

**UNTERSUCHUNG ZU VORKOMMEN UND
BEDEUTUNG LATENTER INFEKTIONEN
MIT DEM FELINEN LEUKÄMIEVIRUS (FeLV)
BEI SEKTIONSKATZEN**

MICHAEL SUNTZ

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Untersuchung zu Vorkommen und Bedeutung latenter
Infektionen mit dem Feline Leukämievirus (FeLV) bei
Sektionskatzen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MICHAEL SUNTZ

Tierarzt aus Heidelberg

Gießen 2007

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Moritz

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2007

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Feline Retroviren und endogene retrovirale Elemente	2
2.2. FeLV	4
2.2.1. Geschichte	4
2.2.2. Klassifikation	5
2.2.3. Virusmorphologie, Genomorganisation	6
2.2.4. Replikation	6
2.2.4.1. Adsorption	7
2.2.4.2. Penetration und Uncoating	8
2.2.4.3. Reverse Transkription und Integration	9
2.2.4.4. Virusproteinproduktion, Assembly, Freisetzung, Reifung	11
2.3. FeSV	12
2.4. Infektionsverlauf und Pathogenese der FeLV-Infektion	13
2.5. Immunität	15
2.6. Virusnachweis	17
2.7. Prävalenz der produktiven FeLV-Infektion	20
2.8. Pathologie der produktiven FeLV-Infektion	21
2.8.1. Allgemeines	21
2.8.2. Neoplasien	22
2.8.2.1. Leukose-Komplex	22
2.8.2.2. Andere Tumoren	23
2.8.3. FeLV-assoziierte Erkrankungen	23
2.8.4. FeLV-induzierte Immunsuppression	24
2.9. Latente FeLV-Infektionen	26
2.9.1. Definition	26
2.9.2. Epidemiologie, Zielzellen der latenten Infektion	26
2.9.3. Pathogenese	28
2.9.4. Erkrankungen im Zusammenhang mit der latenten FeLV-Infektion	29
2.9.5. Mögliche Latenz-Mechanismen	31

3. Material und Methoden	33
3.1. Sektionskatzen	33
3.2. Sektion	33
3.3. Probenentnahme und –aufbereitung	34
3.3.1 Proben für die immunhistologische Untersuchung auf das Vorliegen einer FeLV-Infektion	34
3.3.1.1. Sektionskatzen	34
3.3.1.2. Immunhistologische Kontrollen	35
3.3.2. Proben für die DNS-Aufbereitung	36
3.3.2.1. Knochenmark (Sektionskatzen)	36
3.3.2.2. Molekularbiologische Kontrollen	36
3.3.2.2.1. Negativkontrolle	36
3.3.2.2.2. Positivkontrolle	37
3.3.2.2.2.1. Kultivierung der FL74-Zellen	37
3.4. FeLV-Immunhistologie	38
3.4.1. Nachweis von gp70 und p27	38
3.4.2. Auswertung der FeLV-Immunhistologie	41
3.5. DNS-Extraktion	42
3.5.1. DNS-Extraktion aus Gewebe	42
3.5.2. DNS-Extraktion aus blutreichem Knochenmark	44
3.5.3. DNS-Extraktion aus Zellkultur	44
3.6. PCR	45
3.6.1. Herstellung des DEPC-Wassers für die molekularen biologischen Untersuchungen	45
3.6.2. Desoxytrinukleotidtrisphosphate als Grundbausteine der PCR	45
3.6.3. PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNS (gp70-PCR)	45
3.6.3.1. Primersequenzen und –verdünnung	46
3.6.3.2. PCR-Ansatz für die gp70-PCR	47
3.6.3.2.1. Mastermix	47
3.6.3.2.2. Kontrollen und Proben	47
3.6.3.3. PCR-Zyklus und Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese	48

3.6.3.3.1.	PCR-Zyklus	48
3.6.3.3.2.	Agarosegelelektrophorese und Auswertung	48
3.6.4.	PCR zum Nachweis der FeLV-Infektion (U3-PCR)	49
3.6.4.1.	Primersequenzen und –verdünnung (1.Reaktion)	50
3.6.4.2.	PCR-Ansatz für die U3-PCR (1.Reaktion)	51
3.6.4.3.	Kontrollen und Proben	52
3.6.4.4.	PCR-Zyklus (1.Reaktion) und Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese	52
3.6.4.4.1.	PCR-Zyklus (1.Reaktion)	52
3.6.4.4.2.	Agarosegelelektrophorese und Auswertung	52
3.6.4.5.	Primersequenz und –verdünnung (2.Reaktion)	53
3.6.4.6.	PCR-Ansatz für die U3-PCR (2.Reaktion)	53
3.6.4.7.	Kontrollen und Proben	53
3.6.4.8.	PCR-Zyklus (2.Reaktion) und Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese	54
3.6.4.8.1.	PCR-Zyklus (2.Reaktion)	54
3.6.4.8.2.	Agarosegelelektrophorese und Auswertung	55
3.7.	Klonierung und Sequenzierung	55
3.7.1.	Klonierung	55
3.7.1.1.	dATP-, „Tailing“-Reaktion	55
3.7.1.2.	Herstellung des Nährmediums und des Nährbodens	56
3.7.1.3.	Klonierungsreaktion und Transformation, Beimpfen der Nährböden	56
3.7.1.4.	Koloniescreening (Analyse der selektierten Klone) und Animpfen der Flüssigkulturen	58
3.7.1.5.	Präparation der Plasmid-DNS für die Sequenzierung, PCR-Screening der isolierten Plasmid-DNS	58
3.7.1.5.1.	Plasmid-Präparation	58
3.7.1.5.2.	Screening-PCR zur Analyse der isolierten Plasmid-DNS	60
3.7.2.	Messung der Plasmid-DNS-Konzentration, Sequenzierung	61
3.8.	Bestimmung der Sensitivität der U3-PCR-Reaktion, Test auf Eignung in der Erfassung latenter FeLV-Infektionen	62
3.8.1.	Sensitivitätsbestimmung	62
3.8.2.	Test auf Eignung in der Erfassung latenter FeLV-Infektionen	62

3.9.	Statistische Analyse	63
3.9.1	Datenaufbereitung	63
3.9.2.	Auswertung	63
4. Ergebnisse		66
4.1.	Klonierung und Sequenzierung	66
4.1.2.	Koloniescreening und Überprüfung der Plasmid-DNS	66
4.1.3.	Primerscreening und Sequenzierung	66
4.2.	Sensitivitätsanalyse	67
4.3.	Ergebnis der U3-PCR bei experimentell FeLV-infizierten Katzen	68
4.4.	Prävalenz der FeLV-Infektion	68
4.4.1.	Immunhistologische Ergebnisse	68
4.4.2.	Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktionen	68
4.4.2.1.	gp70-PCR	68
4.4.2.2.	U3-PCR	69
4.4.3.	Statistische Auswertung	70
4.4.3.1.	Alter der Tiere	70
4.4.3.2.	Rasse	72
4.4.3.3.	Herkunft und Haltungsbedingungen	72
4.4.3.4.	Geschlecht	74
4.4.3.5.	Erhaltungszustand der Tierleichen/DNS-Qualität	75
4.4.3.6.	Erkrankungen im Zusammenhang mit der produktiven FeLV-Infektion	76
4.4.3.6.1.	Allgemeindiagnosen, organübergreifende Diagnosen, Neoplasien	76
4.4.3.6.2.	Organspezifische Diagnosen	76
4.4.3.7.	Erkrankungen im Zusammenhang mit der latenten FeLV-Infektion	77
4.4.3.7.1.	Allgemeindiagnosen, organübergreifende Diagnosen, Neoplasien	77
4.4.3.7.1.1.	Unklare Erkrankungs- oder Todesursache	77
4.4.3.7.1.2.	Anämie	78
4.4.3.7.1.3.	Neoplasien	79
4.4.3.7.1.4.	Missbildungen	80

4.4.3.7.1.5.	Feline Infektiöse Peritonitis (FIP)	80
4.4.3.7.1.6.	Feline Panleukopenie	80
4.4.3.7.1.7.	Sepsis	81
4.4.3.7.1.8.	Trauma	81
4.4.3.7.1.9.	Eitrige Entzündungen	82
4.4.3.7.2.	Aetiologische Diagnosen	82
4.4.3.7.2.1.	Nichtvirale Infektionen	82
4.4.3.7.2.1.1	Bakterielle Infektion	83
4.4.3.7.2.1.2.	Parasitosen	83
4.4.3.7.2.1.3	Mykosen	84
4.4.3.7.2.2.	Virusinfektionen	84
4.4.3.7.3.	Organspezifische Diagnosen	84
4.4.3.7.3.1.	Leber	84
4.4.3.7.3.2.	Niere und harnableitende Wege	85
4.4.3.7.3.3.	Lunge	85
4.4.3.7.3.4.	Nervensystem	86
4.4.3.7.3.5.	Magen-Darmtrakt	86
4.4.3.7.3.6.	Geschlechtsorgane	87
4.4.3.7.3.7.	Augen	87
4.4.3.7.3.8.	Ohren	87
4.4.3.7.3.9.	Haut/Unterhaut	87
4.4.3.7.3.10.	Pankreas	88
4.4.3.7.3.11.	Thymus	88
4.4.3.7.3.12.	Lymphknoten	88
4.4.3.7.3.13.	Milz	89
4.4.3.7.3.14.	Körperhöhlen	89
4.4.3.7.3.15.	Herz	90
4.4.3.7.3.16.	Gefäße	90
4.4.3.7.3.17.	Thyreoidea	90
4.4.3.7.3.18.	Bewegungsapparat	91
4.4.3.8.	Übersichtstabellen	92

5. Diskussion	95
5.1. Material und Methoden	95
5.2. Auswertung	101
6. Zusammenfassung/Summary	125
6.1. Zusammenfassung	125
6.2. Summary	127
7. Literaturverzeichnis	129
8. Anhang	165
8.1. Bezugsquellen für Chemikalien, Geräte, Einmalartikel und Kits	165
8.2. Lösungen und Puffer	171
8.2.1. Gelelektrophoretische Detektion der PCR-Produkte	171
8.2.2. Klonierung	172
8.2.3. Immunhistologie	173
8.2.4. Gewebekultur	174
9. Abbildungen	175
10. Abkürzungsverzeichnis	180

1. Einleitung

Die Erstbeschreibung des Feline Leukämievirus (FeLV) geht auf das Jahr 1964 zurück. Jarrett und Mitarbeitern gelang es mit dem Extrakt aus einem Lymphosarkom, in dem sie Viruspartikel vermuteten, Katzenwelpen zu infizieren, die daraufhin in ähnlicher Weise erkrankten (Jarrett et al., 1964b; Jarrett et al., 1964a)

Seit dieser Entdeckung spielt das Feline Leukämievirus eine bedeutende Rolle sowohl in der veterinär- als auch in der humanmedizinischen Forschung (Jarrett, 1991; Rohn et al., 1996; Sparkes, 2003).

Auf die Entdeckung des Virus hin angestrengte Studien zeigten, dass das FeLV neben Erkrankungen des Leukosekomplexes für ein breites Spektrum sogenannter FeLV-assoziiierter Erkrankungen verantwortlich ist, die zahlenmäßig deutlich im Vordergrund stehen (Cotter et al., 1975; Hardy et al., 1976; Reinacher und Theilen, 1987; Reinacher et al., 1995; Wittmer, 1993). Insgesamt gesehen handelt es sich um eine sehr häufige tödliche Infektionserkrankung bei Hauskatzen. Reinacher und Theilen (1987) ermittelten bei Sektionskatzen immunhistologisch eine Prävalenz von durchschnittlich 16,2 % infizierten Katzen, wobei sie bei durch Trauma verstorbenen Tieren, die als Vergleichspopulation dienten, 3,2 % FeLV-positive Tiere ausmachten.

Bedeutung für die Humanmedizin erlangte das Virus durch seinen Modellcharakter im Hinblick auf virale Karzinogenese und die retrovirusinduzierte Immunsuppression (Rohn et al., 1996)

Retroviren besitzen eine besonders faszinierende Eigenschaft. Durch Integration in die DNS der Wirtszelle werden sie Bestandteil der Erbinformation und können somit grundlegende zelluläre Mechanismen zur Replikation nutzen, um sich zu vervielfältigen. Kommt es nicht zur Virusreplikation bzw. Virusproteinsynthese spricht man von einer latenten Infektion. Sie ist durch die in der klinischen und pathologischen Routinediagnostik eingesetzten klassischen Verfahren der Detektion von Virusantigen nicht nachzuweisen.

Die Prävalenz dieser Verlaufsform der Infektion zu ermitteln sowie den Einfluß auf den Gesundheitsstatus von Sektionskatzen des Institutes für Veterinär-Pathologie zu ergründen, war das vorgegebene Ziel der vorliegenden Arbeit.

2. Literaturübersicht

2.1. Feline Retroviren und endogene retrovirale Elemente

Retroviren sind extrem erfolgreiche infektiöse Agentien. Dieser Erfolg basiert auf ihrer Eigenschaft, im Wirt persistieren zu können. Dazu bedienen sich viele Retroviren der einzigartigen Fähigkeit des Einbaus einer modifizierten DNS-Kopie ihres Plusstrang-RNS-Genoms in die chromosomale DNS der Wirtszelle als sogenanntes Provirus. Darüber hinaus können sie der Immunabwehr des Wirts im Falle von FeLV entgehen, indem sie über immunsuppressive Eigenschaften eine Immuntoleranz gegenüber viralen Antigenen induzieren. Für Spuma- und Lentiviren ist charakteristisch, dass sie der Immunantwort des Wirts entkommen, indem sie sich stark an die Wirtszelle adaptieren, bis hin zu einem ausgeprägten Stadium der Latenz (Jarrett, 1999).

Zu den felines, exogenen Retroviren zählen neben den erwiesenermaßen pathogenen Felines Leukämieviren (FeLV) und Felines Immundefizienzviren (FIV) das Feline Foamy Virus (FFV), das auch FeSFV (feline syncytium forming virus) genannt wird (Lutz, 1990).

Innerhalb der Familie der Retroviren gehören diese drei Vertreter jeweils anderen Genera an. Während FeLV, ein Vertreter der γ -Retroviren, ein einfach strukturiertes Genom besitzt, finden sich beim FIV, einem Lentivirus und beim FFV, einem Angehörigen der Spumaviren, zusätzliche regulatorische Gene (Goff, 2001).

Neben den exogenen Retroviren, die durch Infektion erworben werden, sind bei der Katze endogene Retroviren bekannt. Sie werden über die Keimbahn als integrale Bestandteile der Chromosomen von den Elterntieren an den Nachwuchs weitergegeben und sind somit im Genom jeder Körperzelle vorhanden. Dabei muß man zwischen den endogenen FeLV-verwandten, den RD-114-Virussequenzen und dem MAC-1 unterscheiden (Benveniste und Todaro, 1974; Bonner und Todaro, 1979; Okabe et al., 1973).

Die endogenen, FeLV-verwandten Sequenzen liegen mit ca. 9-16 Kopien pro haploidem Genom in jeder Katzenzelle vor. Man findet darunter stark deletierte und damit verkürzte, aber auch den exogenen Proviren annähernd gleich lange Sequenzen. Sogar längere als die zwei bisher veröffentlichten kompletten, nichtrekombinanten exogenen Provirusgenome sind beschrieben (Roca et al., 2004; Soe et al., 1983; Soe et al., 1985). Ältere Studien gingen davon aus, dass die Integration der endogenen Sequenzen im Laufe der Evolution vor über zwei Millionen Jahren und damit vor der Abspaltung der Art *felis catus* aus einer gemeinsamen Vorläuferlinie stattgefunden hatte, denn sie konnten in allen untersuchten

Katzengenomen und einigen eng verwandten Spezies nachgewiesen werden konnten. Diese endogenen, FeLV-verwandten Sequenzen wurden bisher als fossile Reste von ehemals infektiösen Nagerviren angesehen. Sie selbst galten als replikationsdefekt (Benveniste et al., 1975; Koshy et al., 1980). Neuere Untersuchungen zeigten aber, dass eine rezente Integration möglich war. Zwei endogene, FeLV-verwandte Sequenzen wurden bei nur 8,9 % bzw. 15,2 % einer untersuchten Katzenpopulation und nicht bei Wildfeliden nachgewiesen, was auf eine Integration nach der Domestizierung hinwies. Bei einer der beiden neu entdeckten Sequenzen stellte sich darüber hinaus die Frage, ob die bisherige Annahme der Replikationsdefizienz aufrecht erhalten werden kann, da weder eine Leserasterverschiebung noch bedeutende Deletionen vorlagen. Bisherige Versuche zur Replikationsinduktion aus Zellkulturen scheiterten unter Umständen daran, dass in der dafür verwendeten Ursprungs-DNS die fragliche Sequenz nicht vorhanden war (Benveniste et al., 1975; Livingston und Todaro, 1973; Roca et al., 2004; Soe et al., 1985). Der Nachweis eines beachtlichen Insertionsstellen-Polymorphismus der endogenen retroviralen Elemente konnte bei vier Katzen unterschiedlicher Rassen erbracht werden (Roca et al., 2005).

Die endogenen, häufig heterozygot vorliegenden FeLV-verwandten Abschnitte im Katzengenom weisen im Bereich der Strukturproteingene *gag*, *pol* und *env* eine hohe Homologie untereinander und zu den exogenen Proviren auf. Nur im Bereich der U3-LTR-Region bestehen größere nichthomologe Bereiche im Vergleich zu den exogenen Proviren (Berry et al., 1988; Casey et al., 1981; Kumar et al., 1989; Okabe et al., 1978).

Dennoch besaßen die LTR-Regionen der endogenen Retroviren Promoter- und Enhancerfunktion (Berry et al., 1988). Eine Einflussnahme auf zelluläre Gene ist daher denkbar (Ghosh et al., 2000). Andererseits schien die Transkription subgenomischer RNS unter dem Einfluß angrenzender zