

Vogelhalter, kann man auch drei Ansteckungsperioden annehmen.

In freier Wildbahn und beim Züchter können die Vögel bereits kongenital oder durch andere Vögel infiziert werden. Beim Zoohändler kann der Kontakt mit anderen Vögeln und anderen Tieren ebenfalls zu einer Infektion führen. Die von uns beobachteten 6 Fälle von *S. wasenaar* bei Vögeln, die aus einer Zoohandlung stammten, sind wahrscheinlich auf Kontakt mit Reptilien oder Amphibien, bei denen dieser Serotyp häufig nachgewiesen wird, zurückzuführen. Schließlich, in der dritten Periode, in engster Wohngemeinschaft mit dem Menschen, können sich Stubenvögel auf vielfältige Art mit Salmonellen infizieren. Da Stubenvögel in der Regel keinen Kontakt mit wildlebenden Vögeln haben, scheiden diese als Infektionsquelle insoweit aus, als keine „Zwischenwirte“, wie Fliegen und andere Insekten, diesen Kontakt herstellen. Vielmehr kann angenommen werden, daß entweder latent infizierte Tiere infolge veränderter Lebensumstände beim Endbesitzer plötzlich sichtbar erkranken oder bei Haltung von mehreren Tieren eine Ansteckung von Vogel zu Vogel erfolgt oder sich die Vögel durch mit geschroteten Insekten und Krebsen angereichertem Futter infizieren oder aber eine Ansteckung durch den Besitzer selbst nicht ausgeschlossen werden kann. Der Mensch kann eine Quelle von Salmonella-Infektionen sein. Nach den Beobachtungen von STEINIGER (21) konnten Salmonellen bei Wildvögeln nur im Einflußbereich menschlicher Siedlungen festgestellt werden. Die 7 *S. dublin*-Erkrankungen, die wir bei aus Privathaushaltungen stammenden Vögeln nachweisen, könnten mit diesen Beobachtungen erklärt werden.

Zusammenfassung

Es wird über Untersuchungen bei 495 aus privaten Haushaltungen und Zoohandlungen stammenden Ziervögeln berichtet. Ubereinstimmend mit der Literatur über wildlebende Vögel ist hierbei der Serotyp *S. typhi murium* vorherrschend. Es wird versucht, die Epidemiologie zu klären. Bei 8,3% der eingesandten Vögel wurden Salmonellen nachgewiesen. Die epidemiologischen Aspekte werden diskutiert.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **89**, 135—137
© 1976, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
ISSN 0005—9366 · ASTM-Coden: BEMTAM

Aus dem Institut für Virologie der Tierärztlichen Fakultät der Reichsuniversität Utrecht, Niederlande
Direktor: Prof. Dr. M. C. HORZINEK

Untersuchungen zur Ätiologie der Felinen Infektiösen Peritonitis

Vorläufige Mitteilung

Von A. D. M. E. OSTERHAUS, M. C. HORZINEK und D. J. ELLENS*),
mit zwei Abbildungen

Eingegangen am 14. 1. 1976

Die virale Ätiologie bedeutender, spezifisch feliner Infektionskrankheiten wie der Panleukopenie, des Schnupfens (Herpes- und Calicivirusinfektionen) sowie der Leukämien und Sarkome ist zweifelsfrei nachgewiesen worden. Gegen die Katzenseuche und die Rhinotracheitis stehen Impfstoffe zur Verfügung, eine bessere Charakterisierung der Erreger hat prophylaktische Maßnahmen möglich gemacht. Weit weniger bekannt ist die Feline Infektiöse Peritonitis (FIP), die seit ihrer ersten klinischen Beschreibung im Jahre 1963

*) Elektronenmikroskopische Untersuchung am Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI), Abt. Virologie (Dir. Prof. Dr. J. VAN BEKKUM) Lelystad/NL.

D. Förster and H. Burow: Occurrence of salmonellae in pet birds in Berlin

Summary

Report is given on the occurrence of Salmonellae in 495 pet birds originated from private households or pet shops. Hereby the prevalence of the serotype *Salmonella typhimurium* corresponds with other reports. 8,3% of the tested birds yielded Salmonellae. The epidemiologic aspects are discussed.

