

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

# **Molekularer Nachweis von Felinem Coronavirus basierend auf einem Rekombinase-Polymerase- Amplifikationstest**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von

Rea Maja Kobialka

aus Bonn

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

GutachterInnen: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches  
Veterinärwesen, Universität Leipzig

Prof. Dr. Regina Hofmann-Lehmann, Vetsuisse-Fakultät,  
Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 24.05.2022

## Abkürzungsverzeichnis

---

AG	Antigen
AK	Antikörper
APN	Aminopeptidase-N
CCoV	Canines Coronavirus
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
Ct	cycle threshold
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dsDNA	doppelsträngige Desoxribonukleinsäure
E-Gen	Envelope-Gen (Hüll-Gen)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCoV	Felines Coronavirus
FECV	Felines Enterales Coronavirus
FNA	Feinnadelaspiration
FIPV	Felines Infektiöses Peritonitis-Virus
FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
ICTV	Internationaler Ausschuss für Taxonomie der Viren
IFAT	Indirect Immunofluorescent Antibody Test
IFA	Immunofluorescence assay
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
Kb	Kilobasen
LAMP	loop-mediated isothermal amplification
M-Gen	Membrane-Gen
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)

---

---

N-Gen	Nucleocapsid-Gen
Nsp	non-structural protein (nicht-strukturelles Protein)
OIE	World Organisation for Animal Health
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PRCoV	Porcines Respiratorisches Coronavirus
RdRP-Gen	RNA-dependent RNA polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RIM	Rapid Immunochromatographie
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RP	Rückwärts-Primer
RT-nPCR	reverse transcription-nested polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RT-RAA	reverse transcription recombinase assisted amplification
RT-RPA	reverse transcription recombinase polymerase amplification (Reverse Transkriptase-Rekombinase Polymerase Amplifikation)
SEN	Sensitivität
SERS	Surface-enhanced Raman scattering
S-Gen	Spike-Gen
SMR	Silizium-Mikroringresonator
SP	Spezifität
ssRNA	single-stranded RNA (Einzelsträngige RNA)
TGEV	Transmissible Gastroenteritis-Virus
TMB	Tetramethylbenzidin

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Felines Coronavirus</i>	3
2.1.1 Virus Klassifikation	3
2.1.2 Struktur und Genom	4
2.1.3 Virusevolution	6
2.2 <i>Epidemiologie und Krankheitsverlauf</i>	8
2.2.1 Übertragung und Umweltstabilität	8
2.2.2 Krankheitsverlauf	9
2.2.3 Prävalenz	12
2.2.4 Prävention	13
2.2.5 Behandlung	13
2.2.6 Impfung	14
2.3 <i>Diagnostik</i>	15
2.3.1 Indirekter Erregernachweis	15
2.3.2 Direkter Erregernachweis	17
<b>3. Publikation</b>	<b>27</b>
3.1 <i>Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation</i>	27
3.2 <i>Publikation</i>	27
<b>4. Diskussion und Schlussfolgerung</b>	<b>40</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>47</b>
<b>6. Summary</b>	<b>49</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>65</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>72</b>



# 1. Einleitung

Das Feline Coronavirus (FCoV) ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus (DE GROOT et al. 2011). Es ist hochinfektiös und endemisch in Katzenpopulationen weltweit (POSCH 2001, AN et al. 2011, KLEIN-RICHERS et al. 2020). Basierend auf Mutationen im viralen Genom und damit verbundener veränderter Pathogenität werden zwei Biotypen unterschieden: das weit verbreitete avirulente Feline Enterale Coronavirus (FECV) und das hochvirulente Feline Infektiöse Peritonitis-Virus (FIPV) (PEDERSEN et al. 1981a, PEDERSEN et al. 1981b). Um Verwirrung zu vermeiden, wird in dieser Dissertation immer dann von FCoV gesprochen, wenn beide Viren betroffen sind oder es unklar ist, ob es sich um ein FECV oder ein FIPV handelt. Während eine Infektion mit FECV nur zu milden gastrointestinalen Veränderungen führt oder subklinisch bleibt, kommt es bei 5-10% aller infizierten Katzen zu pathogenetisch relevanten Mutationen im viralen Genom die zu der Entwicklung der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP) führen (ADDIE and JARRETT 1990, ADDIE and JARRETT 1992, ADDIE et al. 1995). Die klinischen Veränderungen der FIP sind meist unspezifisch und umfassen Apathie, Fieber und Gewichtsverlust, oft gefolgt von Ergüssen in Bauch- oder Brusthöhle. Außerdem kann es zu neurologischen oder okularen Veränderungen kommen (PEDERSEN 2009). Katzen mit FIP-Effusionen haben im Durchschnitt nur eine Überlebensrate von wenigen Tagen (RITZ et al. 2007). Neue Studien zu antiviraler Therapie mit einem Adenosin-Analogon führten zu vielversprechenden Ergebnissen, das Medikament ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nur sehr begrenzt für den klinischen Routinegebrauch verfügbar (ADDIE et al. 2020a, DICKINSON et al. 2020).

Das FECV wird über den fäkal-oralen Weg übertragen und infiziert in erster Linie Epithelzellen, vor allem Enterozyten. Zu den potenziellen Risikofaktoren einer Infektion gehören unter anderem das Alter, der Immunstatus der Katzen, sowie die Anzahl der in einem Haushalt lebenden Katzen (KLEIN-RICHERS et al. 2020). Ziel eines jeden Haushaltes sollte es sein, die Viruslast möglichst gering zu halten und das Risiko einer Infektion zu minimieren.

Für den Nachweis des FCoV gibt es Antikörper-Tests, welche nachweisen, dass die Katze Kontakt mit dem Virus hatte, aber nicht zwangsläufig gerade eine aktuelle Infektion durchmacht (ADDIE et al. 2015). Die molekulare Diagnostik dagegen, weist direkt Virusnukleinsäure nach und zeigt dadurch das Vorhandensein des Virus in der

Katze bzw. in ihren Ausscheidungen. Da das Virus vor allem mit dem Kot ausgeschieden wird, ist der direkte Nachweis von Viruspartikeln im Kot am geeignetsten, um Virusausscheider zu identifizieren (ADDIE and JARRETT 2001). Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welches hierfür meist genutzt wird, ist hochsensibel, aber erfordert ein hochausgestattetes Labor und ist kosten- und zeitintensiv. Um potentielle Ausscheider erkennen und gegebenenfalls isolieren zu können, ist ein einfaches, schnelles Verfahren essentiell, welches auch eine mehrfache Testung ermöglicht. Dies gewinnt noch zusätzlich an Bedeutung, da Katzen, die sich mit dem Virus infiziert haben, FCoV intermittierend ausscheiden können bzw. sich auch nach einer überstandenen Infektion erneut mit dem Virus infizieren können. Daher sollten mehrere Proben im Abstand von einer Woche bis einen Monat genommen werden (KLEIN-RICHERS et al. 2020).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Schnelltest entwickelt, welcher die Nachweiszeit des FCoV in Kot erheblich verkürzt und so ein schnelles Handeln ermöglicht. Der entwickelte Test beruht auf einem isothermalen Verfahren, der Reverse Transkriptase Rekombinase Polymerase Amplifikation (RT-RPA). Kern dieses Verfahrens ist es, mithilfe des Einsatzes von Enzymen den Doppelstrang zu trennen und damit auf die Temperaturzyklen der PCR verzichten zu können. Dies ermöglicht eine Vervielfältigung von Nukleinsäuren bei konstanten 42 °C und innerhalb von 15 Minuten. Im Rahmen dieser Studie wurde die nicht-translatierte Region (untranslated region, UTR) am 3'-Ende des 7b Gens als Zielregion ausgewählt, da diese als sehr konserviert unter den FCoV-Stämmen gilt. Die klinische Sensitivität und Spezifität wurde mit 39 Kotproben von Katzen bestimmt und alle Ergebnisse wurden mit denen der real-time Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) verglichen. Für mögliche Kreuzreaktionen wurden 19 Viren aus Zellkultur aufgereinigt und getestet. Insgesamt zeigte der entwickelte Test eine Sensitivität von 90,9% und eine Spezifität von 100% verglichen mit der real-time RT-PCR (GUT et al. 1999).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Felines Coronavirus

#### 2.1.1 Virus Klassifikation

Das FCoV ist Teil der Familie *Coronaviridae*, Ordnung *Nidovirales*. Die *Coronaviridae* bilden eine Gruppe umhüllter, einzelsträngiger RNA-Viren mit nicht segmentierten Genomen von etwa 30 Kilobasen (kb) und positiver Orientierung. Sie werden nach dem Internationalen Ausschuss für Taxonomie der Viren (ICTV) in zwei Unterfamilien, den *Letovirinae* und den *Orthocoronavirinae* eingeteilt. Zusammen mit dem Caninen Coronavirus (CCoV), dem Transmissiblen Gastroenteritis-Virus (TGEV) und dem Porcinen Respiratorischen Coronavirus (PRCoV) gehört das FCoV zu den *Orthocoronavirinae*, Gattung der *Alphacoronaviren* (DE GROOT et al. 2011, KING et al. 2018) (Abbildung 1).

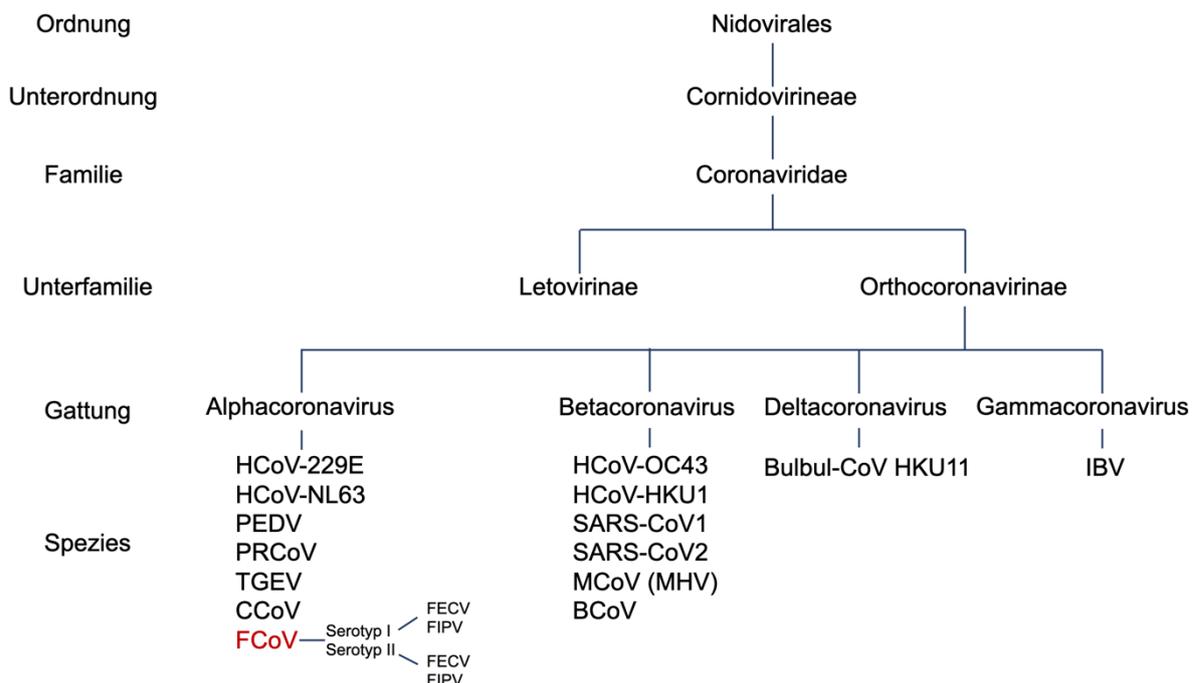
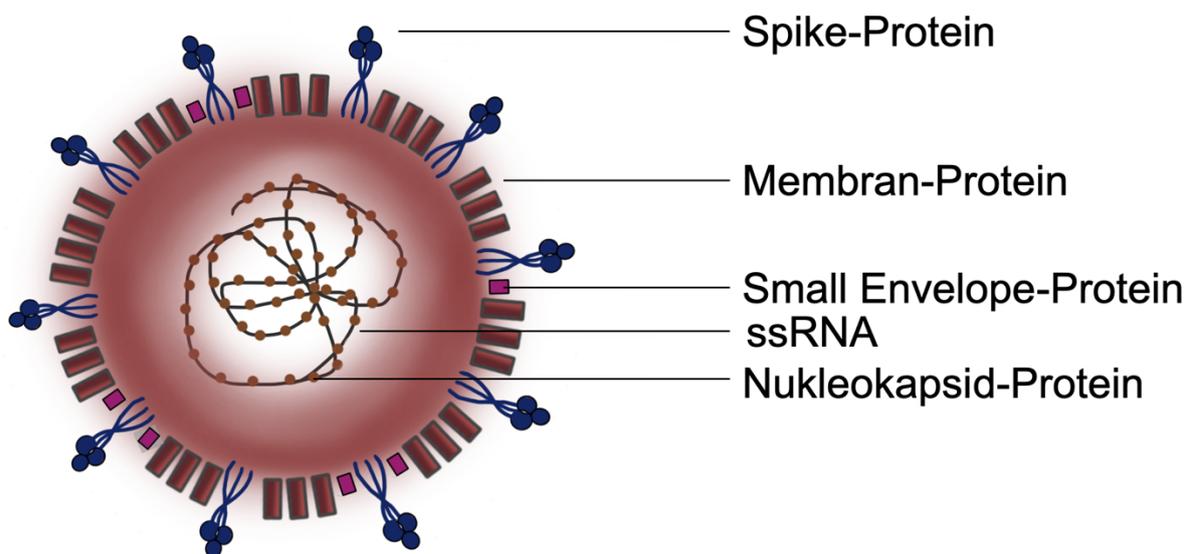


Abbildung 1. Stammbaum der Ordnung Nidovirales mit Fokus auf dem Felines Coronavirus und Beispielen für jede Gattung: HCoV, Humanes Coronavirus; PEDV, Porcines epidemic diarrhea virus; PRCoV, Porcines respiratorisches Coronavirus, CCoV, Canines Coronavirus; FCoV, Felines Coronavirus; FECV, Felines Enterales Coronavirus; FIPV, Felines Infektiöses Peritonitis Virus; SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome coronavirus, MCoV, Murine Coronavirus; MHV, Murines

Hepatitisvirus; BCoV, Bovines Coronavirus; Bulbul-CoV, Bulbul coronavirus; IBV, infectious bronchitis virus. Abbildung erstellt mit Daten modifiziert aus dem Internationalen Ausschuss für Taxonomie der Viren.

### 2.1.2 Struktur und Genom

Die Struktur von allen Coronaviruspartikeln ist ähnlich: genomische, einzelsträngige RNA (ssRNA) ist zusammen mit Nukleokapsid-Proteinen von einer Hülle, welche aus Membran-Glykoproteinen und „small envelope“-Proteinen besteht, umgeben. An ihrer äußeren Hülle befinden sich Oberflächenproteine, die Spike Proteine (DE GROOT et al. 2011) (Abbildung 2).



*Abbildung 2.* Das FCoV mit seinen einzelnen Strukturproteinen (ssRNA, single strand ribonucleic acid). Abbildung erstellt mit Informationen nach (BARKER and TASKER 2020).

Das Genom aller *Alphacoronaviren* besteht aus mehreren offenen Leserahmen (ORFs). Sechs ORFs sind in Viren aller Unterfamilien vorhanden (ORF 1a, b (das RdRP-Gen = RNA-dependent RNA polymerase-Gen); Spike- (S); Envelope- (E); Membran- (M); Nukleokapsid-Gen (N)). Die ORFs 1a und b codieren für Polyproteine,

welche in einzelne nicht-strukturelle Proteine (NSPs) gespalten werden. Diese nicht-strukturellen Proteine sind unter anderem die für die Replikation wichtige RNA-Polymerase sowie virale Proteasen. S-, E-, M- und N-Gen kodieren für die Strukturproteine des Virions. Zusätzlich dazu gibt es artspezifische, nicht strukturelle, akzessorische Gene, welche für die virale Replikation eine Rolle spielen (DE GROOT et al. 2011, TERADA et al. 2014). FCoV's besitzen fünf zusätzliche ORFs. Drei (das 3a-,b-,c-Gen) befinden sich zwischen dem S- und dem E-Gen, während sich zwei, 7a und 7b, am 3'-Ende des Genoms befinden (TERADA et al. 2014). Sowohl an dem 5'- als auch an dem 3'-Ende befinden sich sogenannte nicht-translatierte Regionen (UTR). Die Sequenzanalyse der 3'-UTR des akzessorischen 7-Gens ergab große Ähnlichkeiten zwischen FCoV, CCoV und TGEV (DE GROOT et al. 1987, HORSBURGH et al. 1992, VENNEMA et al. 1995) (Abbildung 3).

Bei den FCoV unterscheidet man zwischen Serotyp I und Serotyp II. Letzterer entsteht durch eine Rekombination mit dem CCoV und enthält das Spike-Gen sowie unterschiedlich lange Abschnitte der angrenzenden ORF-3-Gene des CCoV. In bestimmten Stämmen des Serotyps II ist zusätzlich das Feline RdRP-Gen durch das des CCoV ersetzt (TERADA et al. 2014). Innerhalb dieser beiden Serotypen werden zusätzlich noch zwei Biotypen, das Feline Enterale Coronavirus (FECV) und das Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV), unterschieden (PEDERSEN et al. 1981b).

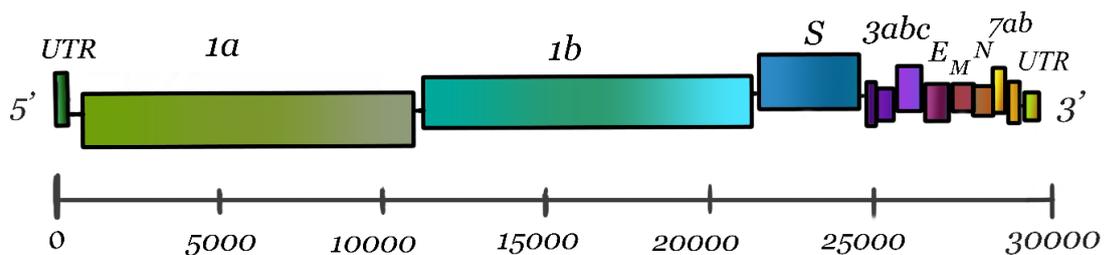


Abbildung 3. Das Genom des Felinen Coronavirus mit seinen ca. 30.000 Basen. UTR, untranslated region; S, Spike-Gen; E, Envelope-Gen; M, Membrane-Gen; N, Nukleocapsid-Gen. Abbildung erstellt mit Informationen nach (BARKER and TASKER 2020)

### 2.1.3 Virusevolution

Der Ursprung des FCoV ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gänzlich geklärt. Während das FECV erst später dokumentiert wurde, gab es erste Aufzeichnungen zu FIP-Erkrankungen schon 1963 (HOLZWORTH 1963). Zook et al. bewiesen 1968 erstmals, dass ein Virus für die Entstehung der FIP verantwortlich ist (ZOOK et al. 1968) und Ward et al. ordneten es der Familie der Coronaviren zu (WARD 1970). Die enge antigenetische Verwandtschaft zwischen FCoV, CCoV und TGEV wurde in mehreren Studien durch serologische Kreuzreaktionen festgestellt und genauer analysiert (PEDERSEN et al. 1978, HORZINEK et al. 1982). Erst 1981 wurde durch Pederson et al. beschrieben, dass viele seropositive Katzen ein Virus ausscheiden, welches antigenisch ähnlich zum FIPV ist, aber meist nur zu einer milden Enteritis und nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer FIP führt. So entstand die Unterscheidung zwischen den beiden Biotypen des FCoV (PEDERSEN et al. 1981b).

Je nach Pathogenität differenziert man zwischen dem avirulenten FECV und dem hochvirulenten FIPV (PEDERSEN et al. 1981a, PEDERSEN et al. 1981b). Während das FECV hauptsächlich Enterozyten des Darms befällt, infiziert das FIPV vor allem Monozyten und Makrophagen und führt so zu einer systemischen Erkrankung und damit verbundenen Entzündungserscheinungen in verschiedenen Organen (PEDERSEN 2014). Die an der Verschiebung der FCoV-Virulenz beteiligten Gene sind zwar noch nicht vollständig bekannt, jedoch wurden Mutationen in verschiedenen Genen festgestellt, welche mit dem Wechsel zu der hochvirulenten Variante in Verbindung gebracht werden. Obwohl das FECV hauptsächlich auf den Intestinaltrakt beschränkt bleibt, können beide Biotypen in bestimmten Phasen der Infektion auch in anderen Organen nachgewiesen werden (MELI et al. 2004a, KIPAR et al. 2006, FISH et al. 2018).

Bei der Untersuchung von verschiedener FCoV/FIPV-Stämmen ergab der Vergleich der Sequenzen in > 95% der vermuteten FIP-Fälle Unterschiede in zwei Codons des Spike-Gens. Diese werden als M1058L und S1060A bezeichnet, basierend auf der Position und der Art der Aminosäureänderung, d. h. Methionin zu Leucin an Position 1058 und Serin zu Alanin an Position 1060 (CHANG et al. 2012). Coronavirus-S-Proteine, welche auf der Basis des Spike-Gen gebildet werden, sind Fusionsproteine der Klasse I. Sie enthalten zwei Regionen mit Heptad-Wiederholungen und ein Fusionspeptid und sind für die Rezeptorbindung und Zellfusion verantwortlich (BOSCH et al. 2003). Die Mutationen treten in der membrannahen Domäne des Gens auf, die

als Fusionspeptid fungiert. Beide Mutationen sind unauffällig und es gibt keine Hinweise auf funktionelle Konsequenzen (CHANG et al. 2012). Dennoch führt die bekannte Funktion des Spike-Proteins zu der Hypothese, dass diese Mutationen zu einer Änderung des Zelltropismus führen, die es dem Virus ermöglicht, Makrophagen und Monozyten anstelle von Epithelzellen zu infizieren und sich dort zu replizieren. Dies lässt die Entstehung einer virulenten Variante vermuten, die eher eine systemische als eine enterale Infektion verursacht (STODDART and SCOTT 1989, CHANG et al. 2012).

Wären diese Mutationen der einzige Grund für die veränderte Virulenz, müsste die FIP-Erkrankung sehr viel häufiger auftreten als es mit ca. 10% aller FCoV infizierten Katzen der Fall ist (ADDIE and JARRETT 1992). Ein Grund für die relativ niedrige Prävalenz von FIP-Infektionen könnte sein, dass nicht diese beiden Mutationen allein zu dem virulenten Pathotyp führen, sondern zusätzliche Mutationen benötigt werden. Vermutet werden diese im akzessorischen Gen 3c, welches bei 2/3 der FIPVs betroffen ist. Da das 3c-Gen für die Replikation des Virus in den Darmepithelzellen benötigt wird, wird es aufgrund von Mutationen an anderer Stelle im Genom überflüssig, wenn das Virus dadurch andere Gewebe oder Zellen im Körper infizieren kann. Dies kann dazu führen, dass das Virus nicht mehr in den Darm zurückkehren kann und daher keine Viruspartikel mehr mit den Fäkalien ausgeschieden werden. Diese Annahme steht im Zusammenhang mit der geringen Inzidenz von FIP-Ausbrüchen (CHANG et al. 2010, CHANG et al. 2012, PEDERSEN et al. 2012).

Neben diesen Mutationen wurde in einer anderen Studie eine weitere Mutation an der Spaltstelle zwischen der Rezeptorbindung (S1) und der Fusionsdomäne (S2) des Spike-Proteins festgestellt. Während alle FECV eine konservierte Furin-Spaltstelle hatten, wurde bei den meisten FIPV mindestens eine Substitution gefunden (LICITRA et al. 2013).

In einer weiteren Studie wurden ebenfalls Mutationen in der Heptad-Repeat-1-Region des S-Gens mit der Ausbildung von FIP in Verbindung gebracht, wobei auch hier ein Zusammenhang zwischen Mutationen im 3c-Gen und Mutationen im Spike-Gen festgestellt wurde, welche vermutlich zu veränderter Virulenz führen (BANK-WOLF et al. 2014).

Während es einerseits die Theorie gibt, dass diese beiden Biotypen nebeneinander in den Katzenpopulationen zirkulieren (die sogenannte „circulating virulent-avirulent FCoV“-Hypothese) (BROWN et al. 2009) vertreten oben genannten Studien die

„internal mutation“ – Hypothese. Diese besagt, dass ein avirulentes Virus, also FECV, von der Katze aufgenommen wird und erst im Körper der Katze zu dem virulenten Virus (FIPV) mutiert.

## 2.2 Epidemiologie und Krankheitsverlauf

### 2.2.1 Übertragung und Umweltstabilität

Das FCoV wird vor allem mit dem Kot ausgeschieden und über den fäkal-oralen Weg übertragen. FECV infiziert in erster Linie Epithelzellen, vor allem Enterozyten (PEDERSEN 1995, ADDIE and JARRETT 2001, DE GROOT et al. 2011) und wurde bei infizierten Katzen in unterschiedlichen Darmabschnitten nachgewiesen (PEDERSEN et al. 1981b, HERREWEGH et al. 1997, MELI et al. 2004b, VOGEL et al. 2010). Im Speichel konnte das Virus bisher nur sehr selten (bei 7% der infizierten Katzen einer Studie) nachgewiesen werden (ADDIE and JARRETT 2001). Die Dokumentation einer FIP assoziierten Rhinitis könnte allerdings darauf hindeuten, dass der Respirationstrakt ebenfalls eine Eintrittspforte für eine Infektion mit FCoV sein könnte (ANDRÉ et al. 2020). Es gibt nur einen beschriebenen Fall der transplazentaren Übertragung, bei dem die Katze während der Trächtigkeit an FIP erkrankte (PASTORET and HENROTEAUX 1978). Auch die Übertragung über Sperma wurde untersucht, wobei das Virus bei 15% der untersuchten Kater im Hoden nachgewiesen werden konnte. Da allerdings keine der Spermaproben dieser Studie positiv war, ist eine venerische Übertragung unwahrscheinlich (STRANIERI et al. 2020).

In der Umgebung weist das Virus eine hohe Tenazität auf. Auf kontaminierten, trockenen Oberflächen konnten auch nach 3 bis 7 Wochen noch infektiöse Partikel isoliert werden (SCOTT 1988).

Am wahrscheinlichsten ist somit die Übertragung über fäkal-oralen Weg, entweder über direkten Kontakt oder aber indirekt über kontaminierte Gegenstände. Dabei spielt auch das Alter der sich in einem Hausstand befindenden Katzen eine Rolle, da vor allem junge Katzen große Mengen an Virus ausscheiden (PEDERSEN et al. 2008, KLEIN-RICHERS et al. 2020). Die Vermutung liegt nahe, dass in dem Zusammenhang ein möglicherweise lückenhaftes Hygiene-Konzept der jeweiligen Katzenhaltung eine zusätzliche Rolle spielt. In einer Studie, konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen Haltungen mit verschiedenen Hygienekonzepten festgestellt werden. Das führt zu der Hypothese, dass das Virus durch Standard-

Hygienemaßnahmen nicht ausreichend entfernt/deaktiviert wird (KLEIN-RICHERS et al. 2020). Unterstützt wird diese Vermutung durch die hohe Infektiösität von FCoV. In einer Studie infizierten sich 28 von 50 FCoV negativen Katzen innerhalb einer Woche mit dem Virus, nachdem sie in einem Tierheim untergebracht wurden (PEDERSEN et al. 2004).

Viruspartikel sind empfindlich gegenüber Hitze sowie gegenüber Lipidlösungsmitteln, nichtionischen Detergenzien, Formaldehyd, Oxidationsmitteln und UV-Bestrahlung (DE GROOT et al. 2011).

Nach der Infektion mit FCoV beginnt das Tier meist innerhalb einer Woche selbst Viruspartikel mit dem Kot auszuscheiden (MELI et al. 2004b). Obwohl viele Katzen asymptomatisch bleiben, persistiert die Ausscheidung über Wochen bis Monate, manchmal auch ein Leben lang. Dabei kann die Virusausscheidung intermittierend oder kontinuierlich erfolgen (ADDIE and JARRETT 2001). Serokonversion erfolgt meist 1-4 Wochen nach der Infektion (STODDART et al. 1988, MELI et al. 2004b, DESMARETS et al. 2016), wobei eine Korrelation zwischen einem hohem Antikörpertiter und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Virusausscheidung besteht (PEDERSEN et al. 2008, FELTEN et al. 2020). Außerdem spricht ein höherer Titer für frequentierteres Ausscheiden sowie eine höhere Viruslast im Kot (FELTEN et al. 2020). Die Immunität nach einer Infektion ist nur von kurzer Dauer und Katzen können sich erneut mit dem Virus infizieren (PEDERSEN et al. 2008).

### 2.2.2 Krankheitsverlauf

Im Hinblick auf die Immunantwort des Organismus auf eine Infektion mit FCoV muss man deutlich zwischen dem FECV, welches sich vor allem in den Enterozyten des Colons vermehrt, und dem FIPV, welches überwiegend Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und Monozyten befällt, differenzieren (KIPAR et al. 2010, VOGEL et al. 2010, CHANG et al. 2012).

Viren des Serotyps II des FECV binden nach oraler Aufnahme an ein Enzym, die Aminopetidase-N (APN), welches sich unter anderem auf den Darmzotten des Intestinaltrakts befindet (HOHDATSU et al. 1998, TRESNAN and HOLMES 1998), während der Rezeptor des Serotyps I des FECV noch nicht identifiziert wurde (JAIMES and WHITTAKER 2018).

Eine Infektion mit dem FECV löst bei der Katze eine humorale, mukosale und eine humorale, systemische Reaktion aus (PEARSON et al. 2019). Während manche

Katzen es dadurch schaffen die Replikation des FECV erfolgreich zu kontrollieren und das Virus zu eliminieren, bleiben andere persistent infiziert (FOLEY et al. 1997a, PEDERSEN et al. 2008). Innerhalb der Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen infiziert FCoV vor allem Makrophagen und Monozyten (MELI et al. 2004b). Die spezifische humorale Immunantwort beruht darauf, dass die Viruspartikel zu den Lymphknoten transportiert werden und dort präsentiert werden. B-Lymphozyten differenzieren sich daraufhin zu Plasmazellen, welche Antikörper produzieren und an das Blut abgeben. Nachweisbare Titer werden meist erst nach ein bis zwei Wochen erreicht, allerdings ist zu vermuten, dass schon vorher eine wirksame Immunantwort besteht. Antikörper vom Typ Immunglobulin A (IgA) sind mukophil und reichern sich in größerer Konzentration in dem Schleim, der die Epithelzellen des Darms bedeckt, an. IgA binden an Oberflächenproteine von Viruspartikeln, die aus Enterozyten freigesetzt wurden und verhindern dadurch eine Neuinfektion weiterer Zellen (PEDERSEN 1995). Zusätzlich konnte auch eine intrazelluläre Inaktivierung von Viren in der Lamina Propria nachgewiesen werden (BRANDTZAEG 2007). Da sich das Virus kaum systemisch verbreitet, ist die zelluläre Antwort im Gegensatz nur sehr schwach ausgebildet (PEDERSEN 1995). Auch Pearson et al wiesen in einer Studie mit FECV infizierten Katzen die Beteiligung von mukosalem IgA und systemischen Immunglobulin G (IgG) nach, während es keine Hinweise auf eine zelluläre Immunantwort gab. Es konnten nur minimale strukturelle bzw. funktionelle Störungen im Colon nachgewiesen werden und die humorale Immunantwort ebte schnell ab nachdem das Virus beseitigt war (PEARSON et al. 2019).

Die häufigsten klinischen Zeichen für eine FCoV-Infektion sind Enteritiden: In einer Studie wurde signifikant öfter FCoV in Durchfallproben als in normalen Kotproben nachgewiesen (SABSHIN et al. 2012). Neben normalerweise mildem Durchfall und Erbrechen (PEDERSEN 1995), wurde in seltenen Fällen auch von schwerer Fällen von Enteritis mit Durchfall und/oder Erbrechen und verkümmertem Wachstum berichtet (KIPAR et al. 1998).

Die geringe Dauer der Immunität gegen FCoV führt dazu, dass es zu einer Reinfektion kommen kann. Dies spielt insbesondere in Tierheimen oder Zuchten eine Rolle. Dort kann es durch wiederholte Exposition, Infektion und Ausscheidung zu einer erhöhten Virusreplikation und damit vermehrt zu Mutationen kommen (PEDERSEN et al. 2009, PEDERSEN et al. 2012). Auch andere Faktoren, die zu einer vermehrten Virusreplikation und dadurch zu erhöhten Fehlerraten in der viralen RNA führen,

erhöhen vermutlich die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung des virulenten Biotyps. Diese Faktoren umfassen junges Alter der Katzen und damit schwächer entwickeltes Immunsystem, Rassen-Prädisposition, Immunsuppression durch Vorerkrankungen, Stress sowie Virusmenge und Virulenz (FOLEY et al. 1997b).

Kommt es zu Mutationen im viralen Genom, die dazu führen, dass die Viruspartikel eine höhere Affinität für Makrophagen und Monozyten ausbilden, führt dies zu einer systemischen Verbreitung und der möglichen Ausbildung von FIP (PEDERSEN 2014). Während bei dem FIPV des Serotyps II sowohl die Aminopetidase-N (APN) als auch das als Rezeptor fungierende DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) eine Rolle bei der Infektion von Monozyten spielen, ist bei dem FIPV des Serotyps I das DC-SIGN und nicht APN am Eintrittsprozess von FIPV des Serotyps I in Monozyten beteiligt (VAN HAMME et al. 2011, JAIMES and WHITTAKER 2018). Wie genau das Virus mit den Rezeptoren interagiert und welche Rolle das Spike-Protein dabei spielt ist allerdings noch unklar (JAIMES and WHITTAKER 2018).

FIP ist geprägt durch effiziente Virusreplikation in Makrophagen/Monozyten und damit gekoppelten immunpathologischen Prozessen wie der Ablagerung von Antigen-Antikörperkomplexen, Lymphozyten-Apoptose und granulomatösen Entzündungen (VENNEMA et al. 1998, PEDERSEN et al. 2009, BARKER et al. 2013). Dabei können die klinischen Anzeichen je nach betroffenem Organ - oft Leber, Niere, Pankreas, Auge – oder Zentralem Nervensystem variabel sein. Sie entstehen meist durch eine Schädigung der versorgenden Blutgefäße mit Vaskulitis und folgendem Organversagen. Oft zeichnet sich eine FIP durch fibrinöse Peritonitis, Pleuritis oder Perikarditis mit Ergüssen im Abdomen, Thorax und/oder Perikard aus. Aber auch Formen ohne offensichtliche Ergüsse mit granulomatösen Veränderungen an verschiedenen Organen sind möglich (HARTMANN 2005). Eine FIPV-Infektion führt zu einer starken Unterdrückung der zellulären Immunantwort durch Verminderung der natürlichen Killerzellen und der regulatorischen T-Zellen im Blut. (VERMEULEN et al. 2013).

### 2.2.3 Prävalenz

Das FCoV ist weltweit verbreitet und nur ein paar kleinere Inseln wie die Falklandinseln (ADDIE et al. 2012) und die Galapagosinseln (LEVY et al. 2008) gelten als FCoV-frei, da dort bei keiner Katze Antikörper gegen FCoV nachgewiesen werden konnten.

Für die Kontrolle der Verbreitung von FCoV werden sowohl Antikörper im Blut von Katzen gemessen als auch Kot oder Rektalabstriche auf Viruspartikel untersucht. Je nach Region, Haltungsart und Anzahl der getesteten Katzen variiert die Antikörperprävalenz dabei zwischen dem niedrigsten Wert mit 13,7% in Korea (AN et al. 2011) und dem höchsten mit 78% in Deutschland (KLEIN-RICHERS et al. 2020).

Serotyp I dominiert in den Katzenpopulationen (ADDIE et al. 2003, BENETKA et al. 2004), während Serotyp II für *in vitro* Diagnostik genutzt wird, da er im Gegensatz zu Serotyp I effizienter in der Zellkultur wächst (PEDERSEN et al. 1984). Generell ist die Prävalenz für FCoV-Infektionen in Katzenhaushalten mit mehreren Katzen wie Tierheime oder Katzenschulen höher als bei einzeln gehaltenen Katzen oder Wildkatzen (PEDERSEN 1976, ADDIE and JARRETT 1992, KISS et al. 2000, CAVE et al. 2004). Es wurden allerdings auch Wildkatzen wie Geparden oder Löwen positiv auf Viruspartikel im Kot oder FCoV-Antikörper im Blut getestet (EVERMANN et al. 1988, KENNEDY et al. 2002, KENNEDY et al. 2003).

Mehrere Studien zeigten einen Zusammenhang von verschiedenen Rassen und einer erhöhten Prädisposition für die Infektion mit FCoV (HOLST et al. 2006, SHARIF et al. 2009, TAHARAGUCHI et al. 2012). So wurde bei einer japanischen Studie eine Antikörperprävalenz von 66,7% bei reinrassigen Katzen und 31,2% bei Hauskatzen festgestellt. Die Rassen American Curl, Maine Coon, Norwegische Waldkatze, Ragdoll und Scottish Fold wiesen dabei eine höhere Antikörperprävalenz auf als andere Rassen (TAHARAGUCHI et al. 2012). Neben dem Zustand, dass in Katzenschulen reinrassige Tiere gehalten werden, führt auch der Umstand von vielen Katzenwelpen auf engem Raum zu einer höheren Prädisposition einer FCoV-Infektion (KLEIN-RICHERS et al. 2020).

Auch bei dem FIPV korreliert eine höhere Anzahl an gehaltenen Katzen auf einem Raum mit einer höheren Prävalenz einer FIP-Infektion (KASS and DENT 1995). In Mehrkatzen-Haushalten bewegt sie sich zwischen 5-10% (ADDIE and JARRETT 1990, ADDIE et al. 1995).

#### 2.2.4 Prävention

Die beste Methode, um die Ausbreitung von FCoV zu unterbrechen, ist es, im Voraus die Ansteckung nicht infizierter Katzen mit dem Virus zu verhindern. Dies ist für Tierheime und -pensionen durch die weite Verbreitung von FCoV nahezu unmöglich und wäre nur mit einer strengen Kontrolle und gegebenenfalls folgender Quarantäne realisierbar. Einzelne Regionen/ Länder, wo die äußeren Gegebenheiten (Abgrenzung über Seewege) die strengen Einfuhrkontrollen von empfänglichen Tieren möglich machen, hatten Erfolg mit der Etablierung/Erhaltung von FCoV-freien Katzenbeständen. Dieser beruhte dabei auf Antikörperkontrollen und Quarantäne vor der Einreise in die entsprechenden Gebiete (ADDIE et al. 2012).

#### 2.2.5 Behandlung

Die weite Verbreitung und die milden Krankheitszeichen von FECV führen meist dazu, dass – wenn überhaupt - nur eine symptomatische Behandlung erfolgt (GIL et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit die Virusausbreitung aufzuhalten ist die Virusausscheidung über den Kot zu verhindern. Addie et al. (2020) untersuchten dabei die Wirksamkeit von antiviraler Therapie mit einem Nukleosid-Analogon, um Viruspartikel aus dem Darm zu eliminieren. Neunundzwanzig chronisch mit FCoV infizierte Katzen wurden von ihren Besitzern mit Mutian-Xraohconn behandelt und die Virusausscheidung im Kot mittels RT-qPCR überprüft. Die orale Gabe von 4mg/kg Mutian-Xraphconn q24h über 4 Tage wurde von den Autoren als optimales Behandlungsprotokoll beschrieben, um zu einer erfolgreichen Eindämmung der Virusausscheidung zu führen. Der Nachteil hierbei ist, dass das Medikament noch nicht überall zugelassen ist und auch die Gefahr von Resistenzen bei unsachgemäßem Gebrauch sollte beachtet werden (ADDIE et al. 2020b).

Nachdem die Prognose von FIP jahrzehntelang meist infaust war, gab es auch diesbezüglich in den letzten Jahren vielversprechende Studien mit dem Nukleosid-Analogon (MURPHY et al. 2018, PEDERSEN et al. 2019, ADDIE et al. 2020a, DICKINSON et al. 2020). Die Therapie ist allerdings langwierig (50 bis 84 Tage) und das Medikament ist bis jetzt nur in wenigen Ländern zugelassen (PEDERSEN et al. 2019, ADDIE et al. 2020a, DICKINSON et al. 2020).

## 2.2.6 Impfung

Eine weitere wichtige Methode, um die Ausbreitung von Infektionskrankheiten zu verhindern, ist eine Immunisierung durch eine Impfung gegen den Erreger. In den USA und einigen europäischen Ländern ist bereits ein intranasaler Impfstoff erhältlich. Er enthält ein temperaturempfindliches Derivat des DF2-Stammes vom Serotyp II (CHRISTIANSON et al. 1989). Durch seine Stabilität bei 31 °C (Durchschnittstemperatur im Respirationstrakt) jedoch nicht bei 39 °C (Durchschnittskörpertemperatur Katze) wird die Induktion von IgA und zellvermittelter Immunität gefördert und vor allem eine lokale Immunantwort der Schleimhäute ausgelöst. Es konnten allerdings mit niedrigem Titer auch systemische Antikörper im Blut nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von experimentellen Studien sind widersprüchlich und bewegen sich zwischen einer Effektivität von 0 bis 75%. Ein weiterer Nachteil ist, dass der Impfstoff nur bei seronegativen Katzen eingesetzt werden sollte, aber gleichzeitig erst für Katzenwelpen ab 16 Wochen zugelassen ist. Dies stellt insofern ein Problem dar, dass Katzenwelpen mit ca. fünf bis sieben Wochen den maternalen Antikörperschutz verlieren und in den darauffolgenden Wochen ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht (CHRISTIANSON et al. 1989, GERBER et al. 1990, SCOTT et al. 1992, GERBER 1995, MCARDLE et al. 1995). Zudem zeigte sich zwar eine signifikante Verringerung der Virusmenge von FECV im Darm von geimpften Tieren nach einer experimentellen Infektion im Vergleich zu Ungeimpften, aber es kam zu keiner kompletten Elimination. Daher ist nicht ausgeschlossen, dass auch geimpfte Tiere als Überträger fungieren können (HOSKINS et al. 1995).

Da die Wirksamkeit des Impfstoffs in keiner unabhängigen Studie gezeigt worden ist, wird die Impfung nicht empfohlen (FLI 2021).

Eine weitere Studie mit einem ebenfalls oro-nasal verabreichten modifizierten FIP Lebendimpfstoff zeigte vielversprechende Ergebnisse bei experimentell mit Serotyp II infizierten Katzen. Allerdings sind weitere Versuche notwendig, um die Sicherheit und den Nutzen (auch gegen Serotyp I) dieses Impfstoffs im Feld zu bestätigen (HAIJEMA et al. 2004).

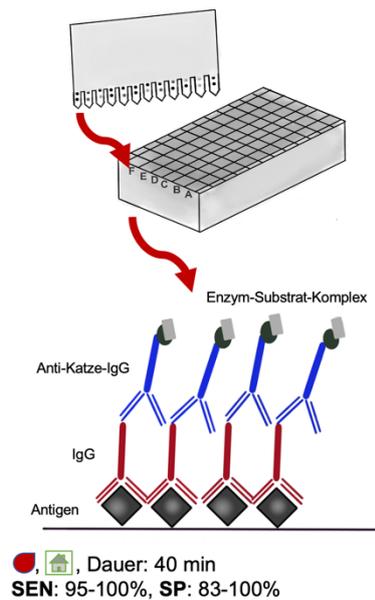
## 2.3 Diagnostik

### 2.3.1 Indirekter Erregernachweis

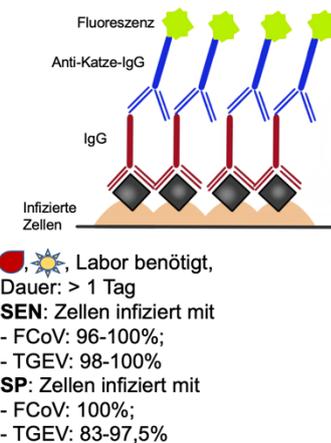
#### 2.3.1.1 *Antikörper Nachweis*

Für den Nachweis von Antikörpern gegen FCoV im Blut sind verschiedene Tests verfügbar, bei denen es sich meist um Enzymimmunoassays (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA), indirekte Immunofluoreszenzassays (IFAs) oder Immunmigrations-Schnelltests (Rapid Immunochromatographie, RIM) handelt (ADDIE et al. 2015) (Abbildung 4). Generell lässt sich sagen, dass mit höherem Antikörper-Titer im Blut auch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass FCoV mit dem Kot ausgeschieden wird. Nach einer überstandenen Infektion, fällt der Titer meist innerhalb von 5 Monaten ab. Es gibt allerdings auch Katzen, die, obwohl keine Viruspartikel mehr im Kot nachweisbar waren, noch über 25 Monate seropositiv blieben. Daher ist der diagnostische Wert, nur anhand von Antikörper-Tests zu differenzieren ob eine Katze noch Virus ausscheidet, umstritten (ADDIE and JARRETT 2001). Ein weiteres Problem stellt der Umstand dar, dass sich bei einer FIP-Infektion Antigen-Antikörper-Komplexe bilden und dadurch der Titer fälschlich niedrig angezeigt wird, obwohl eine akute Infektion besteht. Dies kann zu falsch niedrigen oder negativen FCoV-Antikörpertests in virusreichen Proben führen (MELI et al. 2013). Dadurch ist der Test nur bedingt für die Überwachung der Virusausscheidung geeignet.

### A. Immunocomb: mod. ELISA:



### B. Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT):



### C. Rapid Immunochromatographie (RIM):

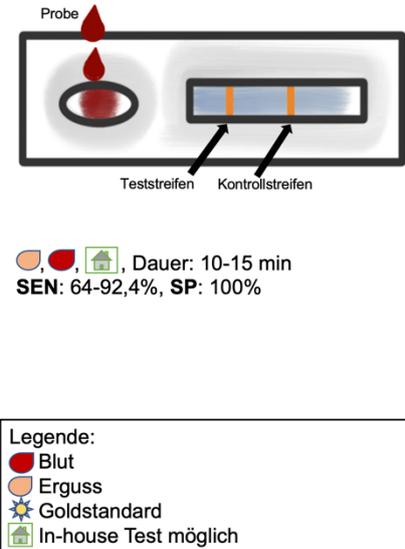


Abbildung 4. Abbildung von verfügbaren Antikörper-Tests für FCoV inklusive des verwendeten Probenmaterials, der benötigten Zeit sowie der Sensitivität (SEN) und Spezifität (SP). Abbildung A zeigt den Immunocomb, einen modifizierten ELISA. Die Zacken des Kammes werden nacheinander in die einzelnen Kompartimente A bis F getaucht. In Kompartiment A befindet sich die zu untersuchende Blutprobe. Sind Immunglobuline G (IgG) gegen das FCoV vorhanden, binden diese an Antigene, die an den Zacken des Kammes immobilisiert sind. Die optische Darstellung erfolgt durch Enzym-markiertes Anti-Katze-IgG, welches an das IgG in der Probe bindet und als graue Färbung auf dem Immunocomb sichtbar wird. Abbildung B zeigt einen Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT). Zellen, die mit FCoV oder TGEV infiziert sind, werden hier mit der Blutprobe inkubiert. Sind IgG in der Probe vorhanden, binden diese an das von den Zellen präsentierte Antigen. Mittels Fluoreszenz markierte Anti-Katze-IgG binden an das IgG der Probe. Der Nachweis der Fluoreszenz zeigt ein positives Ergebnis an. Abbildung C zeigt die Rapid Immunochromatography (RIM). Die Probe wird hier auf ein Testfeld gegeben und verteilt sich mittels Kapillarkraft in Richtung Kontrollstreifen. Auf der Höhe des Teststreifens befinden sich immobilisierte FCoV-Antigene. Sind Antikörper gegen FCoV in der Probe enthalten, binden diese an die Antigene. Farbige Anti-Katze-IgG laufen gleichzeitig mit der Probe mit und binden sich sowohl an evtl. vorhandene IgG der Probe als auch an immobilisierte Antikörper, die sich auf der Höhe des Kontrollstreifens befinden. Zwei Banden zeigen ein positives

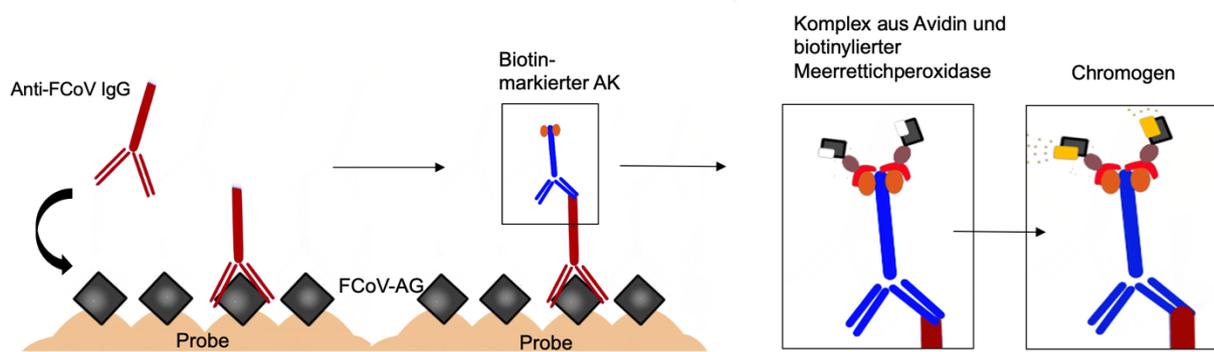
Testergebnis an. Abbildung erstellt mit Informationen nach (BVT-VIRBAC , ADDIE et al. 2015, BIOGAL GALED LABORATORIES ACS LTD 2018).

### 2.3.2 Direkter Erregernachweis

#### 2.3.2.1 *Immunhistochemie, Immunzytochemie und Immunfluoreszenz*

Zum Nachweis einer FIP-Erkrankung gilt eine histopathologische Untersuchung von Läsionen in betroffenen Geweben mit FCoV-Antigen-Immunfärbung als Goldstandard. Dabei wird die Bindung von FCoV-Antigen-assoziierten Antikörpern ausgenutzt, die durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht werden (Abbildung 5A) (DRECHSLER et al. 2011, GIORI et al. 2011). Die Entnahme der Proben aus den entsprechenden Organen macht jedoch einen invasiven Eingriff wie eine Laparotomie oder Laparoskopie erforderlich. Auch der Nachweis von FCoV-Antigenen in zytologischen Proben von Ergüssen, Feinnadelaspirationen (FNAs), Liquor und Kammerwasser ist mittels Immunzytochemie oder Immunfluoreszenz möglich (Abbildung 5A+B). Hier variieren die Sensitivität und Spezifität für den Nachweis einer FIP-Erkrankung erheblich (PARODI et al. 1993, HIRSCHBERGER et al. 1995, FELTEN et al. 2017, GRUENDL et al. 2017, SANGL et al. 2020).

**A. Immunzytochemie/ Immunhistochemie:**  , Dauer: > 1Tag



**B. Immunfluoreszenz:**  , Dauer: > 1Tag

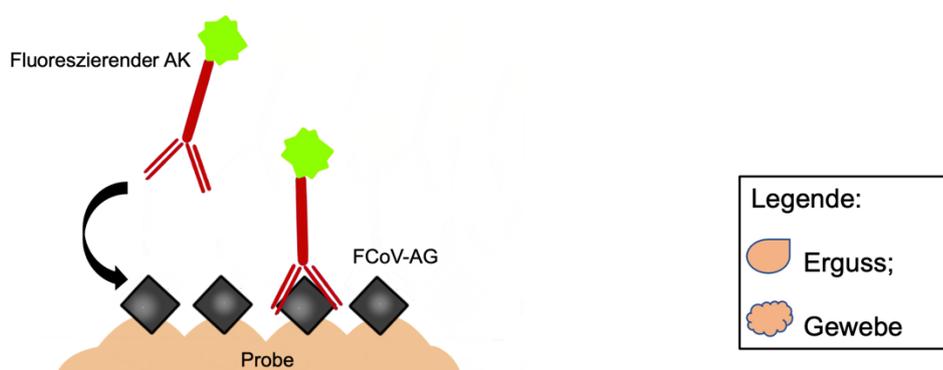


Abbildung 5. Abbildung des direkten Erregernachweises mittels A Immunzytochemie/Immunhistochemie und B Immunfluoreszenz. Als Probe wird entweder verändertes Gewebe oder Erguss aus der Bauch-/Brusthöhle verwendet. In Abbildung A bindet ein primäres Anti-Felines Coronavirus Immunglobulin G (Anti-FCoV IgG) an das FCoV-Antigen (FCoV-AG) in der Probe. In einem nächsten Schritt bindet dann ein Biotin-markierter Antikörper (AK) an das IgG. Mit Zugabe eines Komplexes aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase sowie eines Chromogens (3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) entsteht eine Farbreaktion, die mittels Mikroskop erkannt werden kann. In Abbildung B bindet ein Fluoreszinkin-markierter AK an das FCoV-AG in der Probe. Das Ergebnis wird mittels Fluoreszenzmikroskop abgelesen. Abbildung erstellt mit Informationen nach (FELTEN et al. 2017) und (PARODI et al. 1993).

### 2.3.2.2 Immunchromatographie

Für den Schnelldiagnose von FCoV im Kot sind verschiedene Tests auf dem Markt verfügbar (FASSISI VETERINÄRDIAGNOSTIK UND UMWELTANALYSEN GMBH , TAMAVET-NAL VON MINDEN GMBH 2022). Diese beruhen auf Antigen-

Antikörperreaktionen und den Nachweis mittels Lateral-Flow. Dabei sind FCoV-Antikörper auf eine Matrix gebunden. Befindet sich in der Probe FCoV-Antigen, wird dieses von dem Antikörper auf der Matrix gebunden und durch einen zweiten farbstoffmarkierten Antikörper markiert. Der Farbumschlag wird in Form einer Bande sichtbar (Abbildung 6). Die Sensitivität bewegt sich verglichen mit der PCR um 95%. Allerdings ist dies lediglich die Angabe der Firma und es sind keine entsprechenden Studien dazu angegeben. Auch die Viruslast ist in den entsprechenden Proben nicht genannt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Sensitivität bei Proben mit wenigen Viruspartikeln erheblich geringer ausfällt.

### Immunchromatographie (Lateral-Flow-Test):

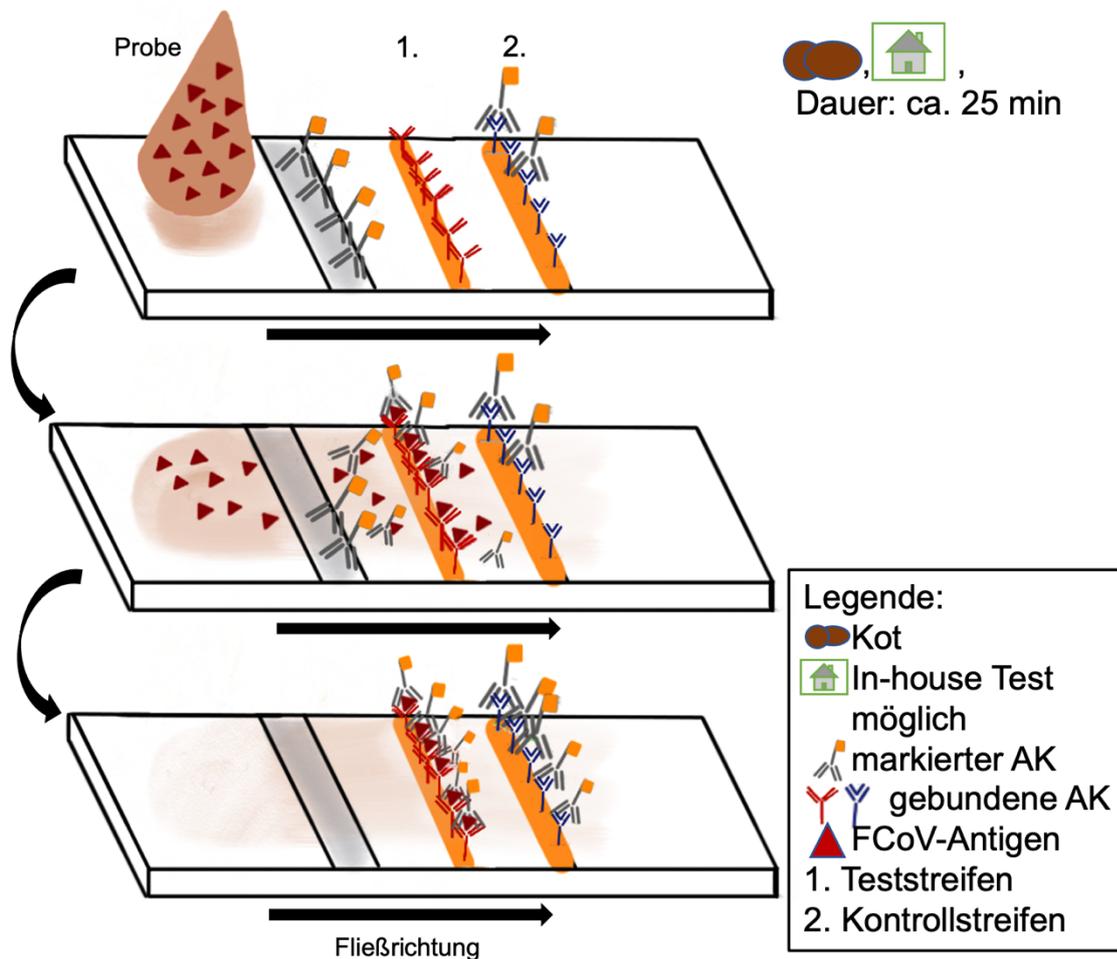


Abbildung 6. Abbildung des Verfahrens der Immunchromatographie inklusive des Probenmaterials und der Dauer des Testes. Die Probe wird auf ein Testfeld gegeben und anschließend mittels Kapillarkraft auf der Testkassette verteilt. Befindet sich Felines Coronavirus (FCoV) in der Probe, bindet dieses an die gebundenen Antikörper (AK) im Bereich des Teststreifens. Zusammen mit der Probe wird ein markierter AK

über die Kassette verteilt. Dieser bindet einerseits an das am Teststreifen gebundene FCoV und andererseits an gebundene AK im Bereich des Kontrollstreifens. Die so entstehende Doppelbande zeigt ein positives Testergebnis an. Abbildung erstellt mit Informationen nach (TAMAVET-NAL VON MINDEN GMBH 2022) und (FASSISI VETERINÄRDIAGNOSTIK UND UMWELTANALYSEN GMBH).

### 2.3.2.3 Molekulardiagnostik

Für den direkten Nachweis der RNA des FCoV sind unterschiedliche Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Tests entwickelt worden. Die verwendeten Matrizen umfassen dabei extrahierte Proben aus Blut, Körperhöhlenergüssen, Gewebe, Liquor, Augenkammerwasser und Kot. Je nach Verwendungszweck wurden entweder Abschnitte des Genoms die hoch-konserviert sind als Zielregion verwendet, oder solche, die je nach Pathogenität spezifische Mutationen beinhalten, anhand derer man vermutet zwischen FECV und FIPV unterscheiden zu können (CHANG et al. 2012). Zudem unterscheidet man zwischen Verfahren, die subgenomische mRNA (messengerRNA) detektieren, welche als Nachweis der Replikation des Virus in der Wirtszelle verwendet werden kann, und solchen, die genomische RNA nachweisen, was für ein generelles Vorhandensein von Viruspartikeln in der jeweiligen Probe spricht.

Eine Übersicht über bisher entwickelte PCR Tests ist in Tabelle 1 dargelegt.

**Tabelle 1.** Studien über verschiedene RT-PCR-Protokolle mit jeweiligem Ziel-Gen zum Nachweis von FCoV in unterschiedlichem Probenmaterial. RT-PCR, Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion; nRT-PCR, nested Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion; S-Gen, Spike-Gen; UTR, Nicht translatierte Region; RdRP-Gen, RNA-abhängige-RNA-Polymerase-Gen; mRNA, Boten-Ribonukleinsäure; M-Gen, Membran-Gen; FIP, Feline Infektiöse Peritonitis; N-Gen, Nukleotid-Gen; ORF, Offener Leserahmen; E-Gen, Envelope-Gen.

<i>Art der PCR</i>	<i>Ziel-Gen</i>	<i>Probenmaterial</i>	<i>Studie</i>
	S-Gen	Leber, Niere, Milz	(LI and SCOTT 1994)
	7b-Gen	Kot, Urin, Liquor, Gewebe aus Gehirn und	(FOLEY et al. 1998)

		Granulomen von versch. Organen, Aszites-Erguss	
<i>RT-PCR</i>	S-Gen	EDTA-Blutproben	(GUNN-MOORE et al. 1998)
	S-Gen zur Differenzierung von Serotyp I und II	Kot, Rektaltupfer,	(ADDIE et al. 2003)
	mRNA des M- Gens (nur FIP)	EDTA-Blutproben	(SIMONS et al. 2005)
	RdRP-Gen (pancoronavirus)	Zellkulturvirus	(HU et al. 2018)
<i>RT-nPCR</i>	3'-UTR 7b	Kot, Omentum, Niere, Leber, Milz, Plasma, Serum	(HERREWEGH et al. 1995)
	3'-UTR 7b	Serum	(FEHR et al. 1996)
	E-Gen (nur FIP)	Thorax- und Abdominal Erguss	(GAMBLE et al. 1997)
	7a/7b-Gen	Kot, Gewebe, Körperflüssigkeiten	(KENNEDY et al. 1998)
	S-Gen	Kot, Gewebe, Aszites- Erguss,	(CHANG et al. 2012)
<i>One-tube RT-PCR</i>	3'-UTR 7b	Kot, Zellkulturvirus, Aszites-Erguss	(GUT et al. 1999)
<i>real-time RT-PCR</i>	M-Gen	Kot	(DYE et al. 2008)
	mRNA N-Gen	Kot, Gewebe, Thorax-und Abdominal Erguss	(HORNYAK et al. 2012)
	7b-Gen; S-Gen für Differenzierung zu FIPV	Gewebe	(SANGL et al. 2019)
	Mutationen im S- Gen zur Differenzierung zwischen FECV und FIPV	Augenkammerwasser	(SANGL et al. 2020)
<i>Eva-green based real-time PCR</i>	N-Gen	Blut	(GUAN et al. 2020)

<i>SYBR Green real-time RT-PCR</i>	ORF 1b (RdRP-Gen) (pancoronavirus)	Kot, Nasentupfer, mesenterische Lymphknoten	(ESCUTENAIRE et al. 2007)
------------------------------------	---------------------------------------	---	---------------------------

Allen PCR Verfahren ist gemein, dass ihr Prinzip auf Temperaturzyklen beruht. Dies führt dazu, dass die Verwendung eines Thermocyclers das Verfahren an ein Labor bindet und die langen Amplifikationszeiten es als Schnelltest ungeeignet machen. Da es sich bei dem FCoV um ein RNA-Virus handelt, muss den Amplifikationszyklen der PCR (Abbildung 7) noch eine Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) vorgeschaltet werden.

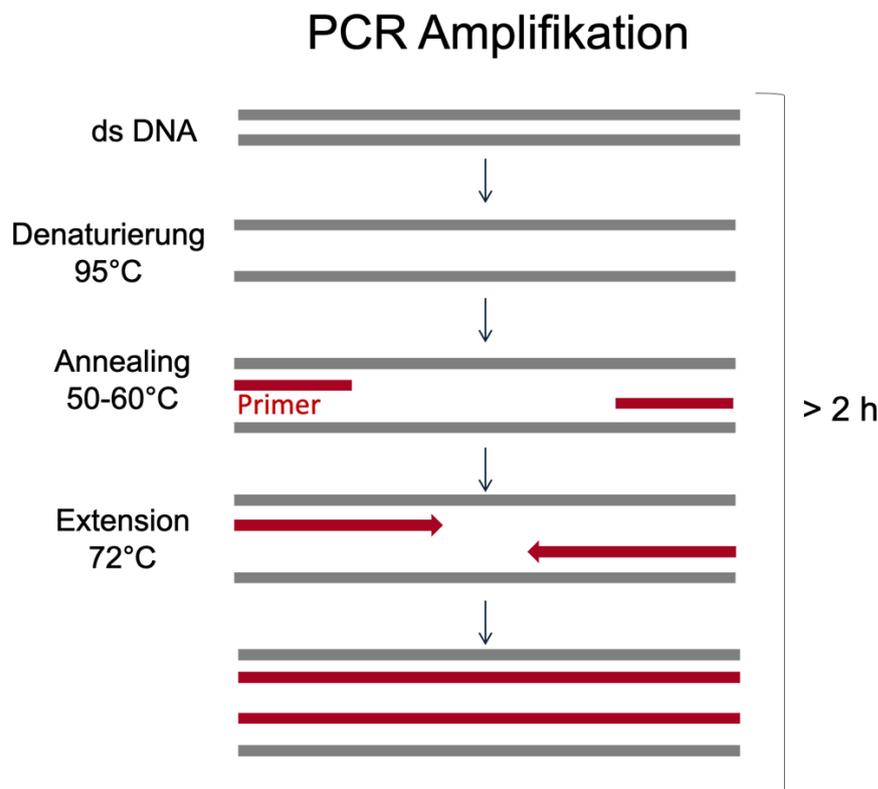


Abbildung 7. Abbildung eines Amplifikationszyklus mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit Angabe der unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (ds DNA) in Einzelstränge gespalten. Dann folgt während des Annealing-Schrittes die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge. Als letztes wird in der Extension von den Primern ausgehend ein Strang komplementär zu dem Matrizenstrang gebildet. Durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C beginnt der Zyklus von neuem. Abbildung erstellt mit Informationen nach (BARTLETT and STIRLING 2003).

Um einzelne Katzen vor der Infektion mit FCoV zu schützen, ist eine konsequente Testung zur Identifizierung von Virusausscheidern essentiell. Dafür sind Diagnostikverfahren mit minimalem Aufwand, Equipment und Kosten erforderlich, die auch in kleineren Tierarztpraxen oder sogar vor Ort angewendet werden können. Eine zur PCR vergleichbare Sensitivität ist dabei unverzichtbar.

Die Entwicklung von isothermalen Verfahren zur Nukleinsäuren-Amplifikation, die bei einer konstanten Temperatur ablaufen, reduziert die Anforderungen an die Geräteausstattung und eröffnet dadurch die Möglichkeit den exakten Nachweis von Erregern auch außerhalb eines Labors zu erbringen. Außerdem können bei konstanter Temperatur unterschiedliche Schritte der Amplifikation simultan ablaufen anstatt an die Heiz- und Kühle Schritte gebunden zu sein. Der Wegfall der Heiz- und Kühle Schritte führt dadurch zusätzlich zu einer Verkürzung der Amplifikationszeiten (LI et al. 2018). Die isothermalen Verfahren, die bisher für FCoV in verschiedenen Studien untersucht wurden sind die loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (TECHANGAMSUWAN et al. 2013, STRANIERI et al. 2017, GÜNTHER et al. 2018) und die Recombinase Polymerase Amplifikation (RPA) (HU et al. 2018). LAMP basiert auf der Verwendung einer DNA-Polymerase mit „strand displacement activity“, welche es ermöglicht die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen ohne Temperaturerhöhung zu spalten und so die Amplifikation bei einer konstanten Temperatur (60-65 °C) und den Nachweis von Nukleinsäuren innerhalb von 30-60 Minuten möglich macht (NOTOMI et al. 2000).

Als molekulare Nachweismethode für DNA/RNA hat die RPA in den letzten Jahren einen starken Aufschwung verzeichnet. Die hohe Sensitivität zusammen mit leichtem Equipment und wenigen Pipettierschritten macht die RPA zu einem perfekten Verfahren außerhalb des Labors. Durch den Zusatz verschiedener Enzyme werden die Temperaturzyklen, welche bei der PCR benötigt werden, verzichtbar und die Reaktionsschritte können simultan ablaufen. Die Reaktion beginnt mit der Bindung der Rekombinase mit Hilfe eines „Loading“-Faktors an die Primer. Dieser Komplex sucht anschließend nach der homologen Sequenz innerhalb der doppelsträngigen DNA, an der die Primer binden können. Wenn diese Stelle lokalisiert wurde, dringt der Komplex zwischen die DNA Stränge und es entsteht eine sogenannte D-Loop-Struktur. Die Öffnung wird stabilisiert durch die Bindung von Einzelstrang-Bindungs-Proteinen an dem komplementären Strang. Mithilfe der Polymerase wird komplementär zur DNA-Vorlage das Amplikon von dem Primer aus verlängert. Der Einsatz von Vorwärts- und

Rückwärtsprimern erlaubt die Synthese sowohl in 3`- als auch in 5`-Richtung und führt so zu einer exponentiellen Amplifikation (Abbildung 8). Bei der Verwendung von RNA muss der RPA ebenfalls noch der Schritt der reversen Transkription in cDNA vorangehen. Ein Durchlauf der RPA dauert bis zu 15 min und der Gebrauch von fluoreszierenden Sonden ermöglicht eine Detektion in Echtzeit (LI et al. 2018).

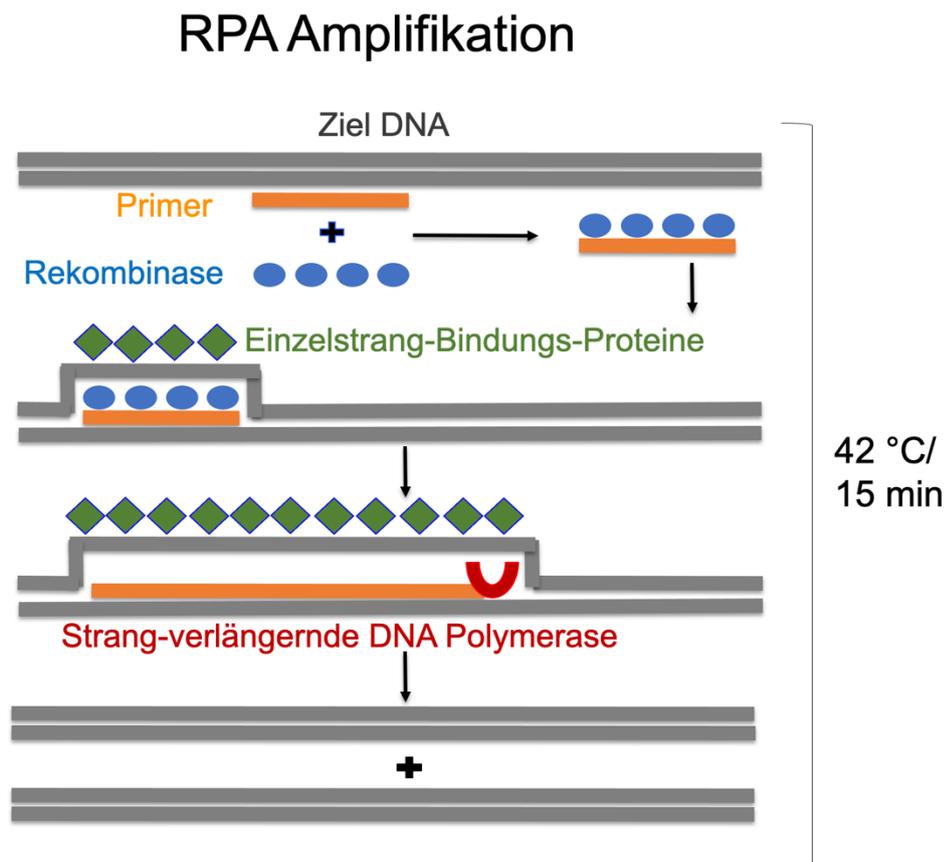


Abbildung 8. Ablauf eines Amplifikations-Zyklus mittels Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) Die Rekombinase bindet an die Primer und anschließend an die komplementäre Sequenz innerhalb des Doppelstranges. Der Einfachheit halber ist in dieser Abbildung nur der Vorwärtsprimer abgebildet. Simultan läuft die ganze Reaktion auch am komplementären Strang mit Hilfe der Rückwärtsprimer ab. Die Trennung des Doppelstranges wird durch Einzelstrang-Bindungs-Proteine stabilisiert und mit Hilfe der Polymerase wird ein komplementärer Strang zur Ziel-DNA gebildet. Abbildung erstellt mit Informationen nach (LI et al. 2018).

Der Einsatz von fluoreszierenden Sonden ist die gebräuchlichste Methode, um die RPA-Reaktion sichtbar zu machen. Auf diesen Sonden befinden sich sowohl ein Fluorophor als auch ein Quencher, welcher das Licht des Fluorophors absorbiert. Während der Vervielfältigung der DNA wird das Fluorophor von dem Quencher getrennt und die Fluoreszenz kann mittels Lichtquelle in Echtzeit sichtbar gemacht werden. Neben dieser Erkennung mittels fluoreszierender Sonden gibt es noch verschiedene andere Ansätze zur Auswertung der RPA-Reaktion (LI et al. 2018).

Eine Möglichkeit ist es, das RPA-Verfahren mit Lateral Flow Strips zu kombinieren. Basierend auf dem Sandwich-Verfahren werden dabei eine markierte Sonde und entweder Gold - oder Carbon-Nanopartikel als Tracer genutzt. Auch eine Kombination mit Gel-Elektrophorese ist möglich (POWELL et al. 2018).

Ein weiteres Nachweisverfahren ist die sogenannte „Flocculation assay detection“. Dabei werden die RPA-Amplikons mit magnetischen Kugeln bei niedrigen pH-Pufferbedingungen inkubiert. Dies führt dazu, dass die ausgefällten RPA-Amplikons auf den Magnetkugel-Oberflächen mehrere andere RPA-Magnetkugel-Konjugate vernetzen und somit aus der Lösung ausflocken. Durch den scharfen Übergang zwischen Lösungsphase und Ausflockung wird das Ergebnis sichtbar. Bei RPA-Reaktionen ohne oder mit nicht zielgerichteten Templates findet keine Ausflockung statt, da keine langen DNA-Polymersegmente entstehen (WEE et al. 2015). Die Vorteile dieser Methode sind, dass das Ergebnis mit den Augen abgelesen werden kann und kein weiterer Schritt zur Visualisierung der Ergebnisse erforderlich ist.

Eine andere Alternative ist die Kombination von RPA und elektrochemischen Nachweis. Hier liegen die Primer zum einen gebunden an einer festen Oberfläche und zum anderen frei zusammen mit der Vorlagen-DNA in der RPA-Lösung vor. Nach der RPA-Reaktion werden Streptavidin-konjugierte Merrettichperoxidase und elektrochemisch aktives 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt. Das entstehende elektrochemische Signal wird dann mittels Carbon-Elektrode sichtbar gemacht (LI et al. 2018). Diese Methode zeichnet sich vor allem durch geringe Kosten und einfache Materialien aus (KOO et al. 2016).

Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis von RPA-Reaktionen über Chemilumineszenz. Chemische Energie wird dabei durch eine Oxidations- oder Hydrolysereaktion in die Emission von sichtbarem Licht umgewandelt und mittels Kamera detektiert (FARRELL JR 2009).

Bei der Silikon Mikroring Resonator (SMR) - basierenden photonischen Detektion wird einer der Primer auf dem SMR immobilisiert, während der andere sich zusammen mit der DNA-Vorlage und den RPA-Reagenzien frei in der Lösung befindet. Bindet amplifizierte DNA an den immobilisierten Primer, resultiert das in einer Verschiebung der Wellenlänge und kann photonisch erfasst werden (BOGAERTS et al. 2012, KOO et al. 2018). Auch bei dieser Methode ist eine Erfassung in Echtzeit möglich.

Als letzte Möglichkeit soll noch die RPA in Kombination mit einem spektroskopischen Nachweisverfahren, das Surface-enhanced Raman scattering (SERS), genannt werden. Hier werden die Amplikons mit sogenannten „Ramon-Reportern“ markiert und auf Metall-Nanopartikel absorbiert. Durch einen Laser können diese Nanopartikel angeregt werden und dies führt zu einer signifikanten Verstärkung der Raman-Signale. Dieses Verfahren eignet sich besonders gut für Multiplex-Verfahren, da mehrere Raman-Reporter eingesetzt werden können (SCHLÜCKER 2014, WANG et al. 2017). Neben dem SERS sind mehrere der oben genannten RPA-Methoden für Multiplex-Verfahren geeignet. Innerhalb eines Testlaufes können so mehrere Pathogene gleichzeitig detektiert werden. Dies ist insofern interessant, als man in einem Test den Nachweis von unterschiedlichen Krankheiten, die in den Katzenpopulationen kursieren, kombinieren kann.

## 3. Publikation

### 3.1 Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation

Hiermit erkläre ich, dass ich den Entwurf des Manuskripts eigenständig erstellt, sowie die Versuche und deren Interpretation eigenständig durchgeführt habe. Unterstützt wurde ich dabei von Prof. Dr. Uwe Truyen und Dr. Ahmed Abd El Wahed. Die Literaturrecherche wurde von mir durchgeführt, Tabellen und Abbildungen sowie die statistische Auswertung wurden von mir erstellt. Das Manuskript habe ich mit Unterstützung und in Absprache mit den Co-Autoren verfasst und eingereicht.

### 3.2 Publikation

#### **Molecular Detection of Feline Coronavirus Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay**

Rea Maja Kobialka<sup>1</sup>, Arianna Ceruti<sup>1</sup>, Michelle Bergmann<sup>2</sup>, Katrin Hartmann<sup>2</sup>, Uwe Truyen<sup>1</sup> and Ahmed Abd El Wahed<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany;

<sup>2</sup>Clinic of Small Animal Medicine, LMU, 80539 Munich, Germany;

Erhalten: 5 August 2021

Akzeptiert: 23 September 2021

Publiziert: 25 September 2021

Pathogens 2021,10, 1237. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101237>

Article

# Molecular Detection of Feline Coronavirus Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay

Rea Maja Kobialka <sup>1</sup>, Arianna Ceruti <sup>1</sup>, Michelle Bergmann <sup>2</sup>, Katrin Hartmann <sup>2</sup>, Uwe Truyen <sup>1</sup> and Ahmed Abd El Wahed <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany; rea\_maja.kobialka@uni-leipzig.de (R.M.K.); arianna.ceruti@uni-leipzig.de (A.C.); truyen@vetmed.uni-leipzig.de (U.T.)

<sup>2</sup> Clinic of Small Animal Medicine, LMU, 80539 Munich, Germany; N.Bergmann@medizinische-kleintierklinik.de (M.B.); hartmann@medizinische-kleintierklinik.de (K.H.)

\* Correspondence: ahmed.abd\_el\_wahed@uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-97-38-153

**Abstract:** Feline coronavirus (FCoV) is endemic in cat populations worldwide. Persistently, subclinically infected cats play a significant role in spreading the infection. Testing fecal samples of cats may facilitate efforts to decrease the viral burden within a population. Real-time RT-PCR is highly sensitive and specific for the detection of FCoV but must be performed in a fully equipped laboratory. A simple and accurate assay is needed to identify FCoV at the point-of-need. The aim of this study was to develop a rapid FCoV detection assay based on isothermal amplification technology, i.e., reverse transcription-recombinase polymerase amplification (RT-RPA). Primers were designed to target the highly conserved 3' untranslated region of the 7b gene. Running on a constant temperature of 42 °C, reverse transcription as well as DNA amplification and detection was achieved in a maximum of 15 min. A probit analysis revealed a detection limit of 58.5 RNA copies/reaction. For cross-detection, nucleic acids from 19 viruses were tested. Both RT-RPA and real-time RT-PCR showed cross-detection with canine coronavirus and transmissible gastroenteritis virus, but not with other pathogens. To evaluate clinical performance, RNA was extracted from 39 fecal samples from cats. All samples were tested simultaneously with real-time RT-PCR resulting in a RT-RPA sensitivity and specificity of 90.9% and 100%, respectively. RT-RPA can be considered a promising simple method for rapid detection of FCoV.

**Keywords:** recombinase polymerase amplification; diagnostic; feline coronavirus; FIP; feline infectious peritonitis; RT-RPA; point-of-need testing



**Citation:** Kobialka, R.M.; Ceruti, A.; Bergmann, M.; Hartmann, K.; Truyen, U.; Abd El Wahed, A. Molecular Detection of Feline Coronavirus Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Pathogens* **2021**, *10*, 1237. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101237>

Academic Editors: Eva Spada and Daniela Proverbio

Received: 5 August 2021

Accepted: 23 September 2021

Published: 25 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Feline coronavirus (FCoV) is an enveloped single-stranded positive-sense RNA virus, belonging to the genus *Alphacoronavirus*, family *Coronaviridae*, and order *Nidovirales* [1]. Based on pathogenicity and gene mutations, FCoV can be divided into two biotypes: the common avirulent feline enteric coronavirus (FECV) and the highly virulent feline infectious peritonitis virus (FIPV) [2,3]. The clinical signs of feline infectious peritonitis (FIP) were first described in cats in the US in 1963 [4]. Since then, FCoV has been reported worldwide and not a single cattery can be considered free from the virus [5]. FCoVs are subcategorized based on reactivities of neutralizing antibodies to two serotypes, I and II [6]. Serotype I is more prevalent than serotype II in most cat populations tested [7–10]. Natural transmission of FECV is predominantly via the fecal-oral route, with subsequent infection of epithelial cells, mostly enterocytes [1,11]. It is known that multi-cat environments show a higher prevalence of FCoV infections than single-cat environments and different factors are discussed to play an important role in the spread of the virus [12–14]. One suspected cause is the frequent use of shared litter trays in facilities with several cats. If one cat is infected, FCoV spreads very quickly within this population [15–17]. In addition, subclinical

shedders are a big problem, as they often remain undetected and represent a possible source of infection [16,18]. Furthermore, the age of the cats is important, as kittens under one year of age are known to shed FCoV in high amounts [5,14,17,19]. Generally, most FCoV-infected cats remain without clinical signs or only develop mild enteric signs. Sudden changes in the virus tropism to macrophages and monocytes instead of enterocytes due to mutations in the spike gene [20] lead or contribute to the development of the fatal systemic disease, FIP, in 5–12% of infected cats in multi-cat environments [21]. The clinical signs of FIP are mostly non-specific, including apathy, fever and weight loss, often followed by cavity effusions and/or neurological or ocular signs [15]. Cats with effusive FIP only have a median survival time of a few days [22]. New studies with antiviral therapy resulted in promising results, but the medication is only available for routine clinical use in few countries so far [23,24].

Several molecular assays based on RT-PCR, either conventional or real-time, were established for the detection of FCoV [25–28]. Target samples are usually thoracic or abdominal effusion, blood and/or feces. It is important to emphasize that the detection of FCoV in the latter is indicative of FECV infection and has little diagnostic value for the diagnosis of FIP infection [29]. RT-PCR is highly accurate in detecting FCoV in the feces of cats with and without clinical signs [16]. However, to maximize chances of detecting intermittent shedders, it is recommended to perform RT-PCR on at least three fecal samples collected at intervals between one week and one month [5]. One drawback of PCR assays is that they must be performed in centralized, highly equipped laboratories by trained technicians. A simple, easy to use rapid point-of-need test would be useful to identify and isolate subclinically infected FCoV shedders to decrease the disease burden. Promising molecular-based methods are isothermal amplification technologies, e.g., the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [30,31] or recombinase polymerase amplification (RPA) [32]. RPA has been used to detect the nucleic acid sequences from a wide variety of pathogens within a 15 min assay run-time [33–37]. The rapid results were achieved by using additional proteins to separate the DNA strands instead of thermal cycling as in the PCR. The simplicity of the RPA assay enables the use of a portable detector device [38].

In this study, the RT-RPA assay for rapid FCoV detection was developed based on the highly conserved 3'UTR of the 7b gene. The sensitivity and specificity to detect FCoV as well as cross-detection was determined. The assay's clinical performance was validated using fecal samples. All results were compared with real-time PCR as a reference method.

## 2. Results

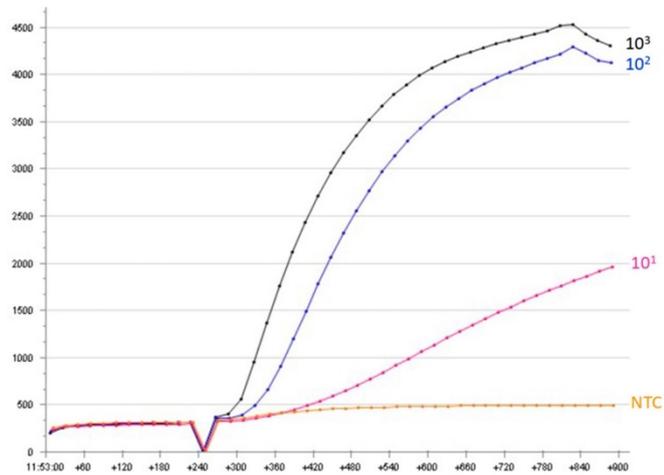
### 2.1. Selection of RPA Primers and Probe

To select the most efficient primer combination that could amplify few copies of FCoV RNA, nine combinations of RPA primers were screened using a concentration of  $10^5$  and  $10^2$  of the RNA molecular standard/ $\mu$ L (Figure S1). To identify any non-specific fluorescence signals, a negative control containing only molecular grade water as a template was used (Figure S2). The threshold time (TT) in seconds was calculated as the first rise of fluorescence intensity Millivolt (mV) above the baseline (the fluorescence intensity in the first minute) in the first derivative analysis. The best TT value of 180 and 300 s and a fluorescence signal of 4327 mV and 3481 mV for the  $10^5$  and  $10^2$  RNA/reaction, respectively, were achieved using Forward Primer 1 (FP1) and Reverse Primer 3 (RP3) (Figure S1). FP1 + RP3 primers were aligned to various FCoV and FIPV sequences to assure the coverage of circulating variants (Figure S7) and were used for further validation steps.

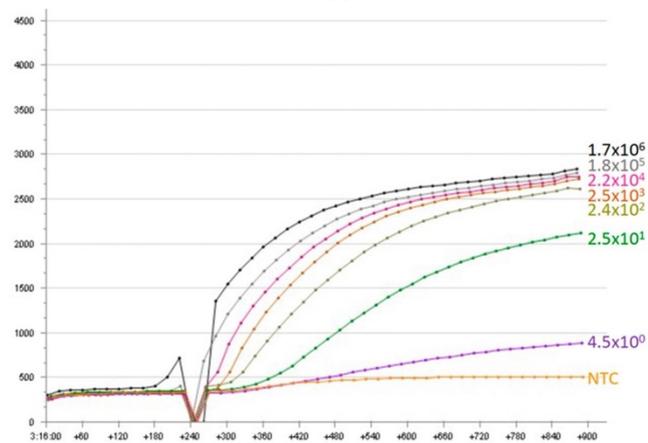
### 2.2. Analytical Sensitivity and Specificity

The RT-RPA assay's limit of detection was determined using various concentrations of an in vitro-transcribed RNA molecular standard ( $5 \times 10^3$  to  $10^0$  copies/reaction) (Figure 1a). Out of nine RT-RPA runs,  $5 \times 10^3$  and  $5 \times 10^2$  copies/reaction were detected 9/9 times;

50 copies/reaction, 6/9, while 5 copies/ $\mu\text{L}$  was not detected. A probit analysis based on these results revealed a limit of detection of 58.5 RNA copies/reaction (95% CI) (Figure 2).

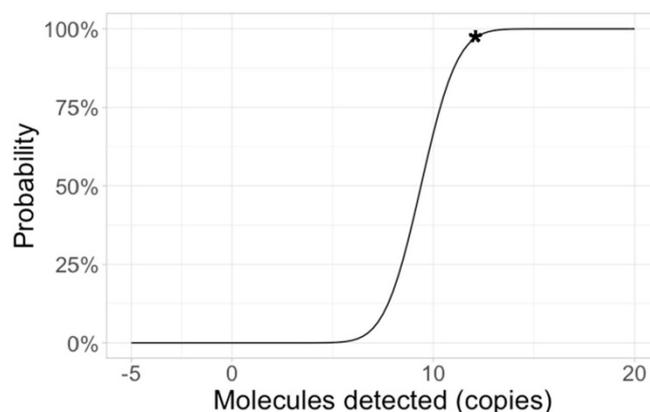


(a)



(b)

**Figure 1.** The amplification curves of RT-RPA run with Forward Primer 1 (FP1) and Reverse Primer 3 (RP3) using (a) serial dilution of molecular standard from  $10^3$  to  $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  and (b) serial dilution of extracted RNA of feline coronavirus supernatant from cell culture ( $1.7 \times 10^6$  to  $4.5 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ) together with negative template control (NTC). The drop in the fluorescence signal after three minutes was due to the mixing step, which is necessary to produce a homogeneous RPA reaction. For each run, 5  $\mu\text{L}$  was used, which lead to a limit of detection of  $22.5 \times 10^0$  copies/reaction of the viral RNA.



**Figure 2.** A probit analysis based on the results of nine RT-RPA runs with molecular standard  $5 \times 10^3$  to  $10^0$  RNA copies/reaction. The limit of detection is displayed per microliter (11.7 RNA molecules), which is 58.5 copies/reaction (depicted as asterisk).

Serial dilutions of FCoV RNA extracted from tissue culture supernatant were tested in quantitative RT-PCR. A range of  $8.5 \times 10^6$  to  $22.5 \times 10^0$  copies/reaction of RNA was revealed. The FCoV RT-RPA assay amplified down to  $22.5 \times 10^0$  copies/reaction of the genomic RNA (Figure 1b), which indicates similar analytical sensitivity to the real-time RT-PCR. Additionally, the same serial dilution of the viral RNA was spiked with nucleic acid extracted from a fecal sample that was tested negative using real-time PCR. As in Figure S3, this analytical sensitivity was 50 viral RNA copies/reaction in the presence of host background nucleic acids.

Results achieved with the RT-RAA kit which was used to compare the performance of our oligo mixes and the molecular standard with kits from different producers were the same as with the RPA kit from TwistDx (Figure S4).

Both the RT-RPA assay and real-time RT-PCR showed no cross-detection to the RNA/DNA of 16 different viruses but amplified two coronaviruses in addition to the FIPV (canine coronavirus strain 1–71 Riemser Virusbank (RVB), transmissible gastroenteritis virus strain 70 RVB) (Table 1, Figure S5a–d).

### 2.3. Clinical Samples

The clinical performance of the RT-RPA assay was examined using 39 fecal samples (Table S1). The RT-RPA results were compared with those of the real-time RT-PCR. In total, 22 samples tested positive by real-time RT-PCR, while 20 were tested positive in RT-RPA. Both assays had the same clinical specificity (number of negative samples = 17) (Table 2).

### 2.4. Sequencing

The 3'UTR end of three samples, including one false negative and two positive identified samples, were sequenced. The obtained sequences were compared using Geneious Prime to evaluate whether changes in the nucleotides of one sample were the cause of false negative results in the RT-RPA. The alignment of the sequences showed no differences between the three samples in the primer and probe region.

**Table 1.** List of viruses used for determining the cross-detection of the RT-RPA assay. The results are shown in the cycle threshold (Ct) of real-time RT-PCR and time threshold (TT, s.) of RT-RPA. RVB is Riemser Virusbank.

Viruses	Real-Time RT-PCR (Ct)	RT-RPA (TT)
Feline infectious peritonitis virus ****	13.42	120
Canine coronavirus strain 1-71 RVB +	15.97	160
Transmissible gastroenteritis virus strain 70 RVB +	18.38	180
Transmissible gastroenteritis virus strain 545 RVB +	No Ct	Neg
Feline calicivirus ****	No Ct	Neg
Feline herpesvirus ****	No Ct	Neg
Feline parvovirus ****	No Ct	Neg
Canine parvovirus ****	No Ct	Neg
Canine herpesvirus ****	No Ct	Neg
Canine minute virus ****	No Ct	Neg
Canine adenovirus ****	No Ct	Neg
Canine distemper virus ****	No Ct	Neg
Bovine coronavirus V321.2 +	No Ct	Neg
Severe acute respiratory syndrome coronavirus ***	No Ct	Neg
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 ***	No Ct	Neg
Human coronavirus 229E **	No Ct	Neg
Human coronavirus NL63 **	No Ct	Neg
Human coronavirus OC43 **	No Ct	Neg
Middle East respiratory syndrome coronavirus **	No Ct	Neg

+ = provided by Friedrich Loeffler Institute (Greifswald, Germany). \*\* = provided by Robert Koch Institute (Berlin, Germany).  
 \*\*\* = provided by Charité (Berlin, Germany). \*\*\*\* = Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health (Leipzig, Germany).

**Table 2.** Clinical sensitivity and specificity of RT-RPA and real-time RT-PCR. n = number of tested samples.

	RT-RPA	Real-Time RT-PCR
Sensitivity (n = 22)	90.9%	100%
Specificity (n = 17)	100%	100%

### 3. Discussion

FCoV infection poses a high threat to cats, especially kittens, due to the possible development of FIP. To prevent further spread of the infection, the development of a fast and sensitive surveillance system for FCoV shedding is a necessity. In this study, an isothermal RT-RPA assay for rapid detection of FCoV within 15 min was developed and its diagnostic utility was compared to real-time RT-PCR. A limit of detection of 58.5 copies/reaction and a clinical sensitivity and specificity of 90.9 and 100%, respectively, were achieved. Of all viruses, RNA viruses in particular have a high tendency to mutate [39]. To detect all different strains of FCoV, the target sequence used for a diagnostic assay should be conserved. Therefore, the untranslated region of the accessory 7b gene (function unknown [40]) at the 3'-end of the viral genome was selected as a target for the FCoV RT-RPA, since it is described as highly conserved among FCoVs [28]. Moreover, its good clinical performance was already proven in many studies [16,41,42].

As no strict rules for RPA primer design are prescribed, several primer combinations were tested in the present study. Many recommendations can be followed from the kit's producer [43] and/or published data [33,44]. Generally, the size of the primers should be between 30 and 36 bases, and multiple Gs in the first five bases of the 5'-end must be avoided. Furthermore, the recommended GC content is between 20–70%. The complexity of primer design is high in the presence of secondary structure in the target sequence. Moreover, the binding of primers can change the folding of the target region and prevent other oligonucleotides from accomplishing the amplification step [33]. Since coronaviruses have a positive-sense RNA genome [1], a reverse transcriptase step is necessary. Therefore, the reverse primer (RP) is needed for both the RT and the amplification steps. As a consequence, a higher concentration of reverse primers would increase the assay's overall

performance [44]. In the present study, different concentrations of the reverse primer were tested (data not shown) and the highest sensitivity was achieved using a double concentration of the RP. The same phenomenon was observed during the design of the SARS-CoV-2 RT-RPA assays [44].

The cross-detection to other pathogens was determined by using 19 different viruses, which either belonged to the family *Coronaviridae* or were common pathogens in cat and dog populations. Both the new assay and the real-time RT-PCR-amplified strains of FCoV, as well as one strain of canine coronavirus (CCoV) and one strain of transmissible gastroenteritis virus (TGEV), are all *alphacoronaviruses*. Antigenic cross-detection is limited to species that belong to the same genus [1]. Sequence analysis of the 3' UTR of the accessory 7 gene revealed high similarities between FCoV, CCoV and TGEV [45–47]. The most important question is the relevance of such a finding to the clinical field observations. Even though the natural infection of cats with CCoV and TGEV has not been officially reported, cats can be experimentally infected with these viruses and seroconvert after infection [48]. In this regard, positive results of both RT-RPA and real-time RT-PCR should be confirmed by sequencing, especially if cats are living in close contact with other animals, as coronaviruses are known to have crossed species barriers [49].

Of all fecal samples detected positive in real-time RT-PCR ( $n = 22$ ), twenty samples with Ct values between 15 and 36 in real-time RT-PCR were correctly identified as positive in the RT-RPA assay. The other two positive samples in real-time RT-PCR were false negative in the RT-RPA assay. Generally, false negative results can be due to low viral load, as well as mutations at the targeted sequence or inhibitory effects. In this case, the latter is unlikely to be the reason, as RPA is known for its robustness to inhibitory effects [50]. Low viral load could be the explanation for one of the false negative results, as this sample had a Ct value higher than 35 (Table S1). For the other false negative sample, low viral load is unlikely to be the cause, since the sample had a Ct of 27 and other positive samples with a Ct value of 30 and more were identified correctly in FCoV-RT-RPA. Even though the target sequence is highly conserved, there is a possibility of mutations. To exclude sequence variation as a cause, the corresponding sample was sequenced and then aligned to the sequence of two correctly identified samples using Geneious Prime. No differences in nucleotides were observed. Therefore, the reason for the false negative result remains unclear.

Another very popular isothermal amplification assay is the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). LAMP is based on the use of a DNA polymerase with strand displacement activity, making amplification possible at a constant temperature (60–65 °C) for 30–60 min [31]. LAMP requires at least four to six primers which is not easy to design for very limited conserved regions in RNA viruses [51]. Hitherto, three LAMP-based assays for detection of FCoV were published. In one study, screening 71 samples with two commercially available LAMP assays revealed sensitivities of 35.3% and 58.8% [30]. This inferior clinical sensitivity of the RT-LAMP to the RT-PCR is consistent with the results of a previously published study (around 50%) [52]. By contrast, the newly developed RT-RPA assay was fast (main TT value 170 s) and sensitive (90.9%), relying on one primer pair.

Immunochromatography tests for the detection of FCoV antigen are commercially available from various companies. The sensitivity and specificity in comparison to RT-PCR is around 95% [53,54]. Unfortunately, the claimed diagnostic sensitivities were not evaluated by an independent research group.

The standard molecular diagnostic methods for RNA virus detection remains real-time RT-PCR. This method, however, is time-consuming and requires a well-equipped laboratory, rendering it impractical as a routine point-of-need test. To overcome these drawbacks, rapid PCR systems have been developed recently [55–57]. The high speed of the PCR was achieved by changing the cycling protocol [57]. One research group optimized the heat transfer to achieve fast thermal cycling with the use of a sample holder that quickly dissipated excess heat due to its high thermal conductivity. The significant reduction of the transition times (68% compared to commercial real-time PCR) leads to an increased

speed of amplification [58]. A different approach to speed up PCR is the use of induction heating [59]. All these techniques are still in the early stages of development and no protocols for the detection of FCoV are available yet. In terms of applicability for point-of-need testing, RPA shows clear advantages. The detection device is easy to transport and operate via a solar battery. Results can be achieved in less than 15 min. Additionally, RPA reagents are available in a dry pellet form. These advantages led to the implementation of RPA in a mobile suitcase lab to make diagnosis possible in low-resourced settings for several viruses [33,38,44,60].

One RPA assay for detection of FCoV was developed based on the membrane gene as the target region [61], which was reported highly sensitive and specific. Unfortunately, it was not possible to reproduce these results in our laboratory (Figure S6), which might be due to a difference in the kits' sources. To make sure that the current FCoV-RT-RPA was compatible with kits from other producers, RT-RAA was performed following manufacturer instructions using our molecular RNA standard and oligo mixes. Exactly the same analytical sensitivity was achieved. That indicates the robustness of our assay. A limitation of the study is that all samples were extracted by silica-based RNA extraction kits before being tested in both real-time RT-PCR and RT-RPA. This step is time-consuming. The inclusion of a simple preparation step will be necessary for field application. This seems very realistic, as the RPA can tolerate inhibitors since crude samples have been used directly in previous studies [62,63]. Furthermore, it is important to emphasize that the designed assay is a good method for screening cat populations for FCoV infections, but is not designed to confirm a FIPV infection.

To conclude, the FCoV-RT-RPA was proven a rapid and sensitive assay for the detection of FCoV in the extracted samples. The deployment of rapid point-of-need tests and following measures would lead to a significant reduction of FCoV in cat populations. The easy handling of the RT-RPA assay makes repeated testing possible for identifying intermittent shedders.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Clinical Samples and Ethical Statement

In total, 39 archived samples were used. Three samples were used from a pool of archived samples from cats with an unknown infection status collected during a surveillance study in Leipzig approved by the Landesdirektion Sachsen: A 19/17. A total of 36 fecal samples were collected during routine diagnosis. The owners had approved the use of the leftovers from the samples for research purposes. To test for cross-detection, inactivated viruses which were not available in our laboratory were provided by Friedrich Loeffler Institute, Robert Koch Institute and Charité Berlin, Germany. Viral RNA from all samples was extracted using the viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the instructions of the manufacturer.

### 4.2. Molecular RNA Standard

RNA standard (3' UTR of the 7b gene of FCoV, nucleotides 28,584 to 29,096 of the GenBank accession number DQ010921) was used to determine the assay's analytical sensitivity. First, a DNA strand was produced by Thermo Fisher Scientific GENEART (Regensburg, Germany) with the T7 promotor attached at the 5'-end (5'-TAATACGACTCACTATAG-3'). The DNA was transcribed into RNA using HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) following the manufacturer's instructions. DNase treatment was applied to remove the background DNA using DNase I (2000 U/mL) (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany). RNA quantification was performed by Qubit RNA BR Assay Kit from Thermo Fisher Scientific (Regensburg, Germany). Ten-fold serial dilutions ranging from  $10^7$ – $10^0$  RNA molecules/ $\mu$ L were prepared.

#### 4.3. Real-Time RT-PCR

The real-time RT-PCR assay was performed using a published protocol [27] on the Stratagene Mx3005p QPCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) using the QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Briefly, the reaction mix contained 10 µL of the 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 7.5 µL of PCR clean water, 0.2 µL of the QuantiTect RT Mix, 0.5 µL of forward primer FCoV1128f-5'-GATTGATTGGCAATGCTAGATTT-3', 0.5 µL of reverse primer 5'-FCoV1229r 5'-AACAATCACTAGATCCAGACGTTAGCT-3' and 0.3 µL of the probe 5'-6FAM-TCCgCTATg ACgAgCCAACAATggATMR-3' (each 10 µM) [27]. Then 1 µL of the template was added. The thermal profile was applied as follows: 50 °C for 30 min, 95 °C for 15 min, then 40 cycles of 94 °C/15 s and 60 °C/45 s.

#### 4.4. Real-Time RT-RPA

Three forward and three reverse primers as well as Exo-probe (Table 3) were produced by TIB Molbiol (Berlin, Germany) and Biomers (Ulm, Germany). Various oligonucleotide combinations were tested to select the most sensitive RT-RPA assay. The optimal RT-RPA reaction mix was conducted using TwistAmp Exo kit (TwistDx Ltd., Cambridge, UK) and lyophilized Reverse Transcriptase RevertAid from Thermo Fisher Scientific (Regensburg, Germany) as follows: 8.2 µL of Reverse Transcriptase (500 U per reaction), 29.5 µL of rehydration buffer, 2.5 µL of magnesium acetate, 2.1 µL of 10 µM forward primer, 2.1 µL of 20 µM reverse primer, 0.6 µL of 10 µM probe and 5 µL of the RNA template were added into the lid of the tube containing freeze-dried reaction pellets. In each RT-RPA run, one tube with molecular biology grade water was used as a negative control. The tube was closed, spun, mixed, and spun again (SMS). Thereafter, the tube was incubated into the T8-ISO instrument (Axxin, Fairfield, Australia) at 42 °C for 15 min. After 230 s, a mixing step by vortexing was performed. The FAM fluorescence signal intensities were measured every 20 s. The run with the different kit was performed using our molecule standard and oligo mixes with an RT-RAA nucleic acid amplification kit (Fluorescent Method, Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ningbo, China) according to manufacturer instructions.

**Table 3.** List of RT-RPA oligonucleotides. BHQ = Black Hole Quencher, FAM = fluorescein amidite.

Names	Sequences (5'-3')
Forward primer 1 (FP1)	TCATCGCGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAG
Forward primer 2 (FP2)	CCGATGTCTAAAACCTGTCTTCCGAGGAATAC
Forward primer 3 (FP3)	ACTTGAAGCAATTCAGAAGCAAGAAGGCTTCGAC
Reverse primer 1 (RP1)	AATCTAGCATTGCCAAATCAAATCTAAACTTCCTA
Reverse primer 2 (RP 2)	GTCATAGCGGATCTTAAACTTCTCTAAATTACTA
Reverse primer 3 (RP 3)	ACTAGATCCAGACGTTAGCTCTTCCATTGTTGGCTC
ExoProbe (P)	ATCTAAACTTCCTAA (BHQ1-dT, Tetrahydrofuran and FAM-dT) GCAATAGGGTTGCTTGTACCTCCTATTACACG-Phosphate

#### 4.5. Analytical Sensitivity and Specificity

The analytical sensitivity of the RT-RPA assay was determined using serial dilution of the molecular RNA standard ( $10^3$ – $10^0$  RNA copies per µL) as well as various concentrations of viral whole-genome extracted from cell culture supernatant ( $1.7 \times 10^6$  to  $4.5 \times 10^0$  RNA copies per µL). Per reaction, 5 µL of the RNA was used. For determining the analytical sensitivity, the viral RNA dilution series was tested with and without host background nucleic acid extracted from real-time RT-PCR FCoV negative samples (nanodrop value: 26 ng/µL for DNA and 21.1 ng/µL for RNA). Using RStudio version 1.3.1093 (RStudio, Boston, MA, United States) [64], a probit regression was performed and the limit of detection was calculated. The illustration was created using the ggplot2 package (v3.3.3; [65]). To determine the cross-detection of the RT-RPA assay, the RNA/DNA of 19 viruses from cell culture were tested (Table 1).

#### 4.6. RT-PCR and Sequencing

The sequencing of the 7b gene of three samples was conducted based on a previous publication of Lin et al. [66] RT-PCR was performed using OneStep RT-PCR Kit from (QIAGEN, Hilden, Germany). The reaction mix contained 5 µL of the 5xOneStep RT-PCR Buffer, 10.5 µL of PCR clean water, 1 µL of the dNTP mix, 1.25 µL each of the 10 µM forward (7a-F1: 5'-CTGCGAGTGATCTTTCTAG-3') and reverse primer (P211: 5'-CACTAGATCCAGACGTTAGCTC-3') and 1 µL of the OneStep RT-PCR Enzyme Mix. Thereafter, 5 µL of the extracted sample was added. The following thermal profile was used for RT-PCR: 50 °C for 30 min, 95 °C for 15 min, then 35 cycles of 94 °C/30 s, 56 °C/30 s and 72 °C/1 min.

For electrophoresis, 8 µL of each sample was analyzed using a 1.5% agarose gel. The amplicon was purified (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini kit for gel extraction and PCR clean up, MACHEREY-NAGEL, Dueren, Germany) and then sequenced by Eurofins Genomics (Munich, Germany). Geneious prime (2 February 2020, Auckland, New Zealand) was applied for data analysis.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10101237/s1>, Figure S1: Amplification curves of RT-RPA testing different primer combinations to achieve the highest sensitivity of the RT-RPA assay. Figure S2: Amplification curves of the different primer combinations using molecular water as a template for control of unspecific fluorescence signal. Figure S3: Amplification curves of RT-RPA using an extracted faecal sample spiked with serial dilution of extracted RNA of feline coronavirus supernatant from cell culture. Figure S4: Amplification curves of RT-RPA runs using primer FP1 and RP3 designed in this study with the molecular standard dilution range (106 to 10 copies/µL). Figure S5: Amplification curves of RT-RPA runs with DNA/RNA of 19 viruses extracted from cell culture that were tested in order to determine the cross-detection of the assay. Figure S6: Amplification curves of RPA runs using primer and probes published in “Development of a recombinase polymerase amplification fluorescence assay to detect feline coronavirus”. Figure S7: Alignment of FP1, RP3 and ExoProbe with the genome sequences of different strains of (a) FCoV and (b) FIPV. Table S1: Summary of all samples tested. Results are shown in Cycle Threshold (Ct) for real-time RT-PCR and Time Threshold (TT, s) for RT-RPA.

**Author Contributions:** Conceptualization and methodology, R.M.K., A.C., U.T., A.A.E.W.; validation, R.M.K., A.A.E.W.; formal analysis, R.M.K.; investigation, R.M.K., A.C., U.T., M.B., K.H., A.A.E.W.; resources, M.B., K.H., U.T.; data curation, R.M.K.; writing—original draft preparation, R.M.K., A.A.E.W.; writing—review and editing, all coauthors; visualization, R.M.K., A.C.; supervision, A.A.E.W., U.T.; project administration, A.A.E.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The animal experiment was externally approved by the competent authority Landesdirektion Sachsen under reference number A 19/17.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data produced in the study is mentioned in the manuscript or Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We thanks Uni Leipzig Open Access Office for covering the publication fees and Manfred Weidmann from Midge Medical for collaboration.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. de Groot, R. *Coronaviridae. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., Eds.; Coronaviridae; Elsevier Academic Press: London, UK, 2011; pp. 806–828.
2. Pedersen, N.C.; Boyle, J.F.; Floyd, K. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am. J. Veter. Res.* **1981**, *42*, 363–367.

3. Pedersen, N.C.; Boyle, J.F.; Floyd, K.; Fudge, A.; Barker, J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am. J. Veter. Res.* **1981**, *42*, 368–377.
4. Holzworth, J. Some important disorders of cats. *Cornell Vet.* **1963**, *53*, 157–160. [[PubMed](#)]
5. Klein-Richers, U.; Hartmann, K.; Hofmann-Lehmann, R.; Unterer, S.; Bergmann, M.; Rieger, A.; Leutenegger, C.; Pantchev, N.; Balzer, J.; Felten, S. Prevalence of Feline Coronavirus Shedding in German Catteries and Associated Risk Factors. *Viruses* **2020**, *12*, 1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. 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.* **1991**, *117*, 85–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Benetka, V.; Kübber-Heiss, A.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Hofmann-Parisot, M.; Möstl, K. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Veter. Microbiol.* **2004**, *99*, 31–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Hohdatsu, T.; Okada, S.; Ishizuka, Y.; Yamada, H.; Koyama, H. The Prevalence of Types I and II Feline Coronavirus Infections in Cats. *J. Veter. Med. Sci.* **1992**, *54*, 557–562. [[CrossRef](#)]
9. Addie, D.D.; Schaap, I.; Nicolson, L.; Jarrett, O. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2735–2744. [[CrossRef](#)]
10. Rottier, P.J. The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Veter. Microbiol.* **1999**, *69*, 117–125. [[CrossRef](#)]
11. Pedersen, N. An Overview of Feline Enteric Coronavirus and Infectious Peritonitis Virus Infections. *Feline Pract.* **1995**, *23*, 7–20.
12. Addie, D.D.; Paltrinieri, S.; Pedersen, N.C. Second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J. Feline Med. Surg.* **2004**, *6*, 125–130. [[CrossRef](#)]
13. Cave, T.A.; Golder, M.C.; Simpson, J.; Addie, D.D. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *J. Feline Med. Surg.* **2004**, *6*, 53–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pedersen, N.; Sato, R.; Foley, J.; Poland, A. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *J. Feline Med. Surg.* **2004**, *6*, 83–88. [[CrossRef](#)]
15. Pedersen, N.C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J. Feline Med. Surg.* **2009**, *11*, 225–258. [[CrossRef](#)]
16. Addie, D.D.; Jarrett, O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Veter. Rec.* **2001**, *148*, 649–653. [[CrossRef](#)]
17. Foley, J.E.; Poland, A.; Carlson, J.; Pedersen, N.C. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1997**, *210*, 1307–1312. [[PubMed](#)]
18. Vogel, L.; Van Der Lubben, M.; Lintelo, E.G.T.; Bekker, C.P.; Geerts, T.; Schuijff, L.S.; Grinwis, G.; Egberink, H.; Rottier, P.J. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Veter. Res.* **2010**, *41*, 71. [[CrossRef](#)]
19. Pedersen, N.C.; Allen, C.E.; Lyons, L. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J. Feline Med. Surg.* **2008**, *10*, 529–541. [[CrossRef](#)]
20. Chang, H.-W.; Egberink, H.; Halpin, R.; Spiro, D.J.; Rottier, P.J. Spike Protein Fusion Peptide and Feline Coronavirus Virulence. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1089–1095. [[CrossRef](#)]
21. Addie, D.D.; Jarrett, O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Veter. Rec.* **1992**, *130*, 133–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ritz, S.; Egberink, H.; Hartmann, K. Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 1193–1197. [[CrossRef](#)]
23. Dickinson, P.J.; Bannasch, M.; Thomasy, S.M.; Murthy, V.; Vernau, K.M.; Liepnieks, M.; Montgomery, E.; Knickelbein, K.E.; Murphy, B.; Pedersen, N.C. Antiviral treatment using the adenosine nucleoside analogue GS-441524 in cats with clinically diagnosed neurological feline infectious peritonitis. *J. Veter. Intern. Med.* **2020**, *34*, 1587–1593. [[CrossRef](#)]
24. Addie, D.; Covell-Ritchie, J.; Jarrett, O.; Fosbery, M. Rapid Resolution of Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis Uveitis with an Oral Adenosine Nucleoside Analogue and Feline Interferon Omega. *Viruses* **2020**, *12*, 1216. [[CrossRef](#)]
25. Doenges, S.J.; 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.* **2016**, *19*, 344–350. [[CrossRef](#)]
26. Dye, C.; Helps, C.R.; Siddell, S.G. Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats. *J. Feline Med. Surg.* **2008**, *10*, 167–174. [[CrossRef](#)]
27. Gut, M.; Leutenegger, C.M.; Huder, J.B.; Pedersen, N.C.; Lutz, H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J. Virol. Methods.* **1999**, *77*, 37–46. [[CrossRef](#)]
28. Herrewegh, A.A. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Barker, E.N.; Stranieri, A.; Helps, C.R.; Porter, E.L.; Davidson, A.D.; Day, M.J.; Knowles, T.; Kipar, A.; Tasker, S. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. *Veter. Res.* **2017**, *48*, 1–14. [[CrossRef](#)]
30. Günther, S.; Felten, S.; Wess, G.; Hartmann, K.; Weber, K. Detection of feline Coronavirus in effusions of cats with and without feline infectious peritonitis using loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* **2018**, *256*, 32–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, E63. [CrossRef] [PubMed]
32. Li, J.; Macdonald, J.; von Stetten, F. Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Anal.* **2019**, *144*, 31–67. [CrossRef]
33. El Wahed, A.A.; El-Deeb, A.; El-Tholoth, M.; El Kader, H.A.; Ahmed, A.; Hassan, S.; Hoffmann, B.; Haas, B.; Shalaby, M.A.; Hufert, F.T.; et al. A Portable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus. *PLoS ONE.* **2013**, *8*, e71642. [CrossRef]
34. El Wahed, A.A.; Patel, P.; Heidenreich, D.; Hufert, F.T.; Weidmann, M. Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *PLoS Curr.* **2013**, *5*, 5. [CrossRef]
35. Euler, M.; Wang, Y.; Heidenreich, D.; Patel, P.; Strohmeier, O.; Hakenberg, S.; Niedrig, M.; Hufert, F.T.; Weidmann, M. Development of a Panel of Recombinase Polymerase Amplification Assays for Detection of Biothreat Agents. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 1110–1117. [CrossRef]
36. Euler, M.; Wang, Y.; Nentwich, O.; Piepenburg, O.; Hufert, F.T.; Weidmann, M. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus. *J. Clin. Virol.* **2012**, *54*, 308–312. [CrossRef]
37. Euler, M.; Wang, Y.; Otto, P.; Tomaso, H.; Escudero, R.; Anda, P.; Hufert, F.T.; Weidmann, M. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Francisella tularensis. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2234–2238. [CrossRef]
38. El Wahed, A.A.; Weidmann, M.; Hufert, F.T. Diagnostics-in-a-Suitcase: Development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus. *J. Clin. Virol.* **2015**, *69*, 16–21. [CrossRef] [PubMed]
39. Holland, J.; Spindler, K.; Horodyski, F.; Grabau, E.; Nichol, S.; Vandepol, S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science.* **1982**, *215*, 1577–1585. [CrossRef]
40. Vennema, H.; Heijnen, L.; Rottier, P.J.; Horzinek, M.C.; Spaan, W.J. A novel glycoprotein of feline infectious peritonitis coronavirus contains a KDEL-like endoplasmic reticulum retention signal. *J. Virol.* **1992**, *66*, 4951–4956. [CrossRef] [PubMed]
41. Dunbar, D.; Kwok, W.; Graham, E.; Armitage, A.; Irvine, R.; Johnston, P.; McDonald, M.; Montgomery, D.; Nicolson, L.; Robertson, E.; et al. Diagnosis of non-effusive feline infectious peritonitis by reverse transcriptase quantitative PCR from mesenteric lymph node fine-needle aspirates. *J. Feline Med. Surg.* **2019**, *21*, 910–921. [CrossRef] [PubMed]
42. 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. [CrossRef] [PubMed]
43. TwistDx™. TwistAmp®DNA Amplification Kits Assay Design Manual. Available online: <https://www.twistdx.co.uk> (accessed on 4 August 2021).
44. El Wahed, A.A. Suitcase Lab for rapid detection of SARS-CoV-2 based on recombinase polymerase amplification assay. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 2627–2634. [CrossRef] [PubMed]
45. Horsburgh, B.C.; Brierley, I.; Brown, T.D.K. Analysis of a 9.6 kb sequence from the 3′ end of canine coronavirus genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **1992**, *73*, 2849–2862. [CrossRef] [PubMed]
46. Vennema, H.; Rossen, J.; Wesseling, J.; Horzinek, M.; Rottier, P. Genomic organization and expression of the 3′ end of the canine and feline enteric coronaviruses. *Virology* **1992**, *191*, 134–140. [CrossRef]
47. De Groot, R.J.; Ter Haar, R.J.; Horzinek, M.C.; Van Der Zeijst, B.A.M. Intracellular RNAs of the Feline Infectious Peritonitis Coronavirus Strain 79-1146. *J. Gen. Virol.* **1987**, *68*, 995–1002. [CrossRef] [PubMed]
48. E Barlough, J.; A Stoddart, C.; Sorresso, G.P.; Jacobson, R.H.; Scott, F.W. Experimental inoculation of cats with canine coronavirus and subsequent challenge with feline infectious peritonitis virus. *Lab. Anim. Sci.* **1984**, *34*, 592–597.
49. Graham, R.L.; Baric, R.S. Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. *J. Virol.* **2010**, *84*, 3134–3146. [CrossRef]
50. Bonney, L.C.; Watson, R.J.; Afrough, B.; Mullojonova, M.; Dzhuraeva, V.; Tishkova, F.; Hewson, R. A recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Crimean-Congo Haemorrhagic fever Virus infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006013. [CrossRef]
51. El Wahed, A.A.; Patel, P.; Faye, O.; Thaloengsok, S.; Heidenreich, D.; Matangkasombut, P.; Manopwisedjaroen, K.; Sakuntabhai, A.; Sall, A.A.; Hufert, F.T.; et al. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Diagnostics of Dengue Infection. *PLoS ONE.* **2015**, *10*, e0129682. [CrossRef]
52. Stranieri, A.; Lauzi, S.; Giordano, A.; Paltrinieri, S. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus. *J. Virol. Methods* **2017**, *243*, 105–108. [CrossRef]
53. tamaVet GmbH. tamaVet@Schnelltests für Katzen—Coronavirus. Available online: <https://www.tamavet-diagnostics.com/produkte/schnelltests/katze> (accessed on 4 August 2021).
54. Fassisi GmbH. Fassisi ParCo. Available online: <https://www.fassisi.de/produkte/kleintiere/hunde-katzen-parco/> (accessed on 4 August 2021).
55. Shirato, K.; Nao, N.; Matsuyama, S.; Kageyama, T.; Kazuya, S. Ultra-Rapid Real-Time RT-PCR Method for Detecting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Using a Mobile PCR Device, PCR1100. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2020**, *73*, 181–186. [CrossRef]
56. Kim, B.; Kim, J.; Kim, S.; Kim, M.; Truong, A.T.; Cho, K.; Yoon, B. Detection of chronic bee paralysis virus using ultra-rapid PCR and nested ultra-rapid PCR. *J. Apic. Res.* **2018**, *58*, 133–140. [CrossRef]
57. Hilscher, C.; Vahrson, W.; Dittmer, D.P. Faster quantitative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e182. [CrossRef]

58. Gregorini, M.; Mikutis, G.; Grass, R.N.; Stark, W.J. Small-Size Polymerase Chain Reaction Device with Improved Heat Transfer and Combined Feedforward/Feedback Control Strategy. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, *58*, 9665–9674. [CrossRef]
59. Zhou, L.; Peng, N.; Hu, F. Temperature-uniformity study on transverse flux induction heating applied to rapid PCR. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*; IOP Publishing: Bristol, UK, 2019; Volume 242, p. 032009.
60. Shalaby, M.A.; El-Deeb, A.; El-Tholoth, M.; Hoffmann, D.; Czerny, C.-P.; Hufert, F.T.; Weidmann, M.; El Wahed, A.A. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of lumpy skin disease virus. *BMC Veter. Res.* **2016**, *12*, 1–6. [CrossRef]
61. Hu, X.; Xiao, L.; Cong, X.; Zhu, Y.; Huang, B.; Cong, F. Development of a recombinase polymerase amplification fluorescence assay to detect feline coronavirus. *Mol. Cell. Probes.* **2020**, *54*, 101669. [CrossRef]
62. Liljander, A.; Yu, M.; O'Brien, E.; Heller, M.; Nepper, J.; Weibel, D.B.; Gluecks, I.; Younan, M.; Frey, J.; Falquet, L.; et al. Field-Applicable Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2810–2815. [CrossRef] [PubMed]
63. Daher, R.K.; Stewart, G.; Boissinot, M.; Bergeron, M.G. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin. Chem.* **2016**, *62*, 947–958. [CrossRef] [PubMed]
64. R.C. Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2013. Available online: <http://r.meteo.uni.wroc.pl/web/packages/dplr/vignettes/intro-dplr.pdf> (accessed on 4 November 2020).
65. Hadley, W. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016.
66. Lin, C.-N.; Su, B.-L.; Huang, H.-P.; Lee, J.-J.; Hsieh, M.-W.; Chueh, L.-L. Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *J. Feline Med. Surg.* **2009**, *11*, 413–419. [CrossRef] [PubMed]

## 4. Diskussion und Schlussfolgerung

Eine Infektion mit FCoV stellt durch die mögliche Entwicklung einer FIP ein großes Risiko für die Gesundheit von Katzen dar. Das Ziel in jedem Katzenhaushalt sollte es daher sein, den FCoV-Infektionsdruck und das Übertragungsrisiko zu senken. Dadurch entsteht ein hoher Bedarf an Maßnahmen, die verhindern, dass sich Katzen in Mehrkatzenhaushalten oder Zuchten mit FCoV infizieren.

Der erste Schritt, um Infektionserreger erfolgreich unter Kontrolle zu bringen, ist die Überwachung durch geeignete Diagnostikmethoden. Daher wurde sich in dieser Studie mit der Entwicklung einer RT-RPA als Schnelltest für FCoV beschäftigt. Die Nachweisgrenze der RT-RPA lag verglichen mit der real-time RT-PCR bei 58,5 Kopien an RNA Molekülen/Reaktion. Die klinische Sensitivität und Spezifität betragen bei der Untersuchung von 39 Kotproben 90,9% bzw. 100%.

Die Entwicklung der PCR war ein einschneidender Schritt in der Geschichte der molekularen Diagnostik (BARTLETT and STIRLING 2003). Es gibt allerdings einige Bereiche, in denen immer deutlicher wird, dass schnellere, einfachere und kostengünstigere Methoden benötigt werden. Die meisten Tierarztpraxen sind darauf angewiesen, gesammelte Proben in ein Labor zu schicken und können erst Tage später mit einem Testergebnis rechnen. Neben der Zeitverzögerung zwischen der Vorstellung des Tieres bis zu dem Beginn der Therapie kommen noch weitere Schwierigkeiten hinzu. Für den Transport gesammelter klinischer Proben gibt es Vorschriften der World Organisation for Animal Health (OIE), um Probleme wie Kontamination oder falsche Lagerung und dadurch bedingte verfälschte Ergebnisse zu vermeiden (PEARSON 2007). So stellt der Versand der Proben weiteren Arbeitsaufwand und eine zusätzliche mögliche Fehlerquelle dar. Dies verdeutlicht, dass die ständige Weiterentwicklung von zuverlässigen Nachweismethoden für die Diagnostik von Pathogenen unerlässlich ist. Es werden Schnelltests benötigt, die Tierärzte in ihrer eigenen Praxis etablieren oder sogar vor Ort anwenden können.

Die Schnell-Diagnostik von FCoV lässt sich grob in zwei Herangehensweisen unterteilen. Zum einen gibt es den indirekten Erregernachweis in Form von Antikörpertests. Dieser weist nicht das Virus oder eine akute Infektion nach, sondern die Reaktion des Körpers darauf. Dieser Test wird vor allem für die Überwachung von der Ausbreitung von FCoV in den Katzenpopulationen benutzt (MUIRDEN 2002, BENETKA et al. 2004, BELL et al. 2006, AN et al. 2011, ADDIE et al. 2012,

TAHARAGUCHI et al. 2012). Hier geht es nicht konkret darum, welche Katze aktiv Virus ausscheidet, sondern viel mehr darum, festzustellen, wie groß der Anteil an Tieren ist, die mit dem Virus Kontakt hatten. Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass das Tier mit hoher Wahrscheinlichkeit keine akute FCoV-Infektion hat. Es ist allerdings bekannt, dass falsch negative Ergebnisse durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen auftreten können (MELI et al. 2013). Ein positives Ergebnis wiederum bedeutet nicht zwingend, dass das Tier Viren ausscheidet, da Katzen oft monatelang noch seropositiv bleiben (ADDIE and JARRETT 2001). Zusätzlich kann das Vorhandensein von antinuklearen Antikörpern zu falsch positiven Ergebnissen führen (ADDIE et al. 2012). Bei den Proben, die für Antikörpertests genutzt werden, handelt es sich meist um Vollblut, Plasma, Serum oder Effusion (ADDIE et al. 2015).

Zum anderen gibt es auch noch den direkten Erreger- oder Antigennachweis. Dieser weist eine akute Infektion nach und ermöglicht so die Identifizierung von Virusausscheidern. Für Tierbesitzer ist dieser Nachweis von besonderer Bedeutung, da je nach Ergebnis konkrete Maßnahmen zur Behandlung oder Vermeidung der Ansteckung anderer Katzen getroffen werden können. Der Vorteil gegenüber dem Antikörper-Test besteht darin, dass Virusausscheider detektiert werden, aber keine nicht infektiösen, seropositiven Tiere (ADDIE and JARRETT 2001). Da FCoV vor allem mit dem Kot ausgeschieden wird (PEDERSEN 1995, DE GROOT et al. 2011), ist Kot für den Nachweis der Virusausscheidung das geeignetste Probenmaterial (ADDIE and JARRETT 2001). Dies ist insofern günstig, als die Untersuchung von Kotproben keinen direkten Eingriff bzw. Kontakt zum Tier erfordert, und so stressfrei erfolgen kann. Der Nachteil dabei ist, dass bei mehreren Katzen im Haushalt mit gleicher Katzentoilette eine Kreuzkontamination nicht immer ausgeschlossen werden kann (ADDIE and JARRETT 2001). Ein weiterer Schwachpunkt ist eine geringere Sensitivität des Antigentests, da er nur die Menge an Antigen detektieren kann, welche sich tatsächlich in der Probe befindet. Dies kann dazu führen, dass einzelne Tiere mit geringer Viruslast im Kot falsch negativ detektiert werden. Im Gegensatz dazu beruhen molekulare Verfahren auf einer Vervielfältigung des genetischen Materials vor dem eigentlichen Nachweisschritt. Ein bekanntes isothermales Verfahren ist neben der RPA die LAMP (NOTOMI et al. 2000). Es gibt mehrere Studien über Versuche, einen LAMP-basierten Schnellnachweis von FCoV zu entwickeln. Die Ergebnisse zweier Studien für den Nachweis von FCoV in Thorax und Abdominal Erguss sowie Blut- oder Kotproben von Katzen mit FIP-Erkrankung mittels LAMP zeigten dabei im Vergleich

zur real-time RT-PCR lediglich eine Sensitivität von ca. 50 bzw. 60% (STRANIERI et al. 2017, GUNTHER et al. 2018). Die dritte der LAMP basierten Studien ist aufgrund von erhöhten falsch positiven Ergebnissen nicht eindeutig zu interpretieren und daher ebenfalls nicht für die Etablierung in der Praxis geeignet (TECHANGAMSUWAN et al. 2013).

RPA-Verfahren weisen wie die Antigentests und die LAMP eine akute Virusinfektion nach und beruhen dabei ebenfalls auf einer Vervielfältigung der nachzuweisenden RNA bzw. DNA (LI et al. 2018). Im Gegensatz zu der LAMP ist die Sensitivität in den meisten RPA-Assays allerdings vergleichbar mit der der PCR (ABD EL WAHED et al. 2013a, ABD EL WAHED et al. 2013b, ABD EL WAHED et al. 2015a).

Der in dieser Studie entwickelte Schnelltest mittels RT-RPA in Kombination mit fluoreszierenden Sonden erlaubt einen Nachweis in weniger als 15 Minuten und kann so Virusausscheider schnell und unkompliziert identifizieren.

In Bezug auf die Anwendbarkeit für Point-of-Need-Tests weist die RPA neben den schnellen Ergebnissen noch weitere klare Vorteile auf. Das Nachweisgerät ist leicht zu transportieren und kann auch über eine Solarbatterie betrieben werden. Außerdem sind die RPA-Reagenzien in Form von Trockenpellets erhältlich. Diese Vorteile führten zur Implementierung der RPA in ein mobiles Koffelabor, um die Diagnose für verschiedene Viren in ressourcenarmen Umgebungen zu ermöglichen (ABD EL WAHED et al. 2013a, ABD EL WAHED et al. 2015b, SHALABY et al. 2016, EL WAHED et al. 2021).

Die Entwicklung eines neuen RPA-Protokolls wird in mehrere Abschnitte gegliedert. Allgemein sind für die Validierung von Diagnostiktests durch die OIE Grundsätze vorgegeben. Zusätzliche Hilfestellungen für die RPA Entwicklung können der Internetseite des Herstellers entnommen werden (TWISTDX). Der erste Schritt einer Testentwicklung ist es, den Zweck und das Einsatzgebiet des Testes festzulegen (DIAZ 3-5.12.2014). Dafür muss für die RPA eine geeignete Zielregion gewählt werden und Primer und Sonde spezifisch zu dieser Region kreiert werden (TWISTDX). Danach müssen erst die analytische und dann die diagnostische Sensitivität bzw. Spezifität ermittelt werden. Als nächstes folgt die Testung auf Reproduzierbarkeit und daraufhin die Implementierung des entwickelten Tests. Als ein fortlaufender Prozess müssen der entwickelte Test in der allgemeinen Nutzung überwacht und eventuelle Modifizierungen durchgeführt werden (DIAZ 3-5.12.2014). Im Folgenden werden die

Ergebnisse sowie die möglichen Schwierigkeiten des hier entwickelten Tests bis zu dem Schritt der Reproduzierbarkeit diskutiert.

Als erster Punkt der Studie, wurde die Zielregion für die RT-RPA gewählt. Die Intention der Entwicklung des neuen RPA-Testverfahrens war es, die Untersuchung aller Katzen einzelner Haushalte oder Populationen zu ermöglichen, um Virusausscheider schnell zu erkennen und die Viruslast von FCoV möglichst gering zu halten. Daher ist es wichtig alle Stämme des FCoV - inklusive der Varianten des Serotyps I & II sowie FECV und FIPV – zu detektieren. Aus diesem Grund wurde als Zielregion für die Primer die UTR 3` - Region des 7b Gens verwendet. Die Funktion dieses Gens ist noch nicht geklärt (VENNEMA et al. 1992), aber die Region gilt als hoch konserviert innerhalb der FCoVs (HERREWEGH et al. 1995).

Nachdem die Zielregion feststeht, folgt als nächster Schritt das Design der Primer und der Sonde. Die Effektivität der Primer hängt von unterschiedlichen Faktoren ab, wie ihre Länge - 30-35 Nukleotide – und ihre Nukleotidzusammensetzung. Es sollten ein besonders kleiner, sowie ein besonders großer Cytosin- und Guanin-Gehalt und mehrere sich wiederholende Sequenzen vermieden werden (TWISTDX). Um die höchst mögliche analytische Sensitivität zu erreichen, wurden unterschiedliche Primer-Kombinationen mit einem synthetisierten Standard getestet. Auch die Konzentration der Primer spielt eine entscheidende Rolle. Bei dem FCoV handelt es sich um ein RNA-Virus (DE GROOT et al. 2011), daher wird ein zusätzlicher Schritt der reversen Transkription benötigt, um die RNA in cDNA umzuschreiben. Wie unter anderem bei der RPA Entwicklung für SARS-CoV-2 festgestellt wurde, wird für diesen Vorgang der Rückwärts-Primer (RP) zusätzlich benötigt (EL WAHED et al. 2021), weswegen verschiedene Konzentrationen des RP getestet wurden. Die beste Leistung wurde durch die doppelte Konzentration des RP im Vergleich zum Vorwärts - Primer erreicht. Neben der möglichst hohen Sensitivität ist ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung einer neuen Nachweismethode, dass keine Hintergrund DNA/RNA oder andere Pathogene für falsch positive Ergebnisse sorgen. Für den Test auf mögliche Kreuzreaktionen wurden 19 Viren genutzt, die entweder in Haustierpopulationen verbreitet sind oder ebenfalls zu der Familie der *Coronaviridae* gehören. Während bei 16 dieser Viren keine Kreuzreaktion auftrat, wurden neben dem FIPV sowohl bei der RT-RPA als auch bei der real-time RT-PCR ein Stamm des CCoV und ein Stamm des TGEV detektiert. Beide dieser Viren gehören zu den *Alphacoronaviren*. Innerhalb dieser Gattung sind Antikörper-Kreuzreaktionen bei Immunofluorescence- und

Neutralisationstests und eine große Übereinstimmung der Genome bekannt, sodass die Viren teilweise eher als wirtsangepasste Mutationen, als als eigene Spezies bezeichnet werden (PEDERSEN et al. 1978, HORZINEK et al. 1982). Die Einschätzung bezüglich der klinischen Relevanz dieser Kreuzreaktionen ist nicht ganz einfach, da es zwar noch keine veröffentlichten Berichte über natürliche Infektionen bei Katzen mit TGEV und CCoV gibt, sie allerdings experimentell mit den Viren infiziert werden konnten. Dabei konnten bei den infizierten Katzen Antikörper gegen das entsprechende Virus nachgewiesen werden, welche allerdings weder zu einer Sensibilisierung noch zu einer Immunität gegen eine FIPV-Infektion führten (BARLOUGH et al. 1984). Die Entstehung des Serotyps II aus FCoV und CCoV lässt zusätzlich vermuten, dass eine speziesübergreifende Infektion auch außerhalb des Labors möglich ist und es durch Rekombinationen zu der Entstehung von neuen Virusvarianten kommen kann. Daher sollte jegliche Coronavirus-Übertragung möglichst verhindert werden und die Frage, um welches Virus es sich handelt, könnte in Bezug auf die weitere Vorgehensweise eher vernachlässigt werden.

Nach der analytischen Sensitivität und der Untersuchung auf Kreuzreaktionen ist laut der OIE die Ermittlung der diagnostischen oder klinischen Sensitivität und Spezifität des Testes wichtig (DIAZ 3-5.12.2014). Um die klinische Sensitivität der RT-RPA zu evaluieren, wurden 39 feline Kotproben extrahiert und getestet. Während mittels real-time RT-PCR 22 Proben positiv getestet wurden, waren es bei der RT-RPA nur 20. Um den Grund dieser falsch negativen Ergebnisse zu ermitteln, wurden weitere Überlegungen und Untersuchungen angestellt. Die hohe Sensitivität der PCR legt die Vermutung nahe, dass die falsch negativen Ergebnisse der RT-RPA durch sehr geringe Viruslast entstanden sind. Dies trifft auf eine der Proben zu, da sie einen cycle threshold (Ct) - Wert von über 36 hatte. Die andere allerdings hatte einen Ct-Wert von 27, und andere Proben mit einem Ct-Wert über 30 wurden in der RT-RPA korrekt als positiv erkannt. Weitere Gründe für falsch negative Ergebnisse könnten generell Inhibitoren in der zu untersuchenden Probe sein sowie Mutationen in der Zielregion der Primer. Inhibitoren als Ursache für falsch negative Ergebnisse sind allerdings eher unwahrscheinlich, da die RPA als sehr robust gegenüber Inhibitoren gilt und in einigen Studien auch mit ursprünglichen, nicht extrahierten Proben funktioniert hat (BONNEY et al. 2017). Unter den Viren haben gerade RNA-Viren eine hohe Tendenz zu spontanen Mutationen (HOLLAND et al. 1982) und obwohl es sich bei der UTR 3` des 7b-Gens um eine sehr stabile Region handelt, könnte es sein, dass Mutationen in dem

Bereich, wo die Primer und Sonde ansetzen, zu einer Störung dieser Bindung führen und so die Vervielfältigung der Nukleinsäuren beeinflusst wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden sowohl die falsch negative Probe, als auch zwei korrekt identifizierte Proben sequenziert und die Region, an der Primer und Sonde binden, verglichen. Es ließ sich keine Sequenzänderung feststellen, daher kann auch dieser Punkt als mögliche Ursache ausgeschlossen werden und es bleibt unklar, wieso die eine Probe nicht von der RT-RPA erkannt wurde.

Der nächste Schritt der Validierung einer Diagnostikmethode bestünde darin, mit einem größeren Pool an Proben die Reproduzierbarkeit des RT-RPA Tests - auch in anderen Laboren - genauer zu evaluieren.

Obwohl die RT-RPA sehr sensitiv ist und sich gut als Schnelltest eignet, gibt es einige wenige Einschränkungen. Zum einen wurden für die Validierung dieses Tests ausschließlich Proben verwendet, die mittels Silica-basierten Extraktionskits aufgereinigt wurden. Dieser Schritt ist zeitaufwendig, und für die Anwendung außerhalb des Labors wird ein einfacher Vorbereitungsschritt erforderlich sein. Die Verwendung von unbearbeiteten Proben bzw. Proben, die mittels Schnellextraktion aufgereinigt wurden, scheint allerdings realistisch, da in früheren Studien schon unbearbeitete Proben für den Nachweis mittels RPA genutzt wurden (LILJANDER et al. 2015, DAHER et al. 2016, BONNEY et al. 2017). Eine vielversprechende Methode zur Schnellextraktion ist der Gebrauch eines Lyse-Puffers und sogenannten „Magnetic-Beads“. Bei dieser Methode wird die Probe nach Zugabe des Puffers und der magnetischen Kugeln gemixt und bei 95 °C über 15 min inkubiert. Die Zellen werden so aufgebrochen und Proteine und Fette lagern sich dank Spannungen an der Oberfläche der Kugeln an diese an. Durch die Nutzung eines Röhrchen-Halters mit Magnetfunktion, werden diese Kugeln an einer Seite des Röhrchens fixiert, und der Überstand mit der sich im Puffer befindlichen RNA/DNA kann abpipettiert werden und ggf. verdünnt für den molekularen Nachweis genutzt werden. Das Verfahren ist Kühlketten-unabhängig und eignet sich durch die einfache Vorgehensweise sehr gut für Extraktionen außerhalb des Labors (HANSEN et al. 2019). Es erscheint daher sinnvoll, dieses Verfahren in einer weiteren Studie zu testen. Außerdem könnte die Entwicklung eines Multiplex-Assays (wie im Diagnostik-Kapitel beschrieben) interessant sein, um den Infektionsstatus der Katze bezüglich anderer Erreger, die als mögliche Differentialdiagnosen bei Diarrhoe in Frage kommen, zu ermitteln. Der Gesundheitsstatus des Tieres bezüglich einer Infektion mit zum Beispiel Feline

Panleukopenie Virus, Giardia spp., Salmonella spp. oder Toxoplasma gondii könnten so innerhalb eines Testverfahrens festgestellt werden. Insbesondere die Toxoplasmose spielt aufgrund ihrer Übertragung auf den Menschen und den möglicherweise schweren Verläufen bei immunsuppressiven Menschen sowie Schädigungen des Embryos bei einer Erstinfektion von Schwangeren im Rahmen des One Health-Gedankens eine wichtige Rolle (GROS et al. 2001, WILKING et al. 2016). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die RT-RPA als schneller und empfindlicher Test für den Nachweis von FCoV in extrahierten Proben erwiesen hat. Der Einsatz von Schnelltests und die anschließenden Maßnahmen sind ein wichtiger Schritt für eine deutliche Reduzierung von FCoV in Katzenpopulationen. Eine Kombination von konsequenter Testung mit gegebenenfalls folgender Quarantäne und Behandlung von positiv getesteten Katzen vor der Aufnahme in einen neuen Haushalt wäre eine vielversprechende Möglichkeit FCoV-freie Katzenbestände zu schaffen. Dabei ist die Behandlung mit Mutian-Xraphconn oder einem vergleichbaren Medikament ein wichtiger Ansatz, um die Quarantänezeit erheblich zu verringern. Die einfache Handhabung der RT-RPA erlaubt dabei eine wiederholte Durchführung der Tests und so auch die Identifizierung von intermittierenden Ausscheidern.

## 5. Zusammenfassung

Rea Maja Kobialka

### **Molekularer Nachweis von Felinem Coronavirus basierend auf einem Rekombinase-Polymerase-Amplifikationstest**

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Eingereicht 02.2022

50 Seiten, 9 Abbildungen, 157 Referenzen, 1 Veröffentlichung, 1 Anhang

Schlüsselwörter: Rekombinase Polymerase Amplifikation; RT-RPA; Diagnostik; FCoV; Feline Coronavirus; FIP; Feline Infektiöse Peritonitis; Schnelltest

**Einleitung:** Das Feline Coronavirus (FCoV) ist in den Katzenpopulationen der ganzen Welt weit verbreitet. Das Problem dieses Virus ist seine große Wahrscheinlichkeit zu mutieren. Einige dieser Mutationen können zu einer veränderten Pathogenität und zu einem schweren Verlauf der Infektion führen. So bleibt es möglicherweise nicht wie bei den meisten der infizierten Tiere bei einem inapparenten Verlauf oder milden Durchfall, sondern es kommt zur Entwicklung einer häufig tödlich endenden systemischen Erkrankung, der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIP). Um dies zu verhindern ist es essentiell, Virusausscheider schnell zu identifizieren und zu eliminieren, um den Virusdruck in Katzenpopulationen so gering wie möglich zu halten. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für den Nachweis von FCoV in Kot ist der Goldstandard, aber ist zeitaufwendig und erfordert ein gut ausgestattetes Labor. Als isothermale Methode liefert die Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation (RT-RPA) eine schnelle und kostengünstige Alternative für den molekularen Nachweis von FCoV.

**Ziel der Untersuchung:** Ziel dieser Studie war es, einen Schnelltest zum Nachweis von FCoV zu entwickeln, der auf der RT-RPA basiert.

**Material und Methoden:** Drei Vorwärts- und drei Rückwärtsprimer sowie eine Sonde wurden erstellt. Als Zielsequenz wurde die hochkonservierte, nicht-translatierte Region des 7b Gens gewählt. Alle möglichen Kombinationen dieser Primer wurden getestet und das Paar mit der höchsten Sensitivität für die weitere Validierung ausgewählt. Bei einer konstanten Temperatur von 42 °C wurde die reverse Transkription mit

anschließender DNA-Amplifikation und Detektion innerhalb von 15 Minuten durchgeführt. Die analytische Sensitivität wurde anhand von neun Wiederholungen mit der Verdünnungsreihe des molekularen Standards ( $10^3$ - $10^0$  RNA Kopien/ $\mu$ L) ermittelt und die Nachweisgrenze mittels Probit-Analyse berechnet. Für die Untersuchung auf Kreuzreaktionen wurde DNA oder RNA von 19 Viren getestet. Die Leistung der RT-RPA unter Verwendung klinischer Proben wurde mit extrahierter RNA von 39 feline Kotproben analysiert. Alle Ergebnisse wurden denen der real-time RT-PCR gegenübergestellt. Die UTR des 7b Gens ausgewählter Proben, einschließlich einer falsch negativ getesteten Probe, wurde sequenziert und mittels Geneious Prime analysiert.

**Ergebnisse:** Die Probit-Analyse ergab eine Nachweisgrenze von 58,5 RNA-Kopien/Reaktion. Die RT-RPA amplifizierte keine Nukleinsäuren der 17 getesteten anderen Pathogenen, zeigte jedoch eine Kreuzreaktion mit dem Caninen Coronavirus und dem Transmissiblen Gastroenteritis-Virus. Der Vergleich der Resultate der real-time RT-PCR mit den 39 extrahierten Kotproben und den Ergebnissen der RT-RPA ergab eine Sensitivität von 90,9% und eine Spezifität von 100%. Bei der Sequenzierung wurde keine Sequenzänderung in der Region von Primern und Sonde festgestellt.

**Schlussfolgerung:** Die RT-RPA hat sich als schnelle und effektive Maßnahme für den Nachweis von FCoV in extrahierten Kotproben herausgestellt. Die einfache Handhabung der RPA macht wiederholtes Testen möglich, um auch die intermittierenden Ausscheider zu erkennen. Die Anwendung des Schnelltests könnte so zu einer Reduktion von FCoV innerhalb der Katzenpopulationen beitragen.

## 6. Summary

Rea Maja Kobialka

### **Molecular detection of feline coronavirus based on recombinase-polymerase amplification assay**

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health

Submitted 02.2022

50 pages, 9 figures, 157 references, 1 publication, 1 appendix

Keywords: recombinase polymerase amplification; RT-RPA; diagnostic; FCoV; feline coronavirus; FIP; feline infectious peritonitis; point-of-need testing

**Introduction:** Feline coronavirus (FCoV) is widespread in cat populations around the world. An infection with FCoV causes in most of the cases mild diarrhoea. In some animals, however, mutations alter the pathogenicity and thus lead to a much more severe course of infection. In consequence feline infectious peritonitis (FIP) is erupted, which is often fatal. It is important to keep the burden of FCoV in cat populations at a low level and thus spill over of mutations can be limited. Therefore, virus shedding needs to be identified quickly and at an early stage of disease. The polymerase chain reaction (PCR) for the detection of FCoV in faeces is the gold standard, but PCR is time-consuming and requires a well-equipped laboratory. As an alternative, the isothermal method, reverse transcription-recombinase polymerase amplification (RT-RPA) provides a rapid and cost-effective alternative for the molecular detection of FCoV.

**Objective:** The aim of this study was to develop a rapid point-of-need test based on RT-RPA to detect FCoV.

**Material and methods:** Three forward, three reverse primers and one probe were designed targeting the highly conserved, untranslated region of the 7b gene. All possible nine combinations of the oligonucleotides were tested and the pair with the highest sensitivity was selected for further assay validation. Reverse transcription was performed, followed by DNA amplification and detection at a constant temperature of 42 °C, within 15 minutes. Analytical sensitivity was determined using a serial dilution of the molecular standard ( $10^3$  - $10^0$  RNA copies/  $\mu$ L) in nine replicates in the RT-RPA

and the detection limit was calculated with probit analysis. For cross-reaction, nucleic acid from 19 viruses were screened. Clinical performance was analysed using RNA from 39 feline faecal samples. All results were compared with real-time RT-PCR. The UTR of the 7b gene from one false negative and two true positive samples was sequenced and analysed using Geneious Prime.

**Results:** Probit analysis of the data set of nine RT-RPA runs with the molecular standard revealed a detection limit of 58.5 RNA copies/reaction. RT-RPA did not amplify the nucleic acid of 17 various pathogens of clinical importance, but samples for canine coronavirus and transmissible gastroenteritis virus were identified as positive. Comparing the real-time RT-PCR results of the 39 extracted faecal samples with the RT-RPA results showed a sensitivity and specificity of 90.9% and 100%, respectively. Sequencing did not reveal any sequence alteration in the target region of primers and probe.

**Conclusion:** RT-RPA has proven to be a rapid and effective measure for the detection of FCoV in extracted faecal samples. The easy handling of the RPA makes repeated testing possible to detect even the intermittent shedders. The use of the rapid test could thus contribute to the reduction of FCoV within cat populations.

## 7. Literaturverzeichnis

Abd El Wahed A, El-Deeb A, El-Tholoth M, Abd El Kader H, Ahmed A, Hassan S, Hoffmann B, Haas B, Shalaby MA and Hufert FT. A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *PLoS One*. 2013a; 8(8): e71642.

Abd El Wahed A, Patel P, Faye O, Thaloengsok S, Heidenreich D, Matangkasombut P, Manopwisedjaroen K, Sakuntabhai A, Sall AA and Hufert FT. Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of dengue infection. *PLoS One*. 2015a; 10(6): e0129682.

Abd El Wahed A, Patel P, Heidenreich D, Hufert FT and Weidmann M. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLOS Currents*. 2013b; 5.

Abd El Wahed A, Weidmann M and Hufert FT. Diagnostics-in-a-Suitcase: Development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus. *J. Clin. Virol*. 2015b; 69: 16-21.

Addie D and Jarrett O. Control of feline coronavirus infection in kittens. *Vet. Rec. Open*. 1990; 126(7).

Addie D and Jarrett O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet. Rec. Open*. 1992; 130(7): 133-137.

Addie D, Schaap I, Nicolson L and Jarrett O. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J. Gen. Virol*. 2003; 84(10): 2735-2744.

Addie D, Toth S, Murray G and Jarrett O. The risk of typical and antibody enhanced feline infectious peritonitis among cats from feline coronavirus endemic households. *Feline Pract*. 1995; 23(3): 24-26.

Addie DD, Covell-Ritchie J, Jarrett O and Fosbery M. Rapid Resolution of Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis Uveitis with an Oral Adenosine Nucleoside Analogue and Feline Interferon Omega. *Viruses*. 2020a; 12(11): 1216.

Addie DD, Curran S, Bellini F, Crowe B, Sheehan E, Ukrainchuk L and Decaro N. Oral Mutian@X stopped faecal feline coronavirus shedding by naturally infected cats. *Res. Vet. Sci*. 2020b; 130: 222-229.

Addie DD and Jarrett O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet. Rec. Open*. 2001; 148(21): 649-653.

Addie DD, Le Poder S, Burr P, Decaro N, Graham E, Hofmann-Lehmann R, Jarrett O, McDonald M and Meli ML. Utility of feline coronavirus antibody tests. *J. Feline Med. Surg*. 2015; 17(2): 152-162.

Addie DD, McDonald M, Audhuy S, Burr P, Hollins J, Kovacic R, Lutz H, Luxton Z, Mazar S and Meli ML. Quarantine protects Falkland Islands (Malvinas) cats from feline coronavirus infection. *J. Feline Med. Surg.* 2012; 14(2): 171-176.

An D-J, Jeoung H-Y, Jeong W, Park J-Y, Lee M-H and Park B-K. Prevalence of Korean cats with natural feline coronavirus infections. *Viol. J.* 2011; 8(1): 1-6.

André NM, Miller AD and Whittaker GR. Feline infectious peritonitis virus-associated rhinitis in a cat. *J. Feline Med. Surg.* 2020; 6(1): 2055116920930582.

Bank-Wolf BR, Stallkamp I, Wiese S, Moritz A, Tekes G and Thiel HJ. Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.* 2014; 173(3-4): 177-188.

Barker EN and Tasker S. Advances in Molecular Diagnostics and Treatment of Feline Infectious Peritonitis. *Adv. Small Ani. Care.* 2020; 1: 161-188.

Barker EN, Tasker S, Gruffydd-Jones TJ, Tuplin CK, Burton K, Porter E, Day MJ, Harley R, Fewes D, Helps CR and Siddell SG. Phylogenetic analysis of feline coronavirus strains in an epizootic outbreak of feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern Med.* 2013; 27(3): 445-450.

Barlough JE, Stoddart CA, Sorresso GP, Jacobson RH and Scott FW. Experimental inoculation of cats with canine coronavirus and subsequent challenge with feline infectious peritonitis virus. *Lab. Anim. Sci.* 1984; 34(6): 592-597.

Bartlett JM and Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. In. *A short history of the polymerase chain reaction.* Springer; 2003. 3-6.

Bell E, Malik R and Norris J. The relationship between the feline coronavirus antibody titre and the age, breed, gender and health status of Australian cats. *Aust. Vet. J.* 2006; 84(1-2): 2-7.

Benetka V, Kübber-Heiss A, Kolodziejek J, Nowotny N, Hofmann-Parisot M and Möstl K. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.* 2004; 99(1): 31-42.

Biogal Galed Laboratories Acs Ltd B. FELINE CORONAVIRUS (FCoV) [FIP] ANTIBODY TEST KIT. 2018 (zitiert vom 10.01.2022). <http://www.biogal.com/wp-content/uploads/2019/07/63FFP1021-1.pdf>.

Bogaerts W, De Heyn P, Van Vaerenbergh T, De Vos K, Kumar Selvaraja S, Claes T, Dumon P, Bienstman P, Van Thourhout D and Baets R. Silicon microring resonators. *Laser Photonics Rev.* 2012; 6(1): 47-73.

Bonney LC, Watson RJ, Afrough B, Mullojonova M, Dzhuraeva V, Tishkova F and Hewson R. A recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Crimean-Congo Haemorrhagic fever Virus infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(10): e0006013.

Bosch BJ, Zee Rvd, Haan CAMd and Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Viol. J.* 2003; 77(16): 8801-8811.

Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine.* 2007; 25(30): 5467-5484.

Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME and O'Brien SJ. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(9): 1445.

BVT-Virbac. Speed F-Corona; Rapid detection of anti-Feline Coronavirus antibodies. (zitiert vom 10.01.2022). <https://bvt.virbac.com/en/home/diagnostic-solutions/pour-le-veterinaire-praticien/infectious-diseases/main/gamme-speed/speed-f-corona.html>.

Cave TA, Golder MC, Simpson J and Addie DD. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *J. Feline Med. Surg.* 2004; 6(2): 53-58.

Chang H-W, de Groot RJ, Egberink HF and 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(2): 415-420.

Chang H-W, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ and Rottier PJ. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(7): 1089.

Christianson K, Ingersoll J, Landon R, Pfeiffer N and Gerber J. Characterization of a temperature sensitive feline infectious peritonitis coronavirus. *Arch. Virol.* 1989; 109(3-4): 185-196.

Daher RK, Stewart G, Boissinot M and Bergeron MG. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin. Chem.* 2016; 62(7): 947-958.

De Groot R, Baker S, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya A, Holmes K, Perlman S, Poon L, Rottier P and Talbot P. Book *Coronaviridae. Virus Taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Elsevier Academic Press; 2011.

De Groot RJ, Ter Haar RJ, Horzinek MC and Van Der Zeijst BA. Intracellular RNAs of the feline infectious peritonitis coronavirus strain 79-1146. *J. Gen. Virol.* 1987; 68(4): 995-1002.

Desmarests LM, Vermeulen BL, Theuns S, Conceição-Neto N, Zeller M, Roukaerts ID, Acar DD, Olyslaegers DA, Van Ranst M and Matthijnssens J. Experimental feline enteric coronavirus infection reveals an aberrant infection pattern and shedding of mutants with impaired infectivity in enterocyte cultures. *Sci. Rep.* 2016; 6(1): 1-11.

Diaz F. OIE Standard on principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Proceedings of the OIE Regional Workshop for OIE National Focal Points for Veterinary Products, Tokyo, Japan; 3-5.12.2014; Tokyo, Japan, World Organisation for Animal Health

Dickinson PJ, Bannasch M, Thomasy SM, Murthy VD, Vernau KM, Liepnieks M, Montgomery E, Knickelbein KE, Murphy B and Pedersen NC. Antiviral treatment using the adenosine nucleoside analogue GS-441524 in cats with clinically diagnosed neurological feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.* 2020; 34(4): 1587-1593.

Drechsler Y, Alcaraz A, Bossong FJ, Collisson EW and Diniz PPV. Feline coronavirus in multicat environments. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2011; 41(6): 1133-1169.

Dye C, Helps CR and 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(2): 167-174.

El Wahed AA, Patel P, Maier M, Pietsch C, Ruster D, Böhlken-Fascher S, Kissenkötter J, Behrmann O, Frimpong M and Diagne MM. Suitcase Lab for rapid detection of SARS-CoV-2 based on recombinase polymerase amplification assay. *Anal. Chem.* 2021; 93(4): 2627-2634.

Escutenaire S, Mohamed N, Isaksson M, Thoren P, Klingeborn B, Belak S, Berg M and Blomberg J. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Arch. Virol.* 2007; 152(1): 41-58.

Evermann J, Heeney J, Roelke M, McKeirnan A and O'Brien SJ. Biological and pathological consequences of feline infectious peritonitis virus infection in the cheetah. *Arch. Virol.* 1988; 102(3): 155-171.

Farrell Jr RE. *Book RNA Methodologies: laboratory guide for isolation and characterization.* San Diego: Academic Press; 2009.

Fassisi Veterinärdiagnostik und Umweltanalysen GmbH F. Fassisi ParCo. (zitiert vom 04.08.2021). <https://www.fassisi.de/produkte/kleintiere/hunde-katzen-parco/>.

Fehr D, Bolla S, Herrewegh AA, Horzinek MC and Lutz H. Detection of feline coronavirus using RT-PCR: basis for the study of the pathogenesis of feline infectious peritonitis (FIP). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1996; 138(2): 74-79.

Felten S, Klein-Richers U, Hofmann-Lehmann R, Bergmann M, Unterer S, Leutenegger CM and Hartmann K. Correlation of Feline Coronavirus Shedding in Feces with Coronavirus Antibody Titer. *Pathogens.* 2020; 9(8): 598.

Felten S, Matiasek K, Gruendl S, Sangl L, Wess G and Hartmann K. Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *J. Feline Med. Surg.* 2017; 19(4): 410-418.

Fish EJ, Diniz PPV, Juan YC, Bossong F, Collisson EW, Drechsler Y and 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(4): 295-301.

FLI SVa. Impfleitleinie für Kleintiere. 2021 (zitiert vom 07.02.2022).  
<https://www.fli.de/en/news/short-messages/short-message/aktuelle-impfempfehlungen-der-stiko-vet-fuer-kleintiere-und-wiederkaeuer/>.

Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, Poland A and Pedersen NC. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern Med.* 1998; 12(6): 415-423.

Foley JE, Poland A, Carlson J and Pedersen NC. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *J. Am. Vet. Med.* 1997a; 210(9): 1307-1312.

Foley JE, Poland A, Carlson J and Pedersen NC. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J. Am. Vet. Med.* 1997b; 210(9): 1313-1318.

Gamble DA, Lobbiani A, Gramegna M, Moore LE and Colucci G. Development of a nested PCR assay for detection of feline infectious peritonitis virus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(3): 673-675.

Gerber J. Overview of the development of a modified live temperature-sensitive FIP virus vaccine. *Feline Pract.* 1995.

Gerber JD, Ingersoll JD, Gast AM, Christianson KK, Selzer NL, Landon RM, Pfeiffer NE, Sharpee RL and Beckenhauer WH. Protection against feline infectious peritonitis by intranasal inoculation of a temperature-sensitive FIPV vaccine. *Vaccine.* 1990; 8(6): 536-542.

Gil S, Leal RO, Duarte A, McGahie D, Sepúlveda N, Siborro I, Cravo J, Cartaxeiro C and Tavares LM. Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. *Res. Vet. Sci.* 2013; 94(3): 753-763.

Giori L, Giordano A, Giudice C, Grieco V and Paltrinieri S. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *J. Small Anim. Pract.* 2011; 52(3): 152-157.

Groß U, Roos T and Friese K. Toxoplasmose in der Schwangerschaft. *Dtsch. Arztebl.* 2001; 98(49): 3293-3301.

Gruendl S, Matiasek K, Matiasek L, Fischer A, Felten S, Jurina K and 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(6): 576-585.

Guan X, Li H, Han M, Jia S, Feng B, Gao X, Wang Z, Jiang Y, Cui W, Wang L and Xu Y. Epidemiological investigation of feline infectious peritonitis in cats living in Harbin, Northeast China from 2017 to 2019 using a combination of an EvaGreen-based real-time RT-PCR and serum chemistry assays. *Mol. Cell. Probes.* 2020; 49: 101495.

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(3): 193-205.

Gunther S, Felten S, Wess G, Hartmann K and Weber K. Detection of feline Coronavirus in effusions of cats with and without feline infectious peritonitis using loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 2018; 256: 32-36.

Günther S, Felten S, Wess G, Hartmann K and Weber K. Detection of feline Coronavirus in effusions of cats with and without feline infectious peritonitis using loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 2018; 256: 32-36.

Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC and Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J. Virol. Methods.* 1999; 77(1): 37-46.

Haijema BJ, Volders H and Rottier PJ. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *Virol. J.* 2004; 78(8): 3863-3871.

Hansen S, Roller M, Alslim L, Böhlken-Fascher S, Fechner K, Czerny C-P and Abd El Wahed A. Development of rapid extraction method of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis DNA from bovine stool samples. *Diagnostics.* 2019; 9(2): 36.

Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2005; 35(1): 39-79.

Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A, Egberink HF, Horzinek MC and 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(3): 684-689.

Herrewegh AA, Mahler M, Hedrich HJ, Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ and de Groot RJ. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virol. J.* 1997; 234(2): 349-363.

Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, Frost J, Lutz H and Kraft W. Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis. *Tierarztl. Prax.* 1995; 23(1): 92-99.

Hohdatsu T, Izumiya Y, Yokoyama Y, Kida K and Koyama H. Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch. Virol.* 1998; 143(5): 839-850.

Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S and VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science.* 1982; 215(4540): 1577-1585.

- Holst BS, Englund L, Palacios S, Renström L and Berndtsson LT. Prevalence of antibodies against feline coronavirus and *Chlamydomonas felis* in Swedish cats. *J. Feline Med. Surg.* 2006; 8(3): 207-211.
- Holzworth J. Some important disorders of cats. *Cornell Vet.* 1963; 53: 157-160.
- Hornyak A, Balint A, Farsang A, Balka G, Hakhverdyan M, Rasmussen TB, Blomberg J and Belak S. Detection of subgenomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer-probe energy transfer (P-sg-QPCR). *J. Virol. Methods.* 2012; 181(2): 155-163.
- Horsburgh BC, Brierley I and Brown TDK. Analysis of a 9.6 kb sequence from the 3' end of canine coronavirus genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 1992; 73(11): 2849-2862.
- Horzinek MC, Lutz H and Pedersen NC. Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline, and canine coronaviruses. *Infect. Immun.* 1982; 37(3): 1148-1155.
- Hoskins J, Henk W, Storz J and Kearney M. The potential use of a modified live FIPV vaccine to prevent experimental FECV infection. *Feline Pract.* 1995.
- Hu H, Jung K, Wang Q, Saif LJ and Vlasova AN. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian fecal samples. *J. Virol. Methods.* 2018; 256: 116-122.
- Jaimes JA and Whittaker GR. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virol. J.* 2018; 517: 108-121.
- Kass P and Dent T. The epidemiology of feline infectious peritonitis in catteries. *Feline Pract.* 1995.
- Kennedy M, Citino S, McNabb AH, Moffatt AS, Gertz K and Kania S. Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002; 14(6): 520-522.
- Kennedy M, Kania S, Stylianides E, Bertschinger H, Keet D and van Vuuren M. Detection of feline coronavirus infection in southern African nondomestic felids. *J. Wildl. Dis.* 2003; 39(3): 529-535.
- Kennedy MA, Brenneman K, Millsaps RK, Black J and Potgieter LND. Correlation of Genomic Detection of Feline Coronavirus with Various Diagnostic Assays for Feline Infectious Peritonitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10(1): 93-97.
- King AM, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adams MJ, Dutilh BE, Gorbalenya AE, Harrach B, Harrison RL, Junglen S and Knowles NJ. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Arch. Virol.* 2018; 163(9): 2601-2631.

Kipar A, Baptiste K, Barth A and Reinacher M. Natural FCoV infection: Cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *J. Feline Med. Surg.* 2006; 8(1): 69-72.

Kipar A, Kremendahl J, Addie DD, Leukert W, Grant CK and Reinacher M. Fatal enteritis associated with coronavirus infection in cats. *J. Comp. Pathol.* 1998; 119(1): 1-14.

Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ and Lutz H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt 7): 1698-1707.

Kiss I, Kecskeméti S, Tanyi J, Klingeborn B and Belák S. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. *Vet. J.* 2000; 159(1): 64-70.

Klein-Richers U, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Unterer S, Bergmann M, Rieger A, Leutenegger C, Pantchev N, Balzer J and Felten S. Prevalence of feline coronavirus shedding in German Catteries and associated risk factors. *Viruses.* 2020; 12(9): 1000.

Koo B, Jin CE, Park SY, Lee TY, Nam J, Jang YR, Kim SM, Kim JY, Kim SH and Shin Y. A rapid bio-optical sensor for diagnosing Q fever in clinical specimens. *J. Biophotonics.* 2018; 11(4): e201700167.

Koo KM, Wee EJ and Trau M. Colorimetric TMPRSS2-ERG gene fusion detection in prostate cancer urinary samples via recombinase polymerase amplification. *Theranostics.* 2016; 6(9): 1415.

Levy J, Crawford P, Lappin M, Dubovi E, Levy M, Alleman R, Tucker S and Clifford E. Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos. *J. Vet. Intern Med.* 2008; 22(1): 60-65.

Li J, Macdonald J and von Stetten F. a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst.* 2018; 144(1): 31-67.

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(1): 65-77.

Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE and Whittaker GR. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(7): 1066.

Liljander A, Yu M, O'Brien E, Heller M, Nepper JF, Weibel DB, Gluecks I, Younan M, Frey J and Falquet L. Field-applicable recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(9): 2810-2815.

McArdle F, Tennant B, Bennett M, Kelly D, Gaskell C and Gaskell R. Independent evaluation of a modified live FIPV vaccine under experimental conditions (University of Liverpool experience). *Feline Pract.* 1995.

Meli M, Kipar A, Müller C, Jenal K, Gönczi E, Borel N, Gunn-Moore D, Chalmers S, Lin F and Reinacher M. 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. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2004a; 6(2): 69-81.

Meli M, Kipar A, Müller C, Jenal K, Gönczi E, Borel N, Gunn-Moore D, Chalmers S, Lin F, Reinacher M and 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.* 2004b; 6(2): 69-81.

Meli ML, Burr P, Decaro N, Graham E, Jarrett O, Lutz H, McDonald M and Addie DD. Samples with high virus load cause a trend toward lower signal in feline coronavirus antibody tests. *J. Feline Med. Surg.* 2013; 15(4): 295-299.

Muirden A. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. *Vet. Rec. Open*. 2002; 150(20): 621-625.

Murphy BG, Perron M, Murakami E, Bauer K, Park Y, Eckstrand C, Liepnieks M and Pedersen NC. The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies. *Vet. Microbiol.* 2018; 219: 226-233.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N and Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12): e63-e63.

Parodi MC, Cammarata G, Paltrinieri S, Lavazza A and Ape F. Using direct immunofluorescence to detect coronaviruses in peritoneal in peritoneal and pleural effusions. *J. Small Anim. Pract.* 1993; 34(12): 609-613.

Pastoret P-P and Henroteaux M. Epigenetic transmission of feline infectious peritonitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1978; 1(1-2): 67-70.

Pearson J. Regulatory constraints for the transport of samples and compliance with the World Organisation for Animal Health (OIE) standards for biosecurity and biocontainment. *Dev. Biol. Stand.* 2007; 128: 59-68.

Pearson M, LaVoy A, Evans S, Vilander A, Webb C, Graham B, Musselman E, LeCureux J, VandeWoude S and Dean GA. Mucosal immune response to feline enteric coronavirus infection. *Viruses.* 2019; 11(10): 906.

Pedersen N. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.* 1976; 37(12): 1449-1453.

Pedersen N. An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Feline Pract.* 1995.

Pedersen N, Boyle J and Floyd K. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am. J. Vet. Res.* 1981a; 42(3): 363-367.

Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J. Feline Med. Surg.* 2009; 11(4): 225-258.

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *Vet. J.* 2014; 201(2): 123-132.

Pedersen NC, Allen CE and Lyons LA. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J. Feline Med. Surg.* 2008; 10(6): 529-541.

Pedersen NC, Black JW, Boyle JF, Evermann JF, McKeirnan AJ and Ott RL. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. In: *Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates.* Springer; 1984. 365-380.

Pedersen NC, Boyle J, Floyd K, Fudge A and Barker J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.* 1981b; 42(3): 368-377.

Pedersen NC, Liu H, Dodd KA and Pesavento PA. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses.* 2009; 1(2): 166-184.

Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H and 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(1): 17-28.

Pedersen NC, Perron M, Bannasch M, Montgomery E, Murakami E, Liepnieks M and Liu H. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. *J. Feline Med. Surg.* 2019; 21(4): 271-281.

Pedersen NC, Sato R, Foley JE and Poland AM. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *J. Feline Med. Surg.* 2004; 6(2): 83-88.

Pedersen NC, Ward J and Mengeling W. Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species. *Arch. Virol.* 1978; 58(1): 45-53.

Posch AM. Book *Feline Coronaviren: Differenzierung der Typen I und II mittels RT-PCR und deren Vorkommen in österreichischen Katzenpopulationen.* na; 2001.

Powell ML, Bowler FR, Martinez AJ, Greenwood CJ, Armes N and Piepenburg O. New Fpg probe chemistry for direct detection of recombinase polymerase amplification on lateral flow strips. *Anal. Biochem.* 2018; 543: 108-115.

Ritz S, Egberink H and Hartmann K. Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; 21(6): 1193-1197.

Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, Tucker SJ, Greiner EC and Leutenegger CM. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J. Am. Vet. Med.* 2012; 241(3): 331-337.

Sangl L, Felten S, Matiasek K, Dörfelt S, Bergmann M, Balzer HJ, Pantchev N, Leutenegger C and Hartmann K. Detection of feline coronavirus RNA, spike gene mutations, and feline coronavirus antigen in macrophages in aqueous humor of cats in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2020; 32(4): 527-534.

Sangl L, Matiasek K, Felten S, Grundl S, Bergmann M, Balzer HJ, Pantchev N, Leutenegger CM and Hartmann K. Detection of feline coronavirus mutations in paraffin-embedded tissues in cats with feline infectious peritonitis and controls. *J. Feline Med. Surg.* 2019; 21(2): 133-142.

Schlücker S. Surface-Enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014; 53(19): 4756-4795.

Scott F, Corapi W and Olsen C. Evaluation of the safety and efficacy of Primucell-FIP vaccine. *Feline Health Topics.* 1992; 7(3): 6-8.

Scott FW. Update on FIP. *Proceedings of the 12th Kal Kan Symposium.* 1988: 43-47.

Shalaby MA, El-Deeb A, El-Tholoth M, Hoffmann D, Czerny C-P, Hufert FT, Weidmann M and Abd El Wahed A. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of lumpy skin disease virus. *BMC Vet. Res.* 2016; 12(1): 1-6.

Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA and Hafidz MA. Prevalence of feline coronavirus in two cat populations in Malaysia. *J. Feline Med. Surg.* 2009; 11(12): 1031-1034.

Simons FA, Vennema H, Rofina JE, Pol JM, Horzinek MC, Rottier PJ and Egberink HF. A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J. Virol. Methods.* 2005; 124(1-2): 111-116.

Stoddart CA and Scott FW. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *Virol. J.* 1989; 63(1): 436-440.

Stoddart M, Gaskell R, Harbour D and Gaskell C. Virus shedding and immune responses in cats inoculated with cell culture-adapted feline infectious peritonitis virus. *Vet. Microbiol.* 1988; 16(2): 145-158.

Stranieri A, Lauzi S, Giordano A and Paltrinieri S. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus. *J. Virol. Methods.* 2017; 243: 105-108.

Stranieri A, Probo M, Pisu MC, Fioletti A, Meazzi S, Gelain ME, Bonsembiante F, Lauzi S and 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.* 2020; 22(2): 178-185.

Taharaguchi S, Soma T and Hara M. Prevalence of feline coronavirus antibodies in Japanese domestic cats during the past decade. *J. Vet. Med. Sci.* 2012; 74(10): 1355-1358.

tamaVet-nal von minden GmbH. tamaVet® Schnelltests für Katzen - Coronavirus. 2022 (zitiert vom 04.08.2021). <https://www.tamavet-diagnostics.com/produkte/schnelltests/katze>.

Techangamsuwan S, Radtanakantikanon A and Thanawongnuwech R. Development and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for feline coronavirus detection. *TJVM.* 2013; 43(2): 229.

Terada Y, Matsui N, Noguchi K, Kuwata R, Shimoda H, Soma T, Mochizuki M and Maeda K. Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One.* 2014; 9(9): e106534.

Tresnan DB and Holmes KV. Feline aminopeptidase N is a receptor for all group I coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 440: 69-75.

TwistDx. TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual. (zitiert vom 04.08.2021). <https://www.twistdx.co.uk>.

Van Hamme E, Desmarests L, Dewerschin HL and Nauwynck HJ. Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. *Virus Res.* 2011; 160(1-2): 32-39.

Vennema H, Heijnen L, Rottier PJ, Horzinek MC and Spaan WJ. A novel glycoprotein of feline infectious peritonitis coronavirus contains a KDEL-like endoplasmic reticulum retention signal. *Virology.* 1992; 66(8): 4951-4956.

Vennema H, Poland A, Foley J and Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology.* 1998; 243(1): 150-157.

Vennema H, Poland A, Hawkins KF and Pedersen N. A comparison of the genomes of FECVs and FIPVs and what they tell us about the relationships between feline coronaviruses and their evolution. *Feline Pract.* 1995.

Vermeulen BL, Devriendt B, Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Desmarests LM, Favoreel HW, Dewerschin HL and Nauwynck HJ. Suppression of NK cells and regulatory T lymphocytes in cats naturally infected with feline infectious peritonitis virus. *Vet. Microbiol.* 2013; 164(1-2): 46-59.

Vogel L, Van der Lubben M, Te Lintelo EG, Bekker CP, Geerts T, Schuijff LS, Grinwis GC, Egberink HF and Rottier PJ. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Vet. Res.* 2010; 41(5): 71.

Wang J, Koo KM, Wee EJ, Wang Y and Trau M. A nanoplasmonic label-free surface-enhanced Raman scattering strategy for non-invasive cancer genetic subtyping in patient samples. *Nanoscale*. 2017; 9(10): 3496-3503.

Ward JM. Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis. *Viol. J.* 1970; 41(1): 191.

Wee E, Lau H, Botella J and Trau M. Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings. *Chem. Commun.* 2015; 51(27): 5828-5831.

Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T and Seeber F. Prevalence, incidence estimations and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci. Rep.* 2016; 6(1): 1-9.

Zook B, King N, Robison R and McCombs H. Ultrastructural evidence for the viral etiology of feline infectious peritonitis. *Pathol. Vet.* 1968; 5(1): 91-95.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammbaum der Ordnung Nidovirales mit Fokus auf dem Felinen Coronavirus nach ICTV.	3
Abbildung 2: Das FCoV mit seinen einzelnen Strukturproteinen nach (BARKER and TASKER 2020).	4
Abbildung 3: Das Genom des Felinen Coronavirus mit seinen ca. 30.000 Basen nach (ADDIE and JARRETT 2001).	5
Abbildung 4: Abbildung der verfügbaren Antikörper-Tests für FCoV nach (BVT-VIRBAC, ADDIE et al. 2015, BIOGAL GALED LABORATORIES ACS LTD 2018)	15
Abbildung 5: Abbildung des direkten Erregernachweises mittels A Immunzytochemie/Immunhistochemie und B Immunfluoreszenz nach (PARODI et al. 1993, FELTEN et al. 2017)	17
Abbildung 6: Abbildung des Verfahrens der Immunchromatographie basierend auf (FASSISI VETERINÄRDIAGNOSTIK UND UMWELT-ANALYSEN GMBH, TAMAVET-NAL VON MINDEN GMBH)	18
Abbildung 7: Abbildung eines Amplifikationszyklus mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	21
Abbildung 8: Ablauf eines Amplifikations-Zyklus mittels Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) nach (LI et al. 2018)	23

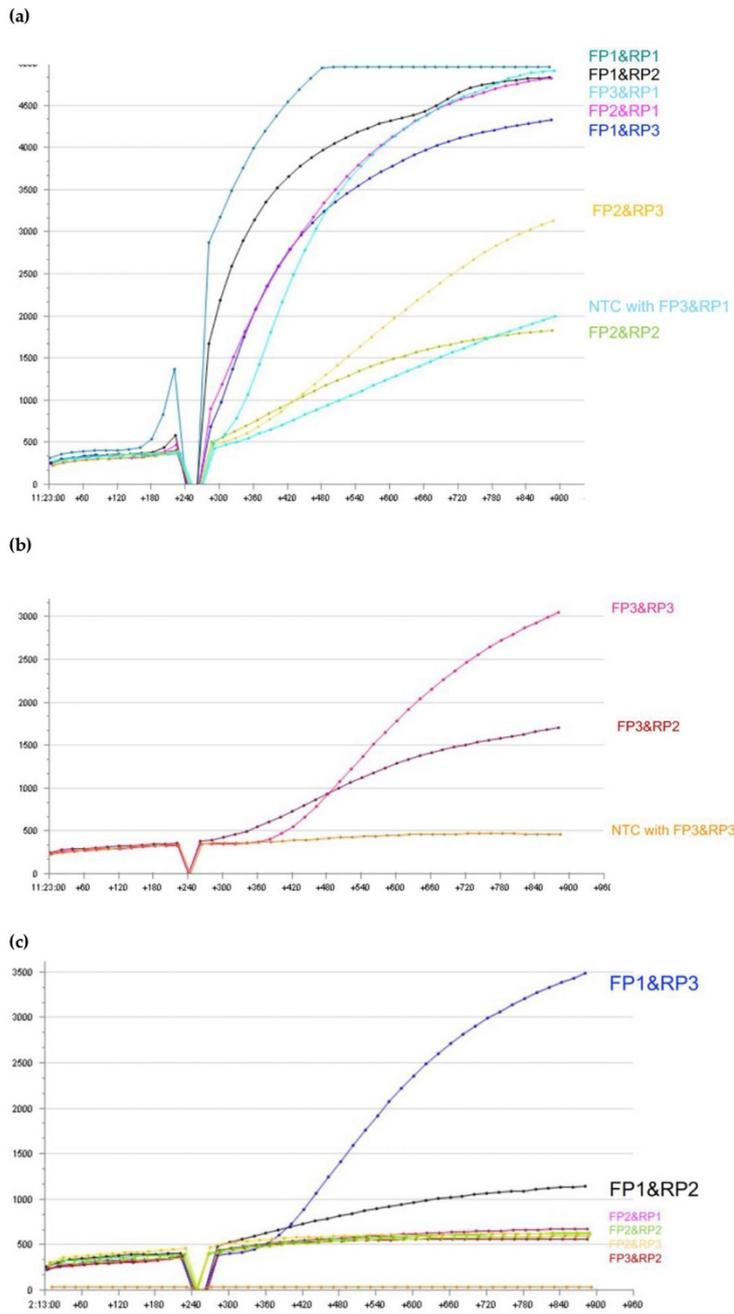
## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studien über verschiedene RT-PCR mit jeweiligem Ziel-Gen zum Nachweis von FCoV in unterschiedlichem Probenmaterial.	19-20
--	-------

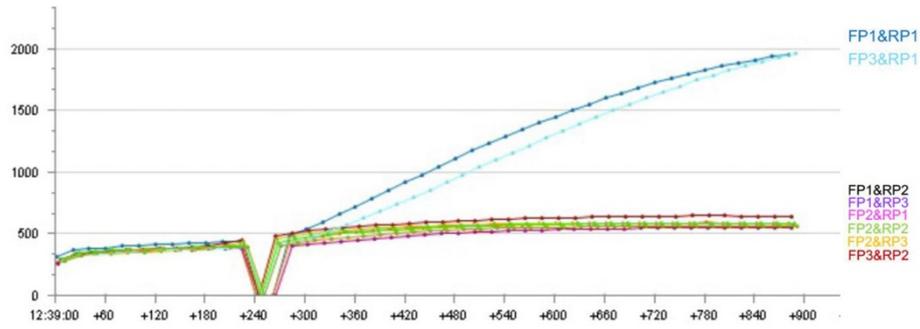
## 10. Anhang

**Table S1.** Summary of all samples tested. Results are shown in Cycle Threshold (Ct) for real-time RT-PCR and Time Threshold (TT,sec.) for RT-RPA.

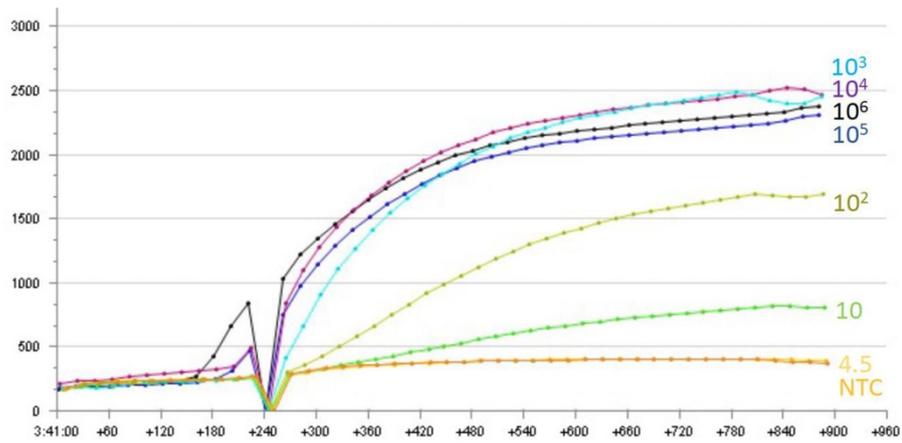
<i>cat</i>	<i>sample</i>	<i>real-time RT-PCR (Ct)</i>	<i>RT-RPA (TT)</i>
1	faecal	20.09	340
2	faecal	24.67	320
3	faecal	28.95	280
4	faecal	28.00	280
5	faecal	24.25	280
6	faecal	34.14	280
7	faecal	30.75	280
8	faecal	23.01	280
9	faecal	29.24	280
10	faecal	27.56	280
11	faecal	23.63	280
12	faecal	28.85	280
13	faecal	33.51	200
14	faecal	24.46	180
15	faecal	19.58	180
16	faecal	19.85	160
17	faecal	19.29	160
18	faecal	19.90	140
19	faecal	19.65	140
20	faecal	16.93	120
21	faecal	35.02	-
22	faecal	27.27	-
23	faecal	No Ct	-
24	faecal	No Ct	-
25	faecal	No Ct	-
26	faecal	No Ct	-
27	faecal	No Ct	-
28	faecal	No Ct	-
29	faecal	No Ct	-
30	faecal	No Ct	-
31	faecal	No Ct	-
32	faecal	No Ct	-
33	faecal	No Ct	-
34	faecal	No Ct	-
35	faecal	No Ct	-
36	faecal	No Ct	-
37	faecal	No Ct	-
38	faecal	No Ct	-
39	faecal	No Ct	-



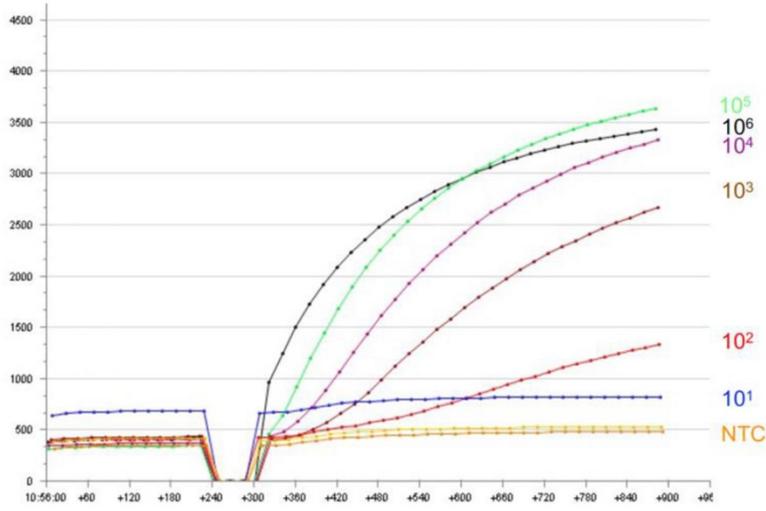
**Figure S1.** Amplifications curves of RT-RPA testing different primer combinations to achieve the highest sensitivity of the RT-RPA assay. (a&b) Molecular standard  $10^5$  copies/  $\mu$ L and (c) molecular standard  $10^2$  copies/  $\mu$ L were used as template.



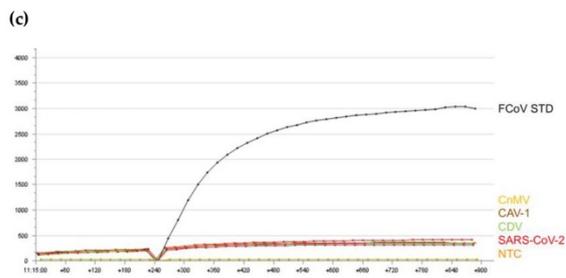
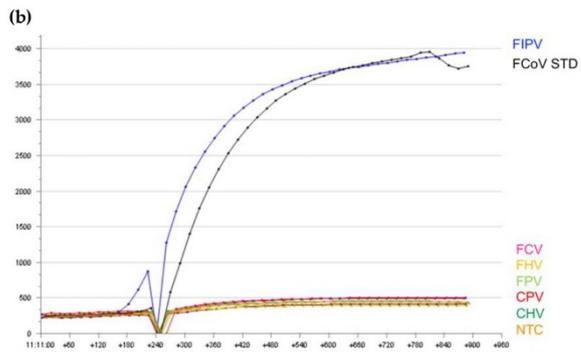
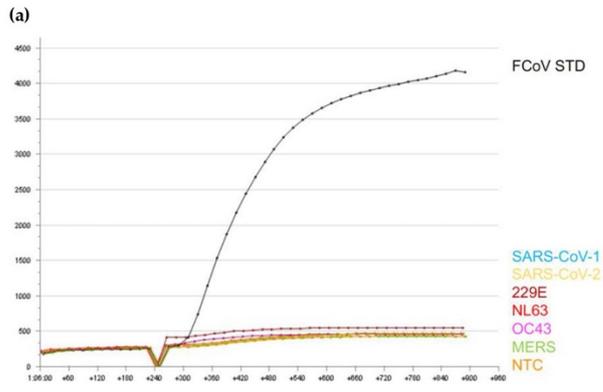
**Figure S2.** Amplification curves of the different primer combinations using molecular water as a template for control of unspecific fluorescence signal.

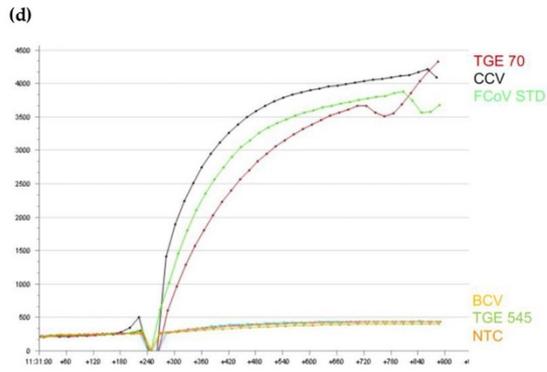


**Figure S3.** Amplification curves of RT-RPA using an extracted faecal sample spiked with serial dilution of extracted RNA of feline coronavirus supernatant from cell culture. Negative template control (NTC) is molecular biology water.

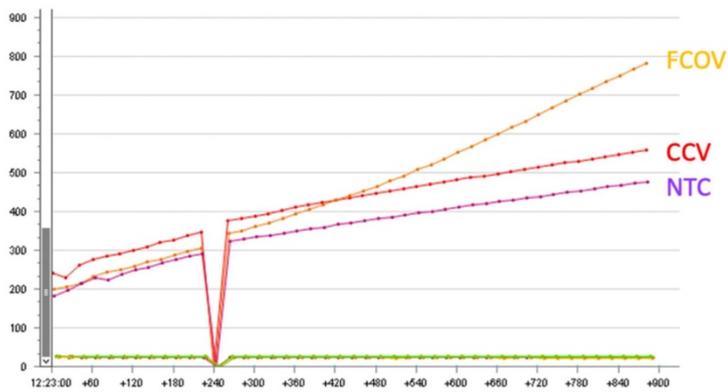


**Figure S4.** Amplifications curves of RT-RAA runs using primer FP1 and RP3 designed in this study with the molecular standard dilution range ( $10^6$  to  $10^1$  copies/  $\mu$ L).





**Figure S5.** Amplifications curves of RT-RPA runs with DNA/RNA of 19 viruses extracted from cell culture that were tested in order to determine the cross-detection of the assay.



**Figure S6.** Amplifications curves of RPA runs using primer and probes published in “Development of a recombinase polymerase amplification fluorescence assay to detect feline coronavirus” Hu et al. with extracted RNA of feline coronavirus and canine coronavirus supernatant from cell culture.



**Figure S7.** Alignment of FP1, RP3 and ExoProbe with the genome sequences of different strains of (a) FCoVs and (b) FIPVs. The alignment was created with Geneious Prime. The ID is the GenBank accession number.

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Truyen für die hervorragende Betreuung bedanken. Außerdem gilt mein besonderer Dank Dr. Ahmed Abd El Wahed, für seine inspirierende Freude an der Arbeit, seine unerschöpfliche Geduld und die beste Unterstützung, die man sich nur wünschen kann. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Hartmann und Dr. Michelle Bergmann für die Anregungen bei der Anfertigung meiner Publikation bedanken.

Vielen lieben Dank auch an das Team des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen für die familiäre Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei allen neuen Herausforderungen. Ganz besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang meiner Kollegin und Freundin Arianna für die wundervolle Zusammenarbeit.

Herzlicher Dank gilt natürlich auch meiner Familie, meinen Freunden und meiner Wg, die meine Launen ertragen mussten und mich trotzdem immer unterstützt haben.