

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift

109. Jahrgang · Heft 8 · August 1996

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **109**, 265-269 (1996)
© 1996 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
ISSN 0005-9366

Eingegangen am 16.10.1995

Abteilung Virologie, Fachgruppe Infektionskrankheiten und Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Utrecht (Niederlande)

Quantifizierung feline Immunschwächevirus (FIV)-RNS im Plasma infizierter Katzen

Quantitation of feline immunodeficiency virus (FIV) RNA in plasma of infected cats

T. W. Vahlenkamp, A. De Ronde, M. C. Horzinek und H. F. Egberink

Zusammenfassung: Eine kompetitive reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) wurde angewendet, um RNS des feline Immunschwächevirus (FIV) zu quantifizieren. Als interne kompetitive Kontrolle wurde *in vitro* synthetisierte RNS verwendet. Die interne Kontrolle unterscheidet sich von der Wildtypsequenz durch eine Deletion von 22 Basen. Die PCR-Produkte wurden nach Färbung mit Ethidium-Bromid anhand eines digitalisierten Bildes densitometrisch analysiert. Virale RNS-Konzentrationen im Plasma zweier experimentell mit dem Stamm FIV-UT113 infizierter Katzen wurden über 32 Wochen bestimmt. Die höchsten RNS-Konzentrationen wurden nach s.c. Injektion von zehn 50% Katzen-infektiösen Einheiten nach 11 Wochen gemessen ($2,3 \times 10^4$ bzw. $1,3 \times 10^4$ pro ml Plasma). Mit steigenden, gegen Hüll- bzw. Kapsidproteine des FIV gerichteten Antikörpertitern sank die Anzahl der FIV RNS-Moleküle wieder. Neun asymptomatische Katzen, die vor 3,5 bis 4,5 Jahren experimentell mit FIV infiziert worden waren, hatten virale RNS-Kopien zwischen $5,6 \times 10^3$ und $4,3 \times 10^4$ per ml Plasma. Eine sechswöchige Behandlung mit 9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurin [PMPDAP] (20 mg/kg Körpergewicht s.c. dreimal wöchentlich) führte zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl RNS-Kopien im Plasma. Die quantitative kompetitive RT-PCR kann bei Untersuchungen zur Pathogenese, der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen als auch bei der Beurteilung antiviraler und immunmodulierender Mittel verwendet werden.

Summary: A competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to quantify RNA of feline immunodeficiency virus (FIV) in cats. The assay uses *in vitro* synthesized RNA as a competitive internal control. The synthesized RNA has a 22-base deletion with respect to the wild-type sequence. PCR products were quantitated by densitometric analysis of a digitized image of the ethidium bromide stained gel. Viral RNA concentrations in the plasma of two cats experimentally infected with FIV strain UT113 were followed for 32 weeks; peak copy numbers (2.3×10^4 and 1.3×10^4 per ml, respectively) were reached 11 weeks after subcutaneous injection of ten 50% cat infectious doses. With rising antibody titers against FIV-gag and FIV-env gene products, the amount of FIV RNA in plasma decreased. Nine asymptomatic cats that had been experimentally infected 3.5 to 4.5 years earlier had copy numbers between 5.6×10^3 and 4.3×10^4 per ml.

Cats treated for six weeks with 9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine [PMPDAP] (20 mg/kg body weight s.c. three times a week) showed a significant decrease of RNA copy numbers in plasma.

This quantitative competitive RT-PCR will be useful to study the pathogenesis of the FIV infection, to evaluate the effectiveness of vaccines and to monitor antiviral and immunomodulating drugs.

Einleitung

Das feline Immunschwächevirus (FIV) gehört wie das humane Immunschwächevirus (HIV) und das Immunschwächevirus der Primaten (SIV) zum Genus der Lentiviren der Familie Retroviridae. Es konnte zum ersten Mal 1986 aus einer feline Leukämievirus (FeLV)-negativen Katzenkolonie in den USA isoliert werden (Pedersen et al., 1987). Das FIV ähnelt dem HIV in seiner Morphologie, dem Zelltropismus, sowie physikalischen und

biochemischen Eigenschaften. Es ist jedoch genetisch und antigenetisch verschieden (Talbot et al., 1989; Yamamoto et al., 1988).

Das FIV verursacht nach Infektion Fieber, Diarrhoe, Gingivitis, Konjunktivitis, Uveitis, die begleitet sind von einer Neutropenie, Leukopenie und/oder Lymphadenopathie. Fieber und die anderen klinischen Symptome dauern einige Tage bis Wochen an (Pedersen et al., 1987; Yamamoto et al., 1988). Die erste Krankheitsphase geht in eine bis zu fünf und mehr Jahre

dauernde asymptomatische Periode über. In dieser entwickelt sich die Immunschwäche, die sich im peripheren Blut durch eine progressive Abnahme der CD4⁺ T-Helferzellen bei z. T. gleichzeitiger Zunahme der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen manifestiert. Wieviele der infizierten Katzen schließlich klinisch erkranken, ist nicht genau bekannt. Pedersen (1993) beobachtete bei mindestens einem Drittel der infizierten Katzen die Entwicklung von sekundären und opportunistischen chronischen Infektionen. Dominierend sind Entzündungen der Mundhöhle (Gingivitis, Stomatitis) bei fast jeder zweiten erkrankten Katze. Die Tiere magern ab und bei ca. 25% zeigen sich Erkrankungen des Respirationstraktes. Meist werden die Symptome von einer Anämie, Panzytopenie und/oder Lymphadenopathie begleitet (Pedersen et al., 1987, 1993; Yamamoto et al., 1989). Aufgrund der fortschreitenden Suppression des Immunapparates hat die symptomatische Behandlung stets kürzerfristige Erfolge. Die

Tiere sterben in diesem Krankheitsstadium meist innerhalb eines Jahres (Ishida und Tomoda, 1990). Neben der veterinärmedizinischen Bedeutung der Infektion dient das FIV ebenfalls als Modell für die Infektion mit dem HIV im Hinblick auf die Impfstoffentwicklung, Untersuchungen zur Pathogenese und Testung antiviraler Substanzen (Übersicht bei Bendinelli et al., 1995).

In der Bundesrepublik wurden in unselektierten Katzenserren zwischen 2,3 und 5,6% Antikörper gegen das FIV gefunden (Neu et al., 1989; Hartmann und Hinze, 1991). Bei 5,5 Mio. Katzen, die in deutschen Haushalten gehalten werden, kann man davon ausgehen, daß 200.000 bis 250.000 Katzen infiziert sind.

In allen Phasen der Infektion kann das FIV (nach *in vitro* Stimulierung) aus den peripheren Blutlymphozyten (PBL) isoliert werden. Die Anzahl infizierter Zellen kann durch Titrierung der PBL (und Kokultivierung nicht infizierter Zellen) bestimmt werden (Meers et al., 1992). Hierbei ist es nicht möglich, zwischen produktiv infizierten und latent infizierten Zellen im peripheren Blut zu unterscheiden.

Im Gegensatz hierzu gelingt die Virusisolierung aus Plasma bzw. Serum nicht regelmäßig (Matteucci et al., 1993). Virusantigen kann im Serum selbst nach Dissoziation der Immunkomplexe nur bei weniger als der Hälfte der infizierten Tiere nachgewiesen werden (Lombardi et al., 1994). Die Menge frei im Blut zirkulierender Viren ist deshalb schwierig zu untersuchen. Dies ist jedoch von besonderer Bedeutung, weil im Unterschied zur Anzahl infizierter Zellen die Konzentration von FIV im Plasma den aktuellen Status der Virusvermehrung widerspiegelt.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine äußerst empfindliche Methode zum Nachweis von DNS- bzw. nach vorausgegangener reverser Transkription (RT) auch von RNS-Molekülen. Bis jetzt wurden PCR-Untersuchungen von FIV lediglich zur qualitativen bzw. semi-quantitativen Analyse von proviraler DNS in PBL durchgeführt (Philpott et al., 1992; Rimstad und Ueland, 1992; Lawson et al., 1993). Zur Quantifizierung der frei im Blut zirkulierender Viren haben wir eine kompetitive reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) entwickelt (Vahlenkamp et al., 1995b). Mit dieser RT-PCR haben wir die Anzahl viraler RNS-Moleküle im Plasma sowohl nach experimenteller Infektion als auch bei infizierten asymptomatischen Katzen im Verlauf einer antiviralen Therapie untersucht.

Material und Methodik

Zwei Katzen wurden subcutan (s.c.) mit zehn 50% Katzen-infektiösen Einheiten des niederländischen FIV-UT113 Isolates infiziert. EDTA-Blut wurden zum Zeitpunkt der Infektion und nach 1, 3, 5, 7, 11, 15 und 32 Wochen abgenommen. Die Blutproben wurden zentrifugiert, das Plasma abgenommen, filtriert (0,45 µm) und in 150 µl Portionen bei -70 °C eingefroren. Die virale RNS wurde anschließend mit der Silica/Guanidin-Thiocyanat-Methode aus dem Plasma isoliert (Boom et al., 1990).

Die Konzentration viraler RNS im Plasma wurde ebenfalls bei neun FIV-infizierten asymptomatischen Katzen bestimmt, die seit 3,5 bis 4,5 Jahren mit dem niederländischen Isolat FIV-UT48 infiziert sind. Bei diesen Katzen wurde die Anzahl viraler RNS-Moleküle im Plasma auch im Verlauf einer antiviralen Therapie mit Nukleosid-Analogen verfolgt. Zwei Katzen wurden mit 9-(2-phosphonylmethoxyäthyl)adenin [PMEA], vier Katzen mit 9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurin [PMPDAP] und drei Katzen als negative Kontrolle mit

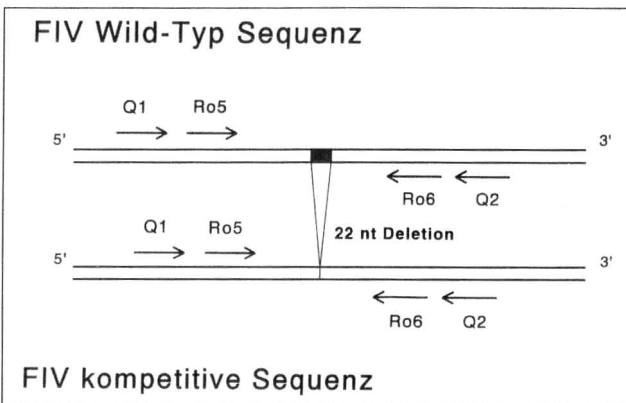


Abb. 1 FIV Wildtyp- und kompetitive Sequenz sowie relative Position der im Bereich der Deletion gewählten Primersequenzen

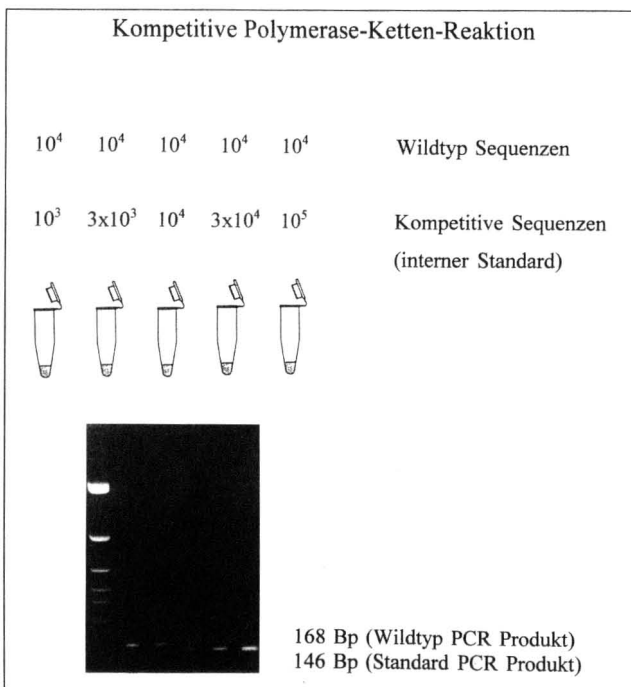


Abb. 2 Prinzip der kompetitiven Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Eine zunehmende Anzahl Kopien des internen Standards wird mit Aliquots der zu bestimmenden Wildtypsequenz amplifiziert. Bild der mit Ethidium-Bromid gefärbten PCR-Produkte nach Gelelektrophorese (Baasenpaare [Bp])

Tabelle 1

Virale RNS-Kopien pro ml Plasma und der CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozytenquotient von neun experimentell FIV-infizierten, asymptomatischen Katzen

| Katze | Mittel | Anzahl viraler RNS-Moleküle | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Quotient |
|-------|---------|-----------------------------|---|
| #320 | PMEA | $8,5 \times 10^3$ | 1,13 |
| #330 | PMEA | $1,0 \times 10^4$ | 1,02 |
| #308 | PMPDAP | $1,4 \times 10^4$ | 0,50 |
| #326 | PMPDAP | $5,6 \times 10^3$ | 0,90 |
| #336 | PMPDAP | $4,3 \times 10^4$ | 0,85 |
| #833 | PMPDAP | $9,2 \times 10^3$ | 1,60 |
| #322 | Placebo | $7,4 \times 10^3$ | 0,85 |
| #340 | Placebo | $1,5 \times 10^4$ | 1,20 |
| #831 | Placebo | $1,0 \times 10^4$ | 0,90 |

Die Anzahl viraler RNS-Kopien wurde mit der quantitativen, kompetitiven RT-PCR bestimmt (Vahlenkamp et al., 1995b)

phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) behandelt. Sechs Wochen lang wurde den Katzen dreimal wöchentlich 20mg/kg Körpergewicht der Nukleosid-Analoge s.c. injiziert. Die Kontroll-Katzen erhielten jeweils 3 ml PBS (Vahlenkamp et al., 1995a).

Zur Quantifizierung des frei im Plasma zirkulierenden FIV wurde eine kompetitive RT-PCR angewendet. Als interner Standard diente *in vitro* synthetisierte RNS vom *gag*-Gen des FIV-Genoms. Die Sequenz des internen Standards unterscheidet sich von jener des Wildtyps durch eine Deletion von 22 Basen (Abb. 1). Die in der als „nested PCR“ durchgeführten Reaktion verwendeten Primer Ro5 [5'-CAAGATTTGCACCAGCTAGGATGC-3'] und Ro6 [5'-TGTTCTTGATCTATTTGGGC-3'] amplifizieren von der Wildtypsequenz ein Produkt von 168 Basenpaaren (Bp) und von der Sequenz des internen Standards ein Produkt von 146 Bp. Durch Zufügen einer steigenden Anzahl Kopien des internen Standards an Aliquots der aus dem Plasma isolierten RNS konkurrieren in jeder PCR dieselben Primer um die Sequenzen des Standards und des Wildtyps (Abb. 2).

Unterschiede in der Amplifizierungseffektivität zwischen einzelnen Reaktionen haben keinen Einfluß auf das relative Verhältnis zwischen Standard- und Wildtypsequenzen innerhalb einer Reaktion. Nach Amplifizierung können beide PCR-Produkte durch Gelelektrophorese getrennt und mit Ethidium-Bromid angefärbt werden (Abb. 2). Von dem digitalisierten Bild wurden die PCR-Produkte densitometrisch analysiert und ihr molarer Äquivalenzpunkt mittels Regressionsanalyse berechnet (Vahlenkamp et al., 1995b).

Die Analyse der CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen das feline CD4- und CD8-Molekül durchgeführt (Tompkins et al., 1990). Die PBL der Katzen wurden mit den Antikörpern und anschließend mit Fluorescein-Isothiocyanat konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert. Die Bestimmung der Anzahl im Blut zirkulierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie deren Quotient erfolgte mittels Durchflußzytometrie (FACScan, Becton Dickinson).

Die gegen das FIV-*gag* und FIV-*env* gerichtete Immunantwort wurde mit einem ELISA gemessen (Verschoor et al., 1993).

Ergebnisse

Im Unterschied zu den sehr wechselnden Ergebnissen der Virusisolierung aus Plasma konnten wir mit Hilfe der entwickelten RT-PCR im Plasma aller untersuchten FIV-infizierter Katzen

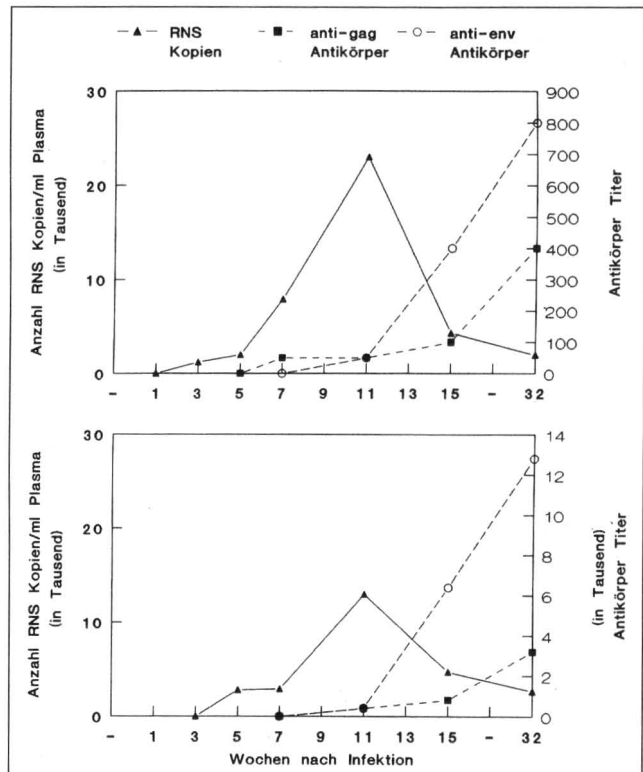


Abb. 3 Virale RNS-Konzentration und Antikörperproduktion nach experimenteller FIV-Infektion zweier Katzen

virale RNS quantifizieren. In den Plasmaproben der Katzen, die experimentell mit dem Stamm FIV-UT113 infiziert wurden, konnten wir nach 3 bzw. 5 Wochen virale RNS nachweisen (Abbildung 3). Drei Wochen nach Infektion konnte das FIV ebenfalls aus 10^6 PBL isoliert werden. Im Verlauf der Infektion stieg die Anzahl viraler RNS-Kopien im Plasma und zeigte ein Maximum nach 11 Wochen ($2,3 \times 10^4$ bzw. $1,3 \times 10^4$ pro ml). Mit steigenden Antikörpertitern gegen das FIV Hüll- bzw. Kapsidprotein sank die Anzahl viraler RNS-Moleküle im Plasma wieder.

Die neun asymptomatischen Katzen, die seit 3,5 bis 4,5 Jahren mit dem niederländischen Isolat FIV-UT48 infiziert sind, zeigten sowohl niedrige CD4⁺/CD8⁺ Lymphozytenquotienten ($0,9 \pm 0,27$) als auch niedrige Hämoglobin- ($7,02 \pm 0,36$ mM) und Hämatokritwerte ($0,35 \pm 0,02$ l/l). Die Anzahl infizierter Zellen wurde durch Titrierung von PBL bestimmt. Bei den Katzen wurde in den meisten Kulturen mit 10^4 und in einigen Kulturen mit 10^3 PBL Virus nachgewiesen (Vahlenkamp et al., 1995a).

Mit der quantitativen RT-PCR wurden bei den Katzen virale RNS-Kopien zwischen $5,6 \times 10^3$ und $4,3 \times 10^4$ pro ml Plasma gemessen. In Tabelle 1 sind die Anzahl viraler RNS-Moleküle als auch die CD4⁺/CD8⁺ Lymphozytenquotienten zusammengefaßt. Bei den neun untersuchten Katzen wurde kein Zusammenhang zwischen der Anzahl viraler RNS-Kopien pro ml Plasma und dem CD4⁺/CD8⁺ Quotienten festgestellt. Im Laufe der sechswöchigen antiviralen Behandlung zeigten die mit PMPDAP-behandelten Katzen eine signifikante Verminderung ($p < 0,05$) viraler RNS-Kopien im Plasma. Wie in Abbildung 4 angegeben, hatten bei drei der vier PMPDAP-behandelten Katzen nach sechs Wochen die Anzahl der FIV RNS-Moleküle im Plasma abgenommen. Die Anzahl viraler RNS-Kopien wurde

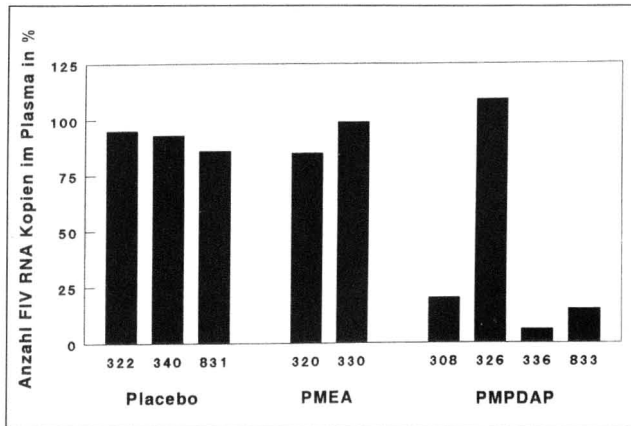


Abb. 4 Prozentuale Anzahl viraler RNS-Kopien im Plasma nach sechswöchiger Behandlung (dreimal wöchentlich 20 mg/kg Körpergewicht) mit den Nukleosid-Analogen 9-(2-phosphorylmethoxy-äthyl)adenin [PMEa] und 9-(2-phosphorylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurin [PMPDAP]

bei den beiden PMEa-behandelten Katzen (#320, #330) und der PMPDAP-behandelten Katze (#326) auch nach 2 bzw. 4 Wochen bestimmt. Zu keinem der Untersuchungszeitpunkte waren die Werte bei diesen Katzen erniedrigt. Durch diese Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, daß die nach sechs Wochen bei diesen drei Katzen gemessenen Werte durch bereits resistent gewordenen Viren verursacht wurden.

Bei den mit PMPDAP-behandelten Katzen zeigte sich (wie bei den Kontrolltieren) eine leichte Abnahme der Hämoglobin- und Hämatokritwerte auf $5,95 \pm 0,37$ mM bzw. $0,29 \pm 0,02$ l/l. Dies ist wahrscheinlich auf die häufigen Blutabnahmen während der Behandlung zurückzuführen. In Gegensatz hierzu zeigten die mit PMEa behandelten Katzen eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der Hämoglobin- und Hämatokritwerte auf $2,9 \pm 0,65$ mM bzw. $0,15 \pm 0,03$ l/l. Drei Wochen nach Behandlungsende waren die Werte der PMEa-behandelten Katzen wieder auf $4,9 \pm 0,01$ mM Hämoglobin bzw. $0,24 \pm 0,01$ l/l Hämatokrit angestiegen. Die Anzahl infizierter PBL und der $CD4^+/CD8^+$ Quotient blieben bei allen behandelten Katzen konstant.

Diskussion

Im Vergleich zur Virusisolierung aus Plasma ist die RT-PCR sehr empfindlich. Im Plasma aller untersuchten FIV-infizierten Katzen konnte virale RNS quantifiziert werden. Aufgrund der exponentiellen Amplifizierung der Zielmoleküle in einer PCR können kleine Abweichungen in der Reaktionskinetik zwischen einzelnen Reaktionen zu bedeutenden Unterschieden in der Menge des Reaktionsproduktes führen. Bei der angewandten kompetitiven PCR wurde deshalb von einem internen Standard Gebrauch gemacht, der mit denselben Primern in derselben Reaktion amplifiziert wird, durch Gelelektrophorese jedoch von den Wildtypsequenzen zu unterscheiden ist.

Im Verlauf einer experimentellen Infektion zweier Katzen stieg die Anzahl viraler RNS-Kopien in Plasma nach drei bzw. fünf Wochen. Elf Wochen nach der Infektion wurde $2,3 \times 10^4$ bzw. $1,3 \times 10^4$ RNS-Moleküle pro ml Plasma gemessen. Mit steigenden Antikörpertitern gegen das FIV Hüll- bzw. Kapsidprotein sank die Anzahl im Plasma vorhandener viraler RNS-Moleküle wieder. Drei Wochen nach Infektion konnte das FIV aus 10^6 PBL isoliert werden. Die Anzahl infizierter Zellen wurde bei diesen Untersuchungen nicht bestimmt. Wo die primäre FIV-Verbreitung nach Eindringen des Virus in den Wirtsorga-

nismus stattfindet und welche Route das Virus zur Ausbreitung im Körper nutzt, ist nicht genau bekannt. Beebe und Mitarbeiter (1994) fanden mittels in situ-Hybridisierung, daß die lymphoiden Organe (Lymphknoten, Tonsillen, Thymus, Milz, Peyersche Platten) die ersten Zielorgane sind. In den ersten Wochen der Infektion wurden die höchsten DNS- und RNS-Konzentrationen im Thymus, Lymphknoten und im Knochenmark angetroffen. English und Mitarbeiter (1993) zeigten, daß 2–6 Wochen nach der Infektion die Zellen mit den höchsten Proviruskonzentrationen $CD4^+$ T-Zellen sind.

Mit der quantitativen RT-PCR wurde bei neun bereits vor 3,5 bis 4,5 Jahren experimentell FIV-infizierten Katzen die Anzahl viraler RNS-Kopien im Plasma untersucht. Während die Virusisolierung aus Plasma bei diesen Katzen wechselnde Resultate ergab, wurden mit der RT-PCR zwischen $5,6 \times 10^3$ und $4,3 \times 10^4$ RNS-Kopien per ml Plasma gemessen. Es konnte somit gezeigt werden, daß selbst in der asymptomatischen Phase der Infektion eine erhebliche Virusproduktion stattfindet und daß das FIV in dieser Zeit nicht nur latent (in den PBL) anwesend ist. Wahrscheinlich trägt die Immunantwort dazu bei, die FIV-Verbreitung zu begrenzen, sie ist aber nicht in der Lage, sie völlig zu unterbinden und das Virus zu eliminieren. Nach der akuten Infektionsphase scheint sich zwischen der Virusvermehrung und der Immunantwort ein Gleichgewicht einzustellen.

Die Menge des frei im Plasma zirkulierenden FIV erwies sich auch als geeigneter Parameter zur Bestimmung der Wirksamkeit antiviraler Mittel bei asymptomatischen FIV-infizierten Katzen. In früheren Untersuchungen hatte der RT-Hemmer PMEa bei der therapeutischen Anwendung einen deutlichen Effekt auf die mit der Infektion einhergehenden sekundären Krankheitssymptome gezeigt (Egberink et al., 1990, 1991; Hartmann et al., 1992). Das azyklische Nukleosid-Analog PMPDAP zeigte bei Untersuchungen *in vitro* sowohl eine im Vergleich mit PMEa bessere Wirksamkeit als auch eine geringere Toxizität (Vahlenkamp et al., 1995a). Während bei der PMEa-behandelten Gruppe lediglich toxische Nebenwirkungen zu sehen waren und die virale RNS-Konzentration im Plasma während der gesamten Behandlungsphase nicht abnahm, nahm die Anzahl viraler RNS-Moleküle in der PMPDAP-behandelten Gruppe signifikant ab.

Somit wurden die *in vitro*-Ergebnisse durch die *in vivo*-Resultate bestätigt.

Die Infektion mit dem HIV ähnelt in ihrer Primärphase jener der FIV. Es wurden beim Menschen jedoch höhere RNS-Konzentrationen im Blut gemessen (Clark et al., 1991; Mulders et al., 1994). Das eigentliche Maximum an RNS-Molekülen bei den zwei untersuchten Katzen kann allerdings auch zwischen zwei Blutentnahmen gelegen haben. Bei HIV-Patienten liegt die Anzahl RNS-Kopien im Plasma nach der akuten Infektionsphase zwischen 10^4 und 10^6 pro ml (Piatak et al., 1993a, 1993b). Bei beiden Lentivirusinfektionen zirkuliert somit eine vergleichbare Anzahl Virusteilchen frei im Blut. Dies bestätigt, daß das FIV ein wertvolles Modell für die Pathogenese der HIV-Infektion ist. Die quantitative kompetitive RT-PCR kann bei Untersuchungen zur Pathogenese, der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen als auch bei der Beurteilung antiviraler und immunmodulierender Mittel verwendet werden.

Danksagung

Thomas W. Vahlenkamp wurde durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) und durch ein Post-Doktoranden Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Literaturverzeichnis

- Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-van Dillen, J. Van der Noordaa (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 459-503.
- Beebe, A.M., N. Dua, T.G. Faith, P.F. Moore, N.C. Pedersen, S. Dandekar (1994): Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J. Virol.* **68**, 3080-3091.
- Bendinelli, M., M. Pistello, S. Lombardi, A. Ploi, C. Garzelli, D. Matteucci, L. Ceccherini-Nelli, G. Malvaldi, F. Tozzini (1995): Feline Immunodeficiency Virus: An Interesting Model for AIDS Studies and an Important Cat Pathogen. *Clin. Microb. Rev.* **8**, 87-112.
- Clark, S.J., M.S. Saag, W.D. Decker, S. Campbell-Hill, J.L. Roberson, B.S. Peter, P.J. Veldkamp, M.S. John, J.C. Kappes, B.H. Hahn, G.M. Shaw (1991): High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**, 954-960.
- Egberink, H.F., M. Borst, H. Niphuis, J. Balzarini, H. Neu, H. Schellekens, E. De Clercq, M.C. Horzinek, M. Koolen (1990): Suppression of feline immunodeficiency virus infection in vivo by 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 3087-3091.
- Egberink, H.F., K. Hartmann, M.C. Horzinek (1991): Chemotherapy of feline immunodeficiency virus infection. *JAVMA* **199**, 1485-1487.
- English, R.V., C.M. Johnson, D.H. Gebhard, M.B. Tompkins (1993): In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **67**, 5175-5186.
- Hartmann, K., K. Hinze (1991): Epidemiologie und Klinik der FIV-Infektion in Bayern. *Tierärztl. Prax.* **19**, 545-551.
- Hartmann, K., A. Donath, B. Beer, H.F. Egberink, M.C. Horzinek, H. Lutz, G. Hoffmann-Fezer, I. Thum, S. Thefeld (1992): Use of two virostatica (AZT, PMEPA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **35**, 167-175.
- Ishida, T., I. Tomoda (1990): Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection. *Jpn. J. Vet. Sci.* **52**, 645-648.
- Lawson, M., J. Meers, L. Blechynnden, W. Robinson, W. Greene, P. Carnegie (1993): The detection and quantification of feline immunodeficiency provirus in peripheral blood mononuclear cells using polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **38**, 11-21.
- Lombardi, S., A. Poli, C. Massi, F. Abramo, L. Zaccaro, A. Bazzichi, G. Malvaldi, M. Bendinelli, C. Garzelli (1994): Detection of feline immunodeficiency virus p24 antigen and p24-specific antibodies by monoclonal antibody-based assays. *J. Virol. Methods* **46**, 287-301.
- Matteucci, D., F. Baldinotti, P. Mazzetti, M. Pistello, P. Bandecchi, R. Ghilarducci, A. Poli, F. Tozzini, M. Bendinelli (1993): Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cocultivation and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 494-501.
- Meers, J., W.F. Robinson, G.M. del Fierro, M.A. Sconnes, M.A. Lawson (1992): Feline immunodeficiency virus: quantification in peripheral blood mononuclear cells and isolation from plasma of infected cats. *Arch. Virol.* **127**, 233-243.
- Mulders, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, S. Kwok (1994): Rapid and Simple PCR Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma: Application to Acute Retroviral Infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 292-300.
- Neu, H., V. Moennig, K. Leidinger, E. Bussian (1989): Erste Ergebnisse über die Verbreitung FIV-(FTLV-) seropositiver Katzen in Deutschland und Interpretation der Ergebnisse. *Prakt. Tierarzt* **3**, 38-44.
- Pedersen, N.C., E.W. Ho, M.L. Brown, J. Yamamoto (1987): Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* **235**, 790-793.
- Pedersen, N.C. (1993): The Retroviridae, volume 2, edited by J.A. Levy. New York: Plenum Press.
- Piatak, M., M.S. Saag, L.C. Yang, S.J. Clark, J.C. Kappes, K.-C. Luk, B.H. Hahn, G.M. Shaw, J.D. Lifson (1993a): High levels of HIV-1 in Plasma During All Stages of Infection Determined by Competitive PCR. *Science* **259**, 1749-1754.
- Piatak, M., M.S. Saag, L.C. Yang, S.J. Clark, J.C. Kappes, K.-C. Luk, B.H. Hahn, G.M. Shaw, J.D. Lifson (1993b): Determination of plasma viral load in HIV-1 infection by quantitative competitive polymerase chain reaction. *AIDS* **7**, S65-S71.
- Philpott, M.S., J.P. Ebner, E.A. Hoover (1992): Evaluation of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine therapy for feline immunodeficiency virus using a quantitative polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **35**, 155-166.
- Rimstad, E., K. Ueland (1992): Detection of feline immunodeficiency virus by a nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **36**, 239-248.
- Talbott, R.L., E.E. Sparger, K.M. Lovelace, W.M. Fitch, N.C. Pedersen, P.A. Luciw, J.H. Elder (1989): Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5743-5747.
- Tompkins, M.B., D.H. Gebhard, H.R. Bingham, M.J. Hamilton, W.C. Davis, W.A.F. Tompkins (1990): Characterization of monoclonal antibodies to feline T lymphocytes and their use in the analysis of lymphocyte tissue distribution in the cat. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **26**, 305-317.
- Vahlenkamp, T.W., A. De Ronde, J. Balzarini, L. Naesens, E. De Clercq, M.J.T. van Eijk, M.C. Horzinek, H.F. Egberink (1995a): (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine is a potent inhibitor of feline immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 746-749.
- Vahlenkamp, T.W., H.F. Egberink, M.J.T. van Eijk, A.M.E. Slootboom-Kamphorst, E.J. Verschoor, M.C. Horzinek, A. De Ronde (1995b): Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction for quantitation of feline immunodeficiency virus. *J. Virol. Methods* **52**, 335-346.
- Verschoor, E.J., A.W. Van Vliet, H.F. Egberink, W. Hesselink, M.C. Horzinek, A. De Ronde (1993): Expression of feline immunodeficiency virus gag and env precursors in Sporoptera frugiperda cells and their use in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2350-2355.
- Yamamoto, J.K., E. Sparger, E.W. Ho, P.R. Andersen, T.P. O'Connor, C.P. Mandell, L. Lowenstine, R. Munn, N.C. Pedersen (1988): Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.* **49**, 1246-1258.
- Yamamoto, J.K., H. Hansen, E.W. Ho, T.Y. Morishita, T. Okuda, T. Sawaq, R. Nakamura, N.C. Pedersen (1989): Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *JAVMA* **194**, 213-220.

Anschrift d. Verf.: T. W. Vahlenkamp, A. De Ronde, M. C. Horzinek, H. F. Egberink, Abteilung Virologie, Fachgruppe Infektionskrankheiten und Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Utrecht, Yalelaan 1, NL-3584 CL Utrecht.