Literaturverzeichnis

1. ENGLERT, H. K., K. HAASS, J. SCHNEIDER u. M. SCHNETTER (1967): Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **80**, 277. — 2. FABDOUL, G. P., G. W. FELLOWS u. J. BAIRD (1966): Avian Dis. **10**, 89. — 3. GERINGER, J. (1973): Kleintierpraxis **18**, 238. — 4. GOODCHILD, W. M., u. J. F. TUCKNER (1968): Brit. Vet. J. **124**, 95. — 5. GREUEL, E., u. J. ARNOLD (1971): Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **84**, 292. — 6. KÖSTERS, J., u. M. SCHEER (1967): Tierärztl. Umschau **22**, 68. — 7. KRONBERGER, H. (1969): Akademie-Verlag, Berlin. — 8. KRONBERGER, H. (1973): VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. — 9. LÜTHGEN, W. (1969): Deutsch. Tierärztl. Wschr. **76**, 453. — 10. MÜLLER, G. (1965): Nature London **207**, 1315. — 11. MÜLLER, H. (1970): Mh. Vet. Med. **25**, 346. — 12. MÜLLER, H. (1972): Mh. Vet. Med. **27**, 575. — 13. PIETZSCH, O., u. E. BULLING (1970): Bundesgesundhbl. **13**, 5. — 14. PIETZSCH, O., u. E. BULLING (1970): Bundesgesundhbl. **13**, 290. — 15. PIETZSCH, O., u. E. BULLING (1971): Bundesgesundhbl. **14**, 369. — 16. PIETZSCH, O., u. E. BULLING (1972): Bundesgesundhbl. **15**, 321. — 17. PIETZSCH, O., u. E. BULLING (1973): Bundesgesundhbl. **16**, 194. — 18. SCHAAL, E., u. H. ERNST (1967): Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **80**, 13. — 19. SCHNEIDER, J., u. E. BULLING (1969): Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **82**, 287. — 20. SCHOLTENS, R. TH., u. G. CAROLI (1971): Antonie v. Leeuwenhoek **37**, 473. — 21. STEINIGER, F. (1958): Desinfekt. Gesundh.-Wes. **50**, 156. — 22. STEINIGER, F. (1965): Zbl. Bakt. I. Orig. **197**, 210. — 23. TEFAMARIAM, H. (1973): Vet. Med. Diss. F. U. Berlin. — 24. WILSON, J. E., u. J. W. MACDONALD (1967): Br. vet. J. **123**, 212.

Anschriften der Verfasser: Dr. D. FÖRSTER, Pahlkestraße 5600 Wuppertal 1 und Dr. H. BUROW, Wartburgstraße 8, 1000 Berlin 62.

(5) als eine weitere Infektionskrankheit domestizierter und freilebender Feliden zunehmend Beachtung findet. Obwohl sie bei der einzeln gehaltenen Hauskatze nur recht selten diagnostiziert wird, ist sie durch ihre nahezu absolute Letalität eine bedeutende Erkrankung; in geschlossenen Kolonien konnte sie selbst als Ursache für etwa die Hälfte der jährlichen Todesfälle erkannt werden (11). In Tiergärten in den USA (2), den Niederlanden (10) und der Bundesrepublik Deutschland (12) fielen ihr kostspielige Großkatzen zum Opfer.

Im Gegensatz zu den eingangs genannten Infektionskrankheiten der Katze ist die FIP ätiologisch nicht aufgeklärt, gleichwohl liegen schon seit langem Hinweise auf ein

Virus vor. So ließ sich die Krankheit experimentell durch bakterienfreie Filtrate übertragen (16), und Ultradünnschnitte durch Histiozyten, Makrophagen und Mesothelzellen infizierter Katzen wiesen elektronenmikroskopisch Partikeln auf, deren Virusnatur und kausale Beteiligung am Krankheitsgeschehen freilich offen bleiben mußte (14).

Im folgenden berichten wir erste Ergebnisse von Untersuchungen über den Erreger der FIP, die im Rahmen der Arbeitsgruppe Klinische Virologie an unserem Institut durchgeführt werden. Die Inventarisierung bekannter und Identifizierung bislang unbekannter Viren einer Familie wie der Katzenartigen erschien uns deshalb so wichtig, weil diese als Hausgenossen, Zoo- und Laboratoriumstiere hinsichtlich ihrer Reservoirfunktion erkundet, durch Immunprophylaxe geschützt und im Sinne eines SPF-Status definiert werden müssen. Die lückenhafte Kenntnis etwa auf dem letztgenannten Gebiet erhellt daraus, daß der Ausschub für SPF- und gnotobiotische Versuchstiere in seinen Empfehlungen (1) die FIP nicht einmal erwähnt.

Material und Methoden

Virus: Bei -20°C aufbewahrte, bakteriologisch sterile Ascitesflüssigkeit eines 1969 klinisch und pathologisch-histologisch als FIP diagnostizierten Falles bei einer Hauskatze (Stamm Dahlberg) wurde als Impfmateriale für Tierpassagen verwendet. Über diesen ersten Nachweis der Erkrankung auf dem europäischen Kontinent, ihre Histopathologie, experimentelle Übertragung (9) und Passagegeschichte (7) wurde schon berichtet. — Außerdem wurde von Leberhomogenaten klinisch erkrankter Katzen für die Virusreinigung ausgegangen; Herrn Prof. Dr. P. Bachmann, München, sei hier für die Mithilfe bei der Materialbeschaffung gedankt.

Virusreinigung: Bei der Reinigung von Virus aus Organmaterial gingen wir von 10%igen Suspensionen in TEN-Puffer (0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) aus, die nach einmaligem Frieren/Tauen (flüssiger Stickstoff) 20 Min. lang bei $15\,000 \times g$ abgeschleudert wurden. Überstandsmaterial wurde auf eine 25%ige Saccharoselösung in TEN-Puffer geschichtet (15 ml), die ihrerseits auf einem 55% Saccharosekissen (5 ml) ruhte. Nach achtstündiger Zentrifugierung bei $23\,000$ Umdrehungen pro Min. in einem SW 27-Rotor der Spinco Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto, Cal., USA) wurde der ausgebildete Stufengradient fraktioniert und das Extinktionsprofil bei 254 nm im Durchfluß bestimmt (Uvijcord, LKB-Produkte, Stockholm, Schweden). Aus der Interphase zwischen beiden Zuckerlösungen wurde durch Einstellen einer 40%igen Sättigung mit Ammoniumsulfat Material präzipitiert, welches nach Suspendierung in TEN-Puffer auf einen isokinetischen Rohrzuckergradienten pipettiert wurde (15). Die Zentrifugierungsbedingungen waren für Teilchen einer angenommenen Dichte von $1,18\text{ g/ml}$ und einen Sedimentationskoeffizienten von 400 S berechnet worden. Als innerer Standard (270 S) diente mit ^3H -Uridin markiertes Semliki Forest Virus, ein gut charakterisiertes Alphavirus der Togafamilie (6). Nach Fraktionierung und Messung der Radioaktivität des Markers wurden Proben aus einer 400 S entsprechenden Position des Gradienten in einem isopyknischen Saccharosegradienten (20 bis 50%, linear) weiter aufgetrennt. Mit dem Elektronenmikroskop wurden kodierte Fraktionen auf ihren Gehalt an virusähnlichen 100-nm-Strukturen untersucht, wobei Polystyrol-Latexkügelchen als innerer Konzentrations- und Größenstandard dienten. Die Untersuchung der Virionstruktur erfolgte schließlich mit Material der Dichte $1,16\text{ g/ml}$.

Elektronenmikroskopie: Mit einem Kohlefilm beschichtete Kupfernnetzchen wurden mit $10\ \mu\text{l}$ des zu untersuchenden Materials beschickt und nach 10 Min. mittels eines Filterpapierstreifens abgesaugt. Nach wiederholtem Waschen in destilliertem Wasser wurde das Präparat mit einem Tropfen Phosphorwolframsäure (2%, mit 1 N KOH auf pH 6,0 eingestellt) kontrastiert, abgesaugt und getrocknet. Die elek-

tronenoptische Untersuchung erfolgte in einem JEOL JEM-100 C-Gerät bei 50 000facher Vergrößerung im Instrument.

Ergebnisse

Aufgrund der Partikelmorphologie in publizierten elektronenoptischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten (14) nahmen wir als Arbeitshypothese an, daß es sich bei dem FIP-assoziierten Virus um ein Mitglied der neuen Familie Coronaviridae handeln könnte (13). Die Reinigungsschritte wurden daher entsprechend den physikalischen Parametern bekannter Viren dieser Gruppe ausgelegt.

Obwohl Ascitesflüssigkeit wahrscheinlich nicht den höchsten Partikelgehalt aufweisen dürfte, wurde diese aus arbeits-technischen Gründen anfänglich als Ausgangsmaterial für die Reinigung verwendet und, wie für Organproben beschrieben, auf ein 55%-Zuckerkissen zentrifugiert. Nach Fixierung durch Dialyse gegen 0,4% Formaldehyd in TEN-Puffer ergab die isokinetische Zentrifugierung das in Abbildung 1 wiedergegebene Extinktionsprofil. Ein prominentes Maximum fand sich in einer Position, die einem Partikel von 410 Svedberg-Einheiten entspricht. Die elektronenmikroskopische Untersuchung parallel aufgearbeiteter Fraktionen zeigte Teilchen, wie sie in der Abbildung 2 dargestellt sind.

Organmaterialien experimentell und natürlich infizierter Katzen wurden wie beschrieben fraktioniert und zusätzlich zur Sedimentationsanalyse einer Gleichgewichtszentrifugierung im vorgebildeten Rohrzuckergradienten unterworfen. Nach zwölfstündigem Lauf bei $25\,000$ Umdrehungen pro Min. im SW 27-Rohr der Spinco Ultrazentrifuge waren isopyknische Bedingungen erreicht und im Röhrenlichtstreuung Banden sichtbar geworden; ihren Positionen entsprachen breite Extinktionsmaxima bei einer Dichte von etwa $1,16\text{ g/ml}$. Bei elektronenmikroskopischer Untersuchung fanden sich in diesen Fraktionen gehäuft Teilchen von vorwiegend einer Größenklasse (Abb. 2). Aus parallel aufgearbeiteten Lebern von klinisch gesunden Katzen konnten weder distinkte Extinktionsmuster erhalten noch größenhomogene Teilchen präpariert werden.

Die mit Formaldehyd fixierten wie auch die nativen Partikeln sind mäßig pleomorph, haben einen Durchmesser von etwa 100 nm und tragen deutliche Projektionen. In ihrem Inneren sind häufig unregelmäßig geformte, elektronendichte Flecke wahrnehmbar. An desintegrierten Teilchen

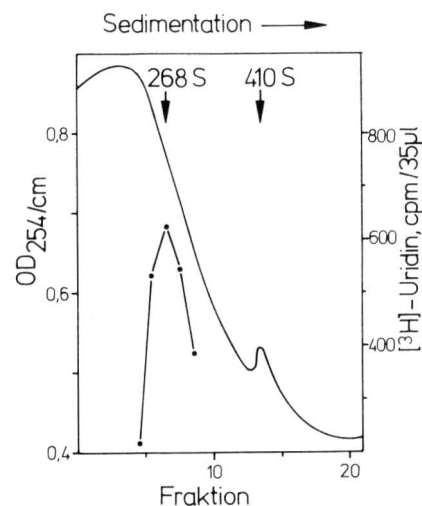


Abb. 1. Nachweis einer 410 S-Struktur in der Ascitesflüssigkeit einer an infektiöser Peritonitis gestorbenen Katze. Isokinetischer Rohrzuckergradient (15%—27%; Spinco SW 50L-Rotor, Zählerintegral $4\,173\ \omega^2t$) mit radioaktivem Semliki Forest Virus (268 S) als innerem Sedimentierungsmarker.

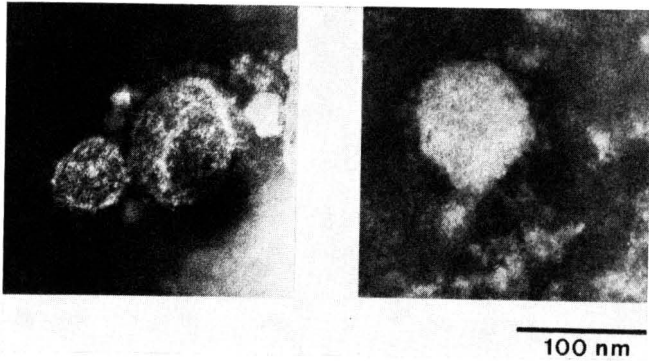


Abb. 2. Aus Leberhomogenat nativ (links) bzw. Ascitesflüssigkeit nach Formalinfixierung (rechts) präparierte Partikeln; beachte die Projektionen auf der Teilchenoberfläche.

konnte eine Membran beobachtet werden; charakteristische Innenstrukturen fehlten. Die Projektionen erscheinen schlingen- bis keulenförmig und sind etwa 15 nm lang.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Experimente haben zur teilweisen Reinigung und erstmaligen Negativkontrast-Darstellung eines Virus bei der Katze geführt, welches in mehreren Eigenschaften den Coronaviridae ähnelt. Dies gilt namentlich für seine Größe und Struktur, aber auch für seine hydrodynamischen Eigenschaften. Im Vergleich zu veröffentlichten Werten für Coronaviren (8) ist die Dichte mit 1,16 g/ml um etwa 0,02 g/ml zu niedrig, doch ist die zur Lokalisierung des Virusmaterials herangezogene Extinktionsmessung nicht in der Lage, zwischen intakten und desintegrierten Teilchen zu unterscheiden; die Werte in der Literatur wurden durch Messung der Infektiosität erhalten, diese ist aber für das FIP-assoziierte Virus bislang nicht *in vitro* zu bestimmen.

Es gibt mehrere Hinweise dafür, daß das coronaähnliche Virus kein zufällig kontaminierendes Agens ist, sondern der Erreger der FIP. Partikeln der charakteristischen Morphologie wurden in verschiedenen Ascitesflüssigkeiten und Organen von erkrankten bzw. gestorbenen Katzen gefunden; aus normalen Organen konnten mit den erarbeiteten Methoden keine Teilchen mit Coronavirus-Eigenschaften aufgereinigt werden, noch findet sich in der umfangreichen Literatur über feline Viren eine Beschreibung ähnlicher Partikeln. Der endgültige ätiologische Beweis durch Isolierung des Virus etwa in der Zellkultur und anschließenden Infektionsversuch steht freilich noch aus.

Die FIP wird einerseits als eine spezifisch feline Virus-erkrankung beschrieben, andererseits als eine obligat tödliche Infektionskrankheit — ein epidemiologisches Paradoxon. Um den Fortbestand des Virus in der Natur zu sichern, ist zu postulieren, daß ein extrafelines Virusreservoir vorhanden ist, deren „dead end host“ die Katze ist, und bzw. oder daß die klinisch diagnostizierte FIP nur ein Sonderfall der Infektion ist — sozusagen die sichtbare Spitze des Eisbergs. Die meisten Infektionen würden dann uncharakteristisch oder inapparent verlaufen. Für die letztere Annahme spricht die Beobachtung gehäufte FIP-Fälle bei Katzen mit Leukämie (3, 4); die im Verlaufe dieser Erkrankung einsetzende Immunsuppression mag der Vermehrung des latenten FIP-Virus Vorschub geleistet haben. — Die Entwicklung verlässlicher virologischer und serologischer Methoden ist eine Voraussetzung zur Lösung dieser Fragen.

Zusammenfassung

Aus Ascitesflüssigkeiten und Leberhomogenaten von mehreren an infektiöser Peritonitis erkrankten bzw. gestorbenen Katzen wurden erstmals Teilchen präpariert, deren Größe (etwa 100 nm), Oberflächenstruktur (keulenförmige Projektionen), Sedimentierungsverhalten (etwa 400 S) und Schwebedichte (etwa 1,16 g/ml) sie als den Coronaviridae ähnelnd ausweist; sie fehlten in Material von normalen Katzen. Ihre Bedeutung für die Ätiologie der Felinen Infektiösen Peritonitis wird diskutiert.

A. D. M. E. Osterhaus, M. C. Horzinek and D. J. Ellens:
Studies on the etiology of feline infectious peritonitis

Summary

From ascitic fluids and liver homogenates of several cats with a history of infectious peritonitis particles have been prepared which qualify as coronavirus-like on the basis of the following properties: size (about 100 nm), surface structure (club-shaped projections), sedimentation behaviour (about 400 Svedberg units) and buoyant density (about 1.16 g/ml); they were absent in material from normal cats. Their significance for the etiology of feline infectious peritonitis is discussed.

Literaturverzeichnis

1. Ausschluß für SPF und gnotobiotische Versuchstiere (1972): Liste zur Spezifizierung bei SPF-Versuchstieren. Veröff. Nr. 2, Zürich. — 2. COLBY, E. D., and R. J. LOW (1970): Feline infectious peritonitis. *Vet. Med./Small Anim. Clin.* **65**, 783. — 3. COTTER, S. M., C. E. GILMORE and C. ROLLINS (1973): Multiple cases of feline leukemia and feline infectious peritonitis in a household. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **162**, 1054. — 4. HARDY, W. D., and A. J. HURVITZ (1971): Feline infectious peritonitis: experimental studies. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **158**, 994. — 5. HOLZWORTH, J. (1963): Some important disorders of cats. *Cornell Vet.* **53**, 157. — 6. HORZINEK, M. C. (1973): The structure of togaviruses. *Progr. med. Virol.* **16**, 109. — 7. HORZINEK, M. C., A. D. M. E. OSTERHAUS and D. J. ELLENS (1976): Feline infectious peritonitis virus. I. Identification as a coronavirus family member. (In Vorbereitung). — 8. MCINTOSH, K. (1974): Coronaviruses: a comparative review. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **63**, 85. — 9. MIEOG, W. H. W., and J. H. M. RICHTER (1971): Feline infectious peritonitis. *Tijdschr. Diergeneesk.* **96**, 85. — 10. POELMA, F. G., J. C. PETERS, W. H. W. MIEOG and P. ZWART (1974): Infektiöse Peritonitis bei Karakal (Felis caracal) und Nordluchs (Felis lynx lynx). *Erkrankungen der Zootiere*, 13. Int. Symp. Helsinki, 245. — 11. POTKAY, S., J. D. BACHER and T. W. PITTS (1974): Feline infectious peritonitis in a closed breeding colony. *Lab. Anim. Sci.* **24**, 279. — 12. TUCH, K., K. H. WITTE und H. WULLER (1974): Feststellung der felinen infektiösen Peritonitis bei Hauskatzen und Leoparden in Deutschland. *Zbl. Vet. Med. B* **21**, 426. — 13. TYRRELL, D. A. J. (1975): Coronaviridae. *Intervirology* **5**, 76. — 14. WARD, J. M. (1970): Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis. *Virology* **41**, 191. — 15. ZEYST, B. A. M. v. D., and H. P. J. BLOEMERS (1975): 4698 Isokinetic glycerol and sucrose gradients for density gradient centrifugation, in "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology" (FASMAN, G. D., ed.), 3rd ed. The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio (im Druck). — 16. ZOOK, B. C., N. W. KING, R. L. ROBISON and H. L. MCCOMBS (1968): Ultrastructural evidence for the viral etiology of feline infectious peritonitis. *Path. Vet.* **5**, 91.

Anschrift der Verf.: Drs. A. D. M. E. OSTERHAUS, Instituut voor Virologie, Faculteit der Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit te Utrecht, Practicumgebouw, Yalelaan 1, Uithof Nederland.