

Nachweis feliner Coronaviren mittels RT-PCR: Grundlage zum Studium der Pathogenese der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIP)

D. Fehr¹, S. Bolla¹, A.A.P.M. Herrewegh², M.C. Horzinek², H. Lutz¹

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war es, mittels RT-PCR Fragen der Pathogenese und Epidemiologie der felinen Coronavirus (FCoV)-Infektion zu untersuchen. Dabei sollte u.a. die diagnostische und prognostische Aussagekraft eines positiven PCR-Ergebnisses für FCoV-RNA im Serum von Katzen mit abdominalen Symptomen untersucht werden. Virale RNA wurde aus 100 µl Serum extrahiert. Anschliessend wurde eine nested RT-PCR durchgeführt, wobei Primer, die ein hochkonserviertes Fragment am 3'-Terminus des FCoV-Genoms amplifizieren, zum Einsatz gelangten. Dreiundsechzig Serumproben von 62 Katzen mit abdominalen Symptomen wurden mittels RT-PCR untersucht; der weitere Gesundheitszustand der positiv getesteten Katzen wurde verfolgt. Vier Katzen, die ein positives PCR-Ergebnis aufwiesen, sind heute, mehr als 70 Monate nach der Blutentnahme, gesund. Es kann gefolgert werden, dass eine Virämie mit FCoV nicht immer zu einer FIP führt. Ein positives FCoV-PCR Resultat ist somit kein zuverlässiger prognostischer Parameter für eine FIP und darf keinesfalls als alleinige Indikation für eine Euthanasie betrachtet werden. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sich durch Untersuchung anderer Materialien mittels PCR, eine FIP-Erkrankung besser vorhersagen lässt. Nichts desto trotz liefert diese PCR-Methode eine wichtige Grundlage zum Studium der Pathogenese und Epidemiologie der FIP.

Schlüsselwörter: Feline Infektiöse Peritonitis – Coronavirus – RT-PCR – Nachweis viraler RNA

Detection of feline coronavirus RNA using RT-PCR: Basis for the study of the pathogenesis of feline infectious peritonitis (FIP)

The aim of this study was to further investigate the pathogenesis and epidemiology of feline coronavirus (FCoV)-infections and among others to determine the prognostic value of a positive result in the RT-PCR for FCoV in serum samples collected from cats with abdominal signs. Viral RNA was isolated from 100 µl of serum and subsequently amplified by a nested RT-PCR using primers binding to a highly conserved region of the 3'-end of the FCoV-genome. Sixty-three serum samples collected from 62 cats with abdominal signs were examined by RT-PCR and the clinical outcome was followed up. Four of these cats with a positive PCR-result are healthy more than 70 months after the collection of the blood sample. It can be concluded that viremia with FCoV does not necessarily lead to FIP and death. With respect of diagnosing FIP, a positive FCoV-RT-PCR is of low prognostic and diagnostic value. It can not be recommended to use this assay as sole indication to euthanize cats. Further studies will have to be carried out to demonstrate if the prognostic and diagnostic value of this PCR-assay in other samples such as peripheral blood mononuclear cells is more reliable. However, this method was found to be an important tool to further study the pathogenesis and epidemiology of FIP.

Key words: Feline Infectious Peritonitis – coronavirus – RT-PCR – detection of viral RNA

Einleitung

Die Feline Infektiöse Peritonitis (FIP) ist eine chronisch progrediente, meist letal verlaufende, immunbedingte Erkrankung, die durch eine Infektion mit felinen Coronaviren (FCoV) verursacht wird (Pedersen, 1976). Emp-

fänglich sind neben der Hauskatze auch Wildfelidae, wie Geparden (Pfeifer et al., 1983), Jaguare, Löwen, Tiger und Europäische Wildkatzen (Watt et al., 1993). Obwohl das klinische Bild der FIP bereits vor mehr als 30 Jahren erstmals beschrieben wurde (Holzworth, 1963), sind auch heute noch viele Fragen der Pathogenese und Epidemiologie der FCoV-Infektion unbeantwortet.

Tabelle 1: Zusammenstellung der Reversen Transkriptasereaktion- und PCR-Bedingungen.
Die Angaben in Klammer beziehen sich auf die Konzentrationen der Stock-Lösungen.

	RT-Reaktion	1. PCR		nested PCR		
Reaktionsmix	1. Mix: 3 µl 5×Puffer* 2 µl Primer (5M) (Antisense) 0.5 µl DEPC (0.5% in Ethanol) 8.5 µl RNA <hr/> 14 µl Total	10 µl 10×Puffer* 8 µl MgCl ₂ (25mM) 1.5 µl dNTPs (10mM) 3 µl Primer (5 µM) (Antisense) 4 µl Primer (5 µM) (Sense) 63.1 µl ddH ₂ O 0.4 µl Taq Polymerase (5U/µl) 10 µl cDNA <hr/> Total: 100 µl		10 µl 10×Puffer* 6 µl MgCl ₂ (25mM) 2 µl dNTPs (10mM) 4 µl Primer (5 µM) (Antisense) 4 µl Primer (5 µM) (Sense) 63.6 µl ddH ₂ O 0.4 µl Taq Polymerase (5U/µl) 10 µl DNA von 1. PCR <hr/> Total: 100 µl		
	2. Mix: 14 µl 1. Mix 1 µl 5×Puffer* 1 µl dNTPs (10mM) 2 µl DTT 1 µl M-MuLV-RT (200U/µl) 1 µl Rnase Inhibitor (30-40U/µl) <hr/> 20 µl Total cDNA					
Reaktionsbedingungen	1. Mix: - 5min bei Raumtemp. - 10min bei 100 °C - auf Eis kühlen 2. Mix -37 °C, 1 Stunde	90 °C 5min 94 °C 1min 55 °C 1min 72 °C 1min 72 °C 7min	40 Zyklen		wie 1. PCR	
* RT-Puffer:	250mM Tris-HCl (pH 8.3) 375mM KCl	PCR-Puffer:	100mM Tris-HCl (pH 9.0) 500mM KCl 1% Triton X-100			

Infektionen mit FCoV sind in der Schweiz weit verbreitet. So weisen mehr als 95% der Katzen aus Zuchten, in denen in den letzten 18 Monaten FIP-Fälle aufgetreten waren, sowie mehr als 50% der klinisch gesunden Katzen im Alter von weniger als 12 Monaten Antikörper gegen FCoV auf (Fehr, 1995). Nicht jede FCoV-Infektion führt zu einer FIP und damit zum Tode der Katze (Pedersen et al., 1981). Dennoch versterben in der Schweiz 5-6% der Katzen im ersten Lebensjahr an FIP (Fehr, 1995). Bei Katzen aus FIP-Problemzuchten ist dieser Anteil noch höher. Die FIP darf in der Schweiz somit als die wohl wichtigste Infektionskrankheit vor allem bei der Jungkatze angesehen werden. Problematisch ist, dass die klinischen Befunde bei der nassen Form der FIP zwar relativ aussagekräftig sind, die Diagnosestellung bei der trockenen Form aber leider meist sehr schwierig ist, und vor allem in atypischen Fällen erst anlässlich einer Sektion gestellt werden kann.

Ist eine Katze an FIP erkrankt, so ist zur Zeit keine kurative Therapie bekannt. Bedingt durch offene Fragen in der Epidemiologie der FCoV-Infektion sind auch die prophylaktischen Massnahmen noch unbefriedigend. Eine modifizierte Lebendvaccine gegen die FIP ist zwar seit März 1995 auch in der Schweiz auf dem Markt erhältlich, doch zeigte es sich, dass vor allem Katzen, die bereits mit FCoV infiziert sind, so nicht vor einer FIP geschützt werden können (Fehr et al., 1995).

Es wurde postuliert, dass zwei verschiedene Varianten von FCoV die Katze infizieren und zu Erkrankungen führen können (Pedersen et al., 1981): Das Feline Enterale Coronavirus (FECV) und das Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV) werden anhand ihrer Virulenz unterschieden. Das FECV kann vor allem bei jungen Katzen eine

milde Enteritis und respiratorische Symptome verursachen, während das virulentere FIPV zu einer FIP-Erkrankung und damit zum Tode der Katzen führt. Einige FIPV-Isolate führen in beinahe 100% der experimentell infizierten Katze zu einer FIP. Unter Feldbedingungen dürften solch hochvirulente FIP-Virusstämme allerdings kaum vorkommen, da in Mehrkatzenhaushaltungen häufig nur einzelne Tiere an FIP erkranken.

Als Zielzellen des FECV werden die Epithelzellen des apikalen Teils der Darmzotten, respektive des Respirationsapparates beschrieben, während das FIPV zu einer Virämie führt und sich durch die Fähigkeit auszeichnet, Makrophagen zu infizieren. In wie weit sich diese zwei Varianten wirklich klar voneinander unterscheiden lassen, ist heute allerdings fraglich. Es wird vermutet, dass die virulenteren FIPV immer wieder neu durch Mutationen und Rekombinationen aus FECV hervorgehen können (Pedersen et al., 1984a; Pedersen und Floyd, 1985). FECV und FIPV oder gegen sie gerichtete Antikörper lassen sich zur Zeit weder serologisch noch molekularbiologisch unterscheiden (Pedersen et al., 1984; Venema et al., 1995). So kann auch anhand der Serologie unter Feldbedingungen nicht unterschieden werden, ob eine klinisch noch gesunde Katze mit einem schwach oder hoch virulenten FCoV infiziert wurde. Das Vorkommen von gegen FCoV gerichteten Antikörpern bei diesen Katzen lässt sich deshalb nur schwer oder gar nicht interpretieren. Zwar zeigen klinisch unauffällige Jungkatzen mit einem Titer von 100 oder höher ein signifikant höheres Risiko, in den nächsten 12 Monaten an einer FIP zu erkranken und zu versterben, als seronegative Katzen oder Katzen mit einem Titer von 25 (Fehr, 1995), doch ist diese Aussage im Einzelfall nicht sehr aussagekräftig.

Mit Hilfe der hier verwendeten RT-PCR-Methode zum direkten Nachweis von FCoV-RNA besteht das erste Mal die Möglichkeit, den Erreger selbst mit hoher Sensitivität und Spezifität direkt nachzuweisen.

Material und Methoden

RNA-Isolierung und RT-PCR

Die Serumproben wurden nach der Entnahme bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C aufbewahrt. RNA wurde aus $100\ \mu\text{l}$ Serum mit der Methode von Boom et al. (1990) extrahiert. Dabei wurde im Gegensatz zum Protokoll nur $20\ \mu\text{l}$ der SiO_2 -Partikellösung pro Serumprobe verwendet. Das Herauslösen der RNA von den SiO_2 -Partikeln erfolgte mit TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5mM EDTA). Dabei wurden die Proben zuerst bei Raumtemperatur und anschliessend bei 65°C während je 10 Minuten inkubiert. Anschliessend erfolgte eine Zentrifugation, und $8,5\ \mu\text{l}$ des Überstandes wurden in der RT-Reaktion eingesetzt.

Die RT und PCR wurden genau nach den von Herrewegh et al. (1995) publizierten Bedingungen durchgeführt, wobei auch dieselben Primersequenzen verwendet wurden (Details sind in Tabelle 1 zusammengefasst). Die Amplifikation wurde mittels eines Perkin Elmer Cetus Thermocycler 480 durchgeführt. Dabei wird in der ersten PCR ein Fragment von 223bp, in der zweiten PCR, der sogenannten „nested“ PCR, ein solches von 177bp amplifiziert.

Fünfzehn μl des Produktes der nested PCR wurden mit $3\ \mu\text{l}$ loading buffer auf ein 2% Agarose-Gel geladen und

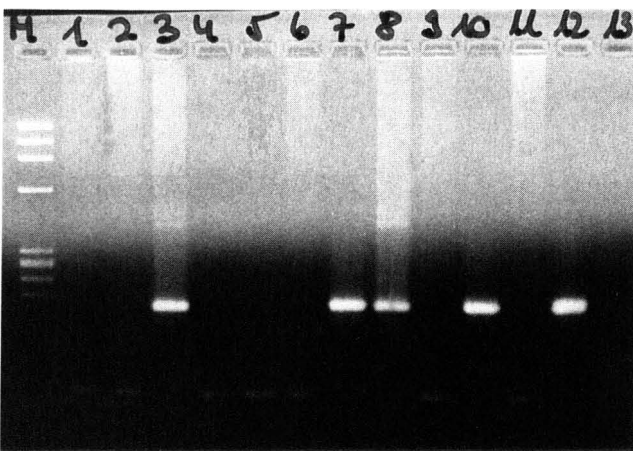


Abbildung 1: Ethidiumbromid-gefärbtes 2%-Agarosegel mit Amplifikationsprodukten nach der nested PCR. Die Länge der amplifizierten Fragmente beträgt 177bp. (M: Marker [ϕ X174/Hae III]; Bande 3, 7, 8, 10, 12: positiv getestete Serumproben; Bande 1, 2, 4–6, 9, 11: negativ getestete Serumproben, Primerfront sichtbar; Bande 13: negative Kontrolle; in einigen Fällen ist bei positiven Proben eine weitere Bande von ca. 400–450bp Länge sichtbar, die bisher nicht sequenziert wurden)

mittels Ethidiumbromidfärbung und UV-Licht sichtbar gemacht (Abbildung 1).

Durchführung der Studie

Im Rahmen einer anderen Studie wurden in den Jahren 1987–1990 durch Privattierärzte mehr als 1400 Serumproben von Katzen gesammelt, deren Anamnese und klinischer Gesundheitszustand erhoben und verschiedenste Laborparameter bestimmt. Die Daten wurden in einer Computerdatenbank gespeichert (Lutz et al., 1990). Dabei konnte festgestellt werden, dass bei Katzen, bei denen abdominale Probleme bemerkt wurden, häufiger Antikörper gegen FCoV nachgewiesen wurden, als bei gesunden Katzen. Auf Grund dieser Resultate wurde geschlossen, dass einige der Katzen zwar eine FCoV-Infektion durchgemacht hatten, die in der Folge zur Ausbildung von klinischen Symptomen führte, dass diese FCoV-Infektion aber nicht zwangsläufig zu einer FIP und zum Tod der Katze führte.

Dreiundsechzig Serumproben von 62 dieser Katzen mit abdominalen Symptomen wurden mittels RT-PCR für FCoV untersucht. Der Gesundheitszustand der positiv getesteten Katzen wurde im Sommer 1994 mit dem Ergebnis der PCR-Untersuchung von Serum aus den Jahren 1987–1990 verglichen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen FCoV erfolgte mittels Immunfluoreszenz mit transmissiblen Gastroenteritisvirus (TGEV) der Schweine als Antigen. Da TGEV und FCoV antigenetisch verwandt sind, kann die Kreuzreaktivität der Antikörper in der Immunfluoreszenz ausgenutzt werden. Dabei wurde eine Fluoreszenz bei einer Serumverdünnung von 25 als positiv erachtet.

Resultate

Die Anamnese, der klinische Gesundheitszustand der Katzen und die Serumproben wurden von 14 verschiedenen Privattierärzten erhoben. Bei allen der hier untersuchten Katzen stellte der Tierarzt abdominale Symptome wie Bauchumfangsvermehrung, dolentes Abdomen, rigide Därme, Meteorismus oder Diarrhoe fest. Anhand dieser Befunde liess sich retrospektiv eine Diagnosestellung allerdings nicht durchführen. Die Haltung, Anamnese und die klinischen Befunde der Katzen zum Zeitpunkt der Blutentnahme sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die PCR-positiven Katzen zeigten in keinem dieser Parameter einen statistisch signifikanten Unterschied zu den PCR-negativen Katzen.

In Tabelle 3 sind die PCR Resultate und die Resultate der FCoV-Serologie, die anlässlich der Entnahme der Serumproben durchgeführt werden konnten, sowie die im Sommer 1994 erhobenen klinischen Befunde zusammengestellt. Bei ungefähr der Hälfte der untersuchten Serumproben liessen sich keine Antikörper nachweisen, obwohl mittels PCR FCoV-RNA identifiziert wurde.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Haltung, Anamnese und klinischen Befunde der Katzen zum Zeitpunkt der Blutentnahme

	Total n=62 ¹⁾	PCR-positiv n=18 ¹⁾	PCR-negativ n=44 ¹⁾
Haltung:			
- Auslauf	40 (65%)	9 (50%)	31 (70%)
- Einzelkatze	29 (47%)	9 (50%)	20 (45%)
Rassekatze	8 (13%)	4 (22%)	4 (9%)
Geschlecht			
- männl.	32 (52%)	9 (59%)	23 (52%)
- weibl.	26 (42%)	6 (33%)	20 (45%)
Anamnese:			
- Fieber	34 (55%)	12 (67%)	22 (50%)
- Apathie	49 (79%)	16 (89%)	33 (75%)
- Abmagerung	37 (60%)	12 (67%)	25 (55%)
Laborbefunde:			
- FeLV-positiv	11 (18%)	6 (33%)	5 (11%)
Symptome & betroffene Organsysteme			
- reduzierter Allgemeinzustand	49 (79%)	14 (78%)	35 (80%)
- Fieber	35 (56%)	13 (72%)	22 (50%)
- veränderte Schleimhäute	39 (63%)	13 (72%)	26 (59%)
- Lymphknoten	19 (31%)	4 (22%)	15 (34%)
- Augen/Ohren/Nase	23 (37%)	9 (50%)	14 (32%)
- Haut/Haarkleid	34 (55%)	12 (67%)	22 (50%)
- Herz & Kreislauf	13 (21%)	3 (17%)	10 (23%)
- Respirationsapparat	19 (31%)	7 (39%)	12 (27%)
- Verdauungstrakt	45 (71%)	12 (67%)	33 (75%)
- Harnapparat	5 (8%)	1 (6%)	4 (9%)
- Geschlechtsapparat	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
- Nervensystem	4 (9%)	0 (0%)	4 (9%)
- Muskulatur/Skelett	18 (29%)	4 (22%)	14 (32%)

1) Angaben in Klammern: Prozentualer Anteil der Katzen der jeweiligen Population mit diesem Merkmal

Von den 13 PCR-positiven Katzen, deren Gesundheitszustand weiter verfolgt werden konnte, verstarben 8 Katzen kurze Zeit nach der Blutentnahme. Eine Katze überlebte beinahe 3 Jahre und vier Katzen sind mehr als 70 Monate nach der Virämie mit FCoV gesund.

Tabelle 3: Resultate der RT-PCR für FCoV und Zusammenstellung des klinischen Gesundheitszustandes der Katzen im Sommer 1994

	Total	Sero-positiv	Sero-negativ
PCR-positiv	19 (18 Katzen)/63	10/32	9 (8 Katzen)/31
Klinischer Gesundheitszustand der PCR-positiven Katzen (13/18 konnten verfolgt werden)	Total	Sero-positiv	Sero-negativ
Katzen, die kurze Zeit nach der Blutentnahme verstarben (ohne Sektion)	8	4	4
Katzen, die mehr als 35 Monate nach der Blutentnahme verstarben (ohne Sektion)	1	1	0
Katzen, die mehr als 70 Monate nach der Virämie gesund sind	4	2	2

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob sich die PCR Technik zur Diagnose- oder Prognosestellung einer FIP eignen könnte. Die hier eingesetzte RT-PCR amplifiziert ein hochkonserviertes Fragment am 3'Ende des FCoV-Genoms. Diese PCR-Methode wurde so entwickelt, dass alle bisher bekannten Laborisolate von FECV und FIPV amplifiziert werden können (Herrewegh et al. 1995). Obwohl auch TGEV und canine Coronaviren mit dieser PCR amplifiziert werden und diese Viren unter experimentellen Bedingungen zu einer Infektion in Katzen führen können (Barlough et al., 1984; McArdle et al., 1992), ist nicht bekannt, ob diese Viren Katzen unter Feldbedingungen über den natürlichen Infektionsweg infizieren können.

Seren von Katzen bei denen abdominale Symptome festgestellt worden waren und zu vermuten war, dass diese mit einer Coronavirusinfektion im Zusammenhang stehen würden (Lutz et al., 1990), wurden mittels RT-PCR mit Spezifität für FCoV untersucht. Vor der Blutentnahme wurde der Gesundheitszustand der Katzen durch den jeweiligen Privattierarzt untersucht. Aufgrund der erhobenen Befunde konnte allerdings jeweils keine sichere klinische Diagnose gestellt werden.

Die PCR-positiven Katzen wiesen gegenüber den PCR-negativen Katzen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Rasse, Haltung, Anamnese oder klinischer Symptome auf. Tendenziell konnte allerdings festgestellt werden, dass Rassekatzen und FeLV-positive Tiere häufiger virämisch mit FCoV waren, doch liessen sich auf Grund der geringen Anzahl keine statistisch gesicherten Aussagen machen.

Bedingt durch den langen Zeitunterschied vom Sammeln der Proben im Zeitraum 1987 bis 1990, bis zum Erheben des klinischen Gesundheitszustandes der Katzen im Sommer 1994 liess sich die Todesursache der verstorbenen Katzen nicht genau feststellen. Meist wurde bei diesen Katzen auch keine Sektion durchgeführt. Es lässt sich deshalb nicht eruieren, ob auch falsch negative PCR-Ergebnisse auftraten, d.h. ob Katzen mit negativem PCR Resultat im Serum später dennoch an FIP verstarben.

Erstaunlich war, dass 5 von 13 Katzen, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Virämie mit FCoV gezeigt hatten, nicht an einer FIP verstarben und z.T. auch noch über 5 Jahre später am Leben sind. Da freie RNA schnell degradiert wird, ist zu vermuten, dass das hier in der PCR nachgewiesene Coronavirus-Genom in Form von behüllten Viruspartikel aufgetreten war.

Nach bisheriger Lehrmeinung bestand die wichtigste Unterscheidung zwischen FECV und FIPV darin, dass die Replikation von FECV auf den Intestinaltrakt beschränkt ist, während sich FIPV systemisch ausbreiten (Pedersen et al. 1984a). Das Auftreten von FCoV im Serum, wie es sich durch ein positives RCR Resultat nachweisen liess, wäre somit erklärbar durch eine Infektion mit FIPV. Die Beobachtung, wonach einige dieser Tiere aber mehrere Jahre überlebten, deutet jedoch darauf hin, dass es sich

bei den nachgewiesenen FCoV um relativ avirulente, also dem FECV ähnliche Stämme gehandelt haben musste. Da sich FECV und FIPV aufgrund der bis heute bekannten Gensequenzen nicht unterscheiden lassen (Vennema et al., 1995) und die hier verwendeten PCR Methode ein hochkonserviertes Fragment am 3' Ende des FCoV-Genoms amplifiziert, lassen sich die bei den überlebenden Katzen nachgewiesenen Stämme nicht näher typisieren.

Aus unseren Beobachtungen muss also gefolgert werden, dass die Abgrenzung von FECV und FIPV nicht so klar ist, wie bisher postuliert wurde. Viel eher ist anzunehmen, dass FCoV allgemein zu Virämie führen können, die in der Regel von der Katze überlebt wird, und dass FIP als eine relativ seltene und oft späte Folge einer systemischen Coronavirusinfektion zu betrachten ist. Eine weitere Beobachtung, die wir im Rahmen einer anderen Studie gemacht haben und die diese Hypothese einer systemischen Replikation unterstützt, ist, dass bei Katzen, die keine FIP entwickelten, Coronavirus-RNA auch im Speichel gefunden werden konnte. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte wohl auf die Begriffe FECV und FIPV verzichtet und eher die Bezeichnung FCoV angewendet werden.

Die Tatsache, dass bei ungefähr der Hälfte der PCR-positiven Serumproben keine Antikörper gegen Coronaviren nachgewiesen wurden, könnte dadurch erklärt werden, dass bei einigen dieser Katzen die FCoV-Infektion erst kürzlich stattgefunden hatte und noch keine Serokonversion erfolgt war. Ausserdem ist bekannt, dass bei Katzen im terminalen Stadium einer FIP häufig keine freien Antikörper mehr nachgewiesen werden können (Barlough, 1985).

Seit 1987-1990 waren die Serumproben zwar bei -70 °C gelagert worden, doch wurden diese zeitweise für verschiedene andere Untersuchungen aufgetaut und wieder eingefroren. Es ist zu vermuten, dass anfänglich sogar mehr Proben für FCoV PCR-positiv gewesen waren, dass aber durch das Auftauen und Einfrieren Viruspartikel und RNA geschädigt wurden und damit in der RT-PCR nicht mehr nachweisbar waren. Die in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzte nested PCR mit einem zweiten Satz von internen Primern führt zu einer gegenüber der einfachen PCR höheren Sensitivität (Herrewegh et al., 1995). Zudem ist die Spezifität gegenüber der einfachen PCR verbessert, da das zu amplifizierende Fragment nicht nur zwei, sondern vier komplementäre Sequenzen für die Primer aufweisen muss, und so die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Amplifikation verringert wird.

Ein Nachteil dieser PCR-Methode besteht allerdings darin, dass sie zeitintensiver und kostspieliger ist, als andere routinemässig durchgeführte Laboruntersuchungen. Da in einer nested PCR sehr geringe Mengen cDNA amplifiziert werden, besteht ein erhöhtes Risiko einer Labor-kontamination. Um dieses Risiko zu vermindern, wurde die RT-PCR in zwei voneinander getrennten Räumen durchgeführt. In einem erstem Raum wurde die RNA-Isolation, die RT-Reaktion sowie die Vorbereitung des PCR-

Mixes durchgeführt. Im zweiten Raum erfolgte die Amplifikation und die Gelelektrophorese. Wichtig ist, dass nicht mit bereits amplifizierten Produkten im ersten Raum gearbeitet wird. Ausserdem muss immer mindestens eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Eine Kontaminationsmöglichkeit der Serumproben bei früheren Untersuchungen wäre theoretisch denkbar, doch sind in den Serumproben nur sehr geringe Mengen von Virus vorhanden, so dass im Falle z. B. unsauberen Pipettierens wenige µl von Serum einer Probe in die nächste gelangte, dies in der PCR nicht nachweisbar gewesen wäre.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Abgrenzung von FECV und FIPV nicht so eindeutig ist, wie bisher postuliert wurde, und dass viele Katzen mit abdominalen und anderen Symptomen, eine Infektion mit FCoV durchmachen. Offensichtlich führen Infektionen mit FCoV zu einer Virämie, die - ähnlich der FeLV Infektion - überwunden werden kann, gelegentlich aber zu Krankheit und Tod führt. Ein positives Ergebnis der RT-PCR darf deshalb keinesfalls als alleinige Indikation für eine Euthanasie angesehen werden, sondern muss vielmehr im Zusammenhang mit den anderen Untersuchungsbefunden beurteilt werden.

Die hier angewandte PCR bietet zum ersten Mal die Möglichkeit, FCoV-RNA in sehr geringen Mengen nachzuweisen. Damit ist es zum ersten Mal auch möglich, Ausscheider von FCoV zu erfassen und Fragen der Epidemiologie und Pathogenese der FCoV-Infektion neu zu untersuchen.

In zukünftigen Untersuchungen soll abgeklärt werden, in welchem Material FCoV am häufigsten nachgewiesen werden kann, und wie oft es unter Feldbedingungen zur systemischen Infektion mit FCoV kommt. Erst dann wird eine genaue Aussage darüber möglich sein, wie die PCR sich auch für die Diagnostik und Kontrolle der FCoV Infektion eignen wird.

Literatur

- Barlough J.E., Stoddart C.A., Sorresso G.P., Jacobson R.H., Scott F.W. (1984): Experimental Inoculation of Cats with Canine Coronavirus and Subsequent Challenge with Feline Infectious Peritonitis Virus. *Laboratory animal Science*, 34, 592-597.
- Barlough J.E. (1985): Cats, coronaviruses and coronavirus antibody tests. *J. small Anim. Pract.* 26, 353-362.
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-Van Dillen P.M.E., van der Nordaa J. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503.
- Febr D. (1995): Attenuierter Lebendimpfstoff (Primucell FIP™) gegen die Feline Infektiöse Peritonitis der Katze: Placebo-kontrollierte Evaluation unter Feldbedingungen. *Vet.-med. Diss. Zürich.*
- Febr D., Holznagel E., Bolla S., Hauser B., Herrewegh A.A.P.M., Horzinek M.C., Lutz H. (1995): Evaluation of the safety and efficacy of a modified live FIPV vaccine under field conditions. *Feline Practice, Proceedings to the FIPV/FECV Workshop 1994 in Davis, Ca.*, 23, 83-88.
- Herrewegh A.A.P.M., DeGroot R.J., Egberink H.F., Cepica A., Horzinek M.C., Rottier R.J.M. (1995): Detection of feline coronavirus RNA in

feces, tissues and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 33, 684-689.

Holzworth J. (1963): Some important disorders in cats. *Cornell Vet.* 53, 157-160.

Lutz H., Lehmann R., Winkler G., Kottwitz B., Dittmer A., Wolfensberger C., Arnold P. (1990): Das feline Immunschwächevirus in der Schweiz: Klinik und Epidemiologie im Vergleich mit dem Leukämie- und dem Coronavirus. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 132, 217-225.

McArdle F., Bennett M., Gaskell R.M., Tennant B., Kelly D.F., Gaskell C.J. (1992): Induction and enhancement of feline infectious peritonitis by canine coronavirus. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1500-1506.

Pedersen N.C. (1976): Morphologic and physical characteristics of feline infectious peritonitis virus and its growth in autochthonous peritoneal cell cultures. *Am. J. Vet. Res.* 37, 567-572.

Pedersen N.C., Boyle J.F., Floyd K., Fudge A., Barker J. (1981): An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.* 42, 368-377.

Pedersen N.C., Evermann J.F., McKeirnan A.J., Ott R.L. (1984a): Pathogenicity studies of feline coronavirus isolates 79-1146 and 79-1683. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2580-2585.

Pedersen N.C., Black J.W., Boyle J.F., Evermann J.F., McKeirnan A.J., Ott R.L. (1984b): Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 173, 365-380.

Pedersen N.C., Floyd K. (1985): Experimental studies with three new strains of feline infectious peritonitis virus: FIPV-UCD2, FIPV-UCD3, and FIPV-UCD4. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.* 7, 1001-1011.

Pfeifer M.L., Evermann J.F., Roelke M.E., Gallina A.M., Ott R.L., McKeirnan A.J. (1983): Feline infectious peritonitis in a captive cheetah. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 11, 1317-1319.

Vennema H., Poland A., Floyd Hawkins K., Pedersen N.C. (1995): A comparison of the genomes of FECVs and FIPVs: What they tell us about the relationships between feline coronaviruses and their evolution. *Feline Practice, Proceedings to the FIPV/FECV Workshop 1994 in Davis, Ca.*, 23, 40-44.

Watt N.J., MacIntyre N.J., McOrist S. (1993): An extended outbreak of infectious peritonitis in a closed colony of european wildcats (*Felis silvestris*). *J. Comp. Path.*, 108, 73-79.

Korrespondenzadresse: Dr. Daniela Febr, Klinisches Labor, Departement für Innere Veterinär-Medizin, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich

A propos Praxiseinrichtung

Operationstische und Narkosegeräte mit Zubehör, Operationslampen,
Instrumentenschränke, Sessel,
Zureiche- und Instrumententische, Autoklaven,
Sterilisierdosen ...

... von uns erhalten Sie
das komplette Programm





EISENHUT-VET AG
Veterinärmedizinische Instrumente

Eisenhut-Vet AG
Postfach, Sandweg 52, CH - 4123 Allschwil 1
Tel. 061/302 82 82, Fax 061/302 82 81

Bringsold Werbung ASG