahme einer Niereninzisionsbiopsie geht jedoch mit dem Risiko von Blutungen einher (VADEN et al., 2005).

Die vorliegende Studie hatte mehrere Limitationen. Die Patientenakquise erfolgte nicht ausschließlich in der Medizinischen Kleintierklinik, sondern mit der Unterstützung anderer Tierkliniken sowie niedergelassener Tierärzte. Dies hatte zur Folge, dass nicht von allen in die Studienpopulation eingeschlossenen Katzen alle Proben gewonnen werden konnten. Weiterhin erfolgte die Gewinnung mancher Proben (z. B. Augenkammerwasser, Liquor, Peritoneallavage sowie der Organproben) *post mortem*. Dies könnte sich auf die Sensitivitäten der RT-PCR ausgewirkt haben, da *intra vitam* gewonnene Proben möglicherweise einen höheren Gehalt viraler RNA aufgewiesen hätten. Zudem erfolgte keine weitere Untersuchung jener FCoV-Stämme, die durch die 7b-Gen-RT-PCR detektiert wurden und keine mittels S-Gen-Mutations-RT-PCR identifizierbaren Mutationen aufwiesen. Mit der Durchführung einer Sequenzanalyse dieser FCoV-Stämme hätten weitere Informationen hinsichtlich Vorhandensein anderer Mutationen erlangt werden können.

Schlussfolgernd ergibt sich, dass FCoV mit mutiertem S-Gen in der vorliegenden Studie in jeder untersuchten Katze in mindestens einer Gewebe- oder Körperflüssigkeitsprobe nachweisbar war. Die Probenmaterialien Serum und Buffy-Coat-Ausstriche waren jedoch in keiner der untersuchten Katzen positiv für mutierte FCoV. Der gleichzeitige Nachweis mutierter und nicht-mutierter FCoV in manchen Katzen bestätigt das Vorhandensein unterschiedlicher FCoV-Stämme innerhalb eines Wirts. Zur FCoV-Detektion kann die 7b-Gen-RT-PCR eine Alternative zur IHC in Geweben mit histopathologisch nachgewiesenen, FIP-typischen Läsionen darstellen. Die 7b-Gen-RT-PCR lieferte in der vorliegenden Studie häufiger positive Ergebnisse als die IHC. Weiterhin ermöglicht sie die

FCoV-Detektion in minimalinvasiv gewonnenen Proben wie FNA. Dies ist von Vorteil, wenn die Entnahme von IB und somit die Durchführung einer IHC nicht möglich ist. Der zusätzliche Nachweis mutierter FCoV mittels S-Gen-Mutations-PCR kann weitere Hinweise auf eine mögliche FIP liefern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersuchte im Rahmen einer prospektiven, klinischen Studie das Vorkommen mutierter und nicht-mutierter feliner Coronaviren (FCoV) bei Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis (FIP). FIP entsteht, wenn FCoV innerhalb einer Katze zu einem hochvirulenten Pathotyp mutieren und die Infektion durch die Immunantwort des Wirts nicht zu kontrollieren ist. Mutationen im Spike (S)-Gen der FCoV tragen zur Steigerung der Virulenz bei, da sie die Infektion von und Replikation in Makrophagen ermöglichen. Die vorliegende Studie untersuchte das Vorkommen von FCoV mit und ohne S-Gen-Mutationen mittels zwei verschiedener real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR) in unterschiedlichen, unter Praxisbedingungen gewonnenen Probenmaterialien.

Es wurden Feinnadelaspirate (FNA) und Inzisionsbiopsien (IB) der Popliteal- und Mesenteriallymphknoten, Leber und Milz, sowie nur IB von Netz und Nieren (jeweils $n = 20$), EDTA-Blut ($n = 13$), Buffy Coat-Ausstriche ($n = 13$), Serum ($n = 11$), Erguss ($n = 14$), Liquor cerebrospinalis ($n = 16$), Augenkammerwasser ($n = 20$) und Peritoneallavage ($n = 6$) von 20 Katzen mit immunhistochemisch bestätigter FIP untersucht. Die Proben wurden mittels einer RT-PCR, welche das 7b-Gen der FCoV und somit alle FCoV detektiert, sowie mittels S-Gen-Mutations-RT-PCR, welche die Mutationen in den Nukleotiden 23531 und 23537 des S-Gens detektiert, untersucht.

Die S-Gen-Mutations-RT-PCR war in jeder der untersuchten Katzen in mindestens einer Probe positiv. Die Art der positiv getesteten Probenmaterialien variierte. FCoV mit mutiertem S-Gen wurden am häufigsten in Erguss nachgewiesen (64,0 %, 95 %-Konfidenzintervall (KI) 39,0 – 89,0), gefolgt von den IB von Milz, Netz und Nieren (50,0 %, 95 %-KI 28,0 – 72,0), IB und FNA der Mesenteriallymphknoten (45,0 %, 95 %-KI 23,0 – 67,0) und FNA von Milz und Leber sowie IB der Leber (40,0 %, 95 %-KI 19,0 – 62,0). Der gleichzeitige Nachweis mutierter und nicht-mutierter FCoV in manchen Katzen bestätigt das Vorkommen unterschiedlicher FCoV-Stämme innerhalb eines Wirts.

Das Vorkommen mutierter FCoV bei allen untersuchten 20 Katzen mit FIP belegt den Zusammenhang der S-Gen-Mutationen und der systemischen FCoV-

Ausbreitung, welche Voraussetzung der Entstehung von FIP ist. Untersucht man eine Kombination unterschiedlicher Probenmaterialien einer Katze, erhöht sich der Erfolg des Nachweises von FCoV mit S-Gen-Mutationen.

VI. SUMMARY

The present doctoral thesis comprises a clinical, prospective study which investigated the presence of mutated and non-mutated feline coronavirus (FCoV) in cats suffering from feline infectious peritonitis (FIP). FIP emerges when FCoV mutate within their host to a highly virulent pathotype and the immune response is not able to control the infection. FCoV spike (S) gene mutations are considered to contribute to the change in virulence by enabling FCoV infection of and replication in macrophages. This study investigated the presence of FCoV with and without S gene mutations using two different real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions (RT-PCRs) on different samples obtained under clinical conditions.

Fine-needle aspirates (FNAs) and incisional biopsies (IBs) of popliteal and mesenteric lymph nodes, liver and spleen, IBs of omentum and kidneys (each $n = 20$), EDTA blood ($n = 13$), buffy coat smears ($n = 13$), serum ($n = 11$), effusion ($n = 14$), cerebrospinal fluid ($n = 16$), aqueous humour ($n = 20$) and peritoneal lavage ($n = 6$) were obtained from 20 cats with FIP diagnosed by immunohistochemistry. Samples were examined by RT-PCR targeting the FCoV 7b gene, detecting all FCoV, and S gene mutation RT-PCR targeting mutations in nucleotides 23531 and 23537.

In 20/20 cats, FCoV with S gene mutations was present in at least one sample, but there was a variation in which sample was positive. FCoV with mutations in the S gene were most frequently found in effusion (64 %, 95 % confidence interval (CI) 39 – 89), followed by spleen, omentum and kidney IBs (50 %, 95 % CI 28 – 72), mesenteric lymph node IBs and FNAs (45 %, 95 % CI 23 – 67), and FNAs of spleen and liver and liver IBs (40 %, 95 % CI 19 – 62). Non-mutated and mixed FCoV were detected in some cats, highlighting presence of several FCoV strains within one host.

In these 20 cats with FIP, FCoVs with S gene mutations were found in every cat in at least one tissue or fluid sample. This highlights the association between mutated S gene and systemic FCoV spread. Examining a combination of different samples increased the probability of finding FCoV with the mutated S gene.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

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

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

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

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

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

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

An DJ, Jeoung HY, Jeong W, Park JY, Lee MH, Park BK. Prevalence of Korean cats with natural feline coronavirus infections. *Virol J* 2011; 8: 455.

Andre NM, Cossic B, Davies E, Miller AD, Whittaker GR. Distinct mutation in the feline coronavirus spike protein cleavage activation site in a cat with feline infectious peritonitis-associated meningoencephalomyelitis. *JFMS Open Rep* 2019; 5: 2055116919856103.

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

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

Barker EN, Stranieri A, Helps CR, Porter EL, Davidson AD, Day MJ, Knowles T, Kipar A, Tasker S. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. *Vet Res* 2017; 48: 60.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Desmarests LM, Theuns S, Roukaerts ID, Acar DD, Nauwynck HJ. Role of sialic acids in feline enteric coronavirus infections. *J Gen Virol* 2014; 95: 1911-8.

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

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

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

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

Dunbar D, Kwok W, Graham E, Armitage A, Irvine R, Johnston P, McDonald M, Montgomery D, Nicolson L, Robertson E, Weir W, Addie DD. Diagnosis of non-effusive feline infectious peritonitis by reverse transcriptase quantitative PCR from mesenteric lymph node fine-needle aspirates. *J Feline Med Surg* 2018; 21: 910-21.

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

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

Felten S, Matiasek K, Gruendl S, Sangl L, Wess G, Hartmann K. Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017a; 19: 410-8.

Felten S, Leutenegger CM, Balzer HJ, Pantchev N, Matiasek K, Wess G, Egberink H, Hartmann K. Sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction detecting feline coronavirus mutations in effusion and serum/plasma of cats to diagnose feline infectious peritonitis. *BMC Vet Res* 2017b; 13: 228.

Felten S, Weider K, Doenges S, Gruendl S, Matiasek K, Hermanns W, Mueller E, Matiasek L, Fischer A, Weber K, Hirschberger J, Wess G, Hartmann K. Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017c; 19: 321-35.

Felten S, Matiasek K, Gruendl S, Sangl L, Hartmann K. Utility of an immunocytochemical assay using aqueous humor in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Ophthalmol* 2018; 21: 27-34.

Felten S, Hartmann K, Doerfelt S, Sangl L, Hirschberger J, Matiasek K. Immunocytochemistry of mesenteric lymph node fine-needle aspirates in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Vet Diagn Invest* 2019; 31: 210-6.

Felten S, Hartmann K. Diagnosis of feline infectious peritonitis: A review of the current literature. *Viruses* 2019; 11: epub ahead of print; DOI: 10.3390/v11111068.

Fish EJ, Diniz PPV, Juan YC, Bossong F, Collisson EW, Drechsler Y, Kaltenboeck B. Cross-sectional quantitative RT-PCR study of feline coronavirus viremia and replication in peripheral blood of healthy shelter cats in Southern California. *J Feline Med Surg* 2018; 20: 295-301.

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

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

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

Gruendl S, Matiasek K, Matiasek L, Fischer A, Felten S, Jurina K, Hartmann K. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the central nervous system. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 576-85.

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

Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 1999; 77: 37-46.

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

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

Hayashi T, Goto N, Takahashi R, Fujiwara K. Detection of coronavirus-like particles in a spontaneous case of feline infectious peritonitis. *Nihon Juigaku Zasshi* 1978; 40: 207-12.

Hayashi T, Watabe Y, Nakayama H, Fujiwara K. Enteritis due to feline infectious peritonitis virus. *Nihon Juigaku Zasshi* 1982; 44: 97-106.

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

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

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

Hohdatsu T, Okada S, Koyama H. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. *Arch Virol* 1991a; 117: 85-95.

Hohdatsu T, Nakamura M, Ishizuka Y, Yamada H, Koyama H. A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis

virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. Arch Virol 1991b; 120: 207-17.

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

Holst BS, Englund L, Palacios S, Renstrom L, Berndtsson LT. Prevalence of antibodies against feline coronavirus and Chlamydomyces felis in Swedish cats. J Feline Med Surg 2006; 8: 207-11.

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

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

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

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

Hulswit RJ, de Haan CA, Bosch BJ. Coronavirus spike protein and tropism changes. Adv Virus Res 2016; 96: 29-57.

Ives EJ, Vanhaesebrouck AE, Cian F. Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. J Feline Med Surg 2013; 15: 1149-53.

Kipar A, Kremendahl J, Addie DD, Leukert W, Grant CK, Reinacher M. Fatal

enteritis associated with coronavirus infection in cats. *J Comp Pathol* 1998a; 119: 1-14.

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

Kipar A, Koehler K, Bellmann S, Reinacher M. Feline infectious peritonitis presenting as a tumour in the abdominal cavity. *Vet Rec* 1999a; 144: 118-22.

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

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

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

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

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

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

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

Li C, Liu Q, Kong F, Guo D, Zhai J, Su M, Sun D. Circulation and genetic diversity of Feline coronavirus type I and II from clinically healthy and FIP-suspected cats in China. *Transbound Emerg Dis* 2019; 66: 763-775.

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

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

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

Lutz H, Gut M, Leutenegger C, Schiller I, Wiseman A, Meli M. Kinetics of FCoV infection in kittens born in catteries of high risk for FIP under different rearing conditions. Second International Feline Coronavirus/Feline Infectious Peritonitis Symposium. Glasgow, Scotland, 2002.

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

Mochizuki M, Osawa N, Ishida T. Feline coronavirus participation in diarrhea of cats. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 1071-3.

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

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

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

Paris JK, Wills S, Balzer HJ, Shaw DJ, Gunn-Moore DA. Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. *BMC Vet Res* 2014; 10: 13.

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

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

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

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

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

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

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

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

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: Diagnostics and therapeutics. *Vet J* 2014a; 201: 133-41.

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. *Vet J* 2014b; 201: 123-32.

Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H, Leutenegger C, Murphy B. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Vet Microbiol* 2015; 175: 157-66.

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

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

Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of

macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol* 2005; 79: 14122-30.

Rypula K, Ploneczka-Janeczko K, Bierowiec K, Kumala A, Sapikowski G. Prevalence of viral infections in cats in southwestern Poland in the years 2006 to 2010. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2014; 127: 163-5.

Sangl L, Felten S, Bergmann M, Balzer H-J, Matiasek K, Hermanns W, Hartmann K. Diagnostischer Nutzen der Mutations-PCR auf das feline Coronavirus unter Verwendung von Kammerwasser. In: 24. Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Berlin, 2016.

Sangl L, Matiasek K, Felten S, Grundl S, Bergmann M, Balzer HJ, Pantchev N, Leutenegger CM, Hartmann K. Detection of feline coronavirus mutations in paraffin-embedded tissues in cats with feline infectious peritonitis and controls. *J Feline Med Surg* 2018; 21: 133-42.

Schwegmann-Wessels C, Herrler G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj J* 2006; 23: 51-8.

Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA, Alazawy A. Diagnostic methods for feline coronavirus: A review. *Vet Med Int* 2010; Epub only. DOI: 10.4061/2010/809480.

Shirato K, Chang HW, Rottier PJM. Differential susceptibility of macrophages to serotype II feline coronaviruses correlates with differences in the viral spike protein. *Virus Res* 2018; 255: 14-23.

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

Spada E, Canzi I, Baggiani L, Perego R, Vitale F, Migliazzo A, Proverbio D. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016; 45: 53-8.

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

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

Stranieri A, Probo M, Pisu MC, Fioletti A, Meazzi S, Gelain ME, Bonsembiante F, Lauzi S, Paltrinieri S. Preliminary investigation on feline coronavirus presence in the reproductive tract of the tom cat as a potential route of viral transmission. *J Feline Med Surg* 2019; 22: 178-185.

Taharaguchi S, Soma T, Hara M. Prevalence of feline coronavirus antibodies in Japanese domestic cats during the past decade. *J Vet Med Sci* 2012; 74: 1355-8.

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

Tasker S. Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. *J Feline Med Surg* 2018; 20: 228-43.

Tekelioglu BK, Berriatua E, Turan N, Helps CR, Kocak M, Yilmaz H. A retrospective clinical and epidemiological study on feline coronavirus (FCoV) in cats in Istanbul, Turkey. *Prev Vet Med* 2015; 119: 41-7.

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

Vaden SL, Levine JF, Lees GE, Groman RP, Grauer GF, Forrester SD. Renal biopsy: a retrospective study of methods and complications in 283 dogs and 65 cats. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 794-801.

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

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

Wang H, Hirabayashi M, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H. Immunohistochemical studies on meningoencephalitis in feline infectious peritonitis (FIP). *J Vet Med Sci* 2018; 80: 1813-7.

Wang YT, Chueh LL, Wan CH. An eight-year epidemiologic study based on baculovirus-expressed type-specific spike proteins for the differentiation of type I and II feline coronavirus infections. *BMC Vet Res* 2014; 10: 186-93.

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

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

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

Woo PC, Huang Y, Lau SK, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2010; 2: 1804-20.

VIII. DANKSAGUNG

Ich danke meiner Doktormutter Prof. Dr. Katrin Hartmann. Liebe Katrin, danke, dass Du mir dieses spannende und praxisrelevante Thema zur Verfügung gestellt hast und mir so das Anfertigen dieser Doktorarbeit und die Mitarbeit an der MTK ermöglicht hast. Vielen Dank für Deine Unterstützung während der letzten Jahre, die vielen Korrekturen und dass Du mich gleichermaßen gefördert und gefordert hast.

Ich danke Prof. Dr. Kaspar Matiasek für seine Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit. Außerdem vielen Dank an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Tierpathologie für die pathologische Untersuchung meiner Patienten. Besonderer Dank gilt Karin Stingl für ihre Unterstützung in allen immunhistochemischen Fragen.

Ich danke Dr. Hans-Jörg Balzer, Dr. Nikola Pantchev und Dr. Christian Leutenegger für die gute und interessante Zusammenarbeit, den wertvollen Input für den Artikel sowie das Durchführen der PCR.

Ich danke allen Tierärztinnen und Tierärzten sowie Tierbesitzerinnen und Tierbesitzern, die zu mir Kontakt aufgenommen haben und mich maßgeblich bei der Akquise des Patientenguts unterstützt haben – etwas, das nicht selbstverständlich, aber ungemein wertvoll war.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik, ebenfalls für die Unterstützung bei der Patientenakquise, vor allem aber dafür, dass es dank Euch jeden Tag Spaß gemacht hat, zur Arbeit zu gehen. Einen besonderen Platz in meinem Herzchen hat sich das internistische Team verdient – mit keinem sonst hätte ich meine ersten Schritte als Tierärztin besser gehen können.

Und ich danke meiner Familie. Meinem Mann Pascal, meinen Eltern, meinem Bruder, meinen engsten Freunden und meinem Katzibert Bertl. Am Rande der Doktorarbeitsverzweiflung wart und bleibt ihr mein sicherer Hafen, mein Lachanfall zum Frühstück, mein Sonnenaufgang am Berggipfel, mein Ansporn & meine Motivation genauso wie meine flauschige Verschnaufpause. Wie schön, dass Ihr in meinem Leben seid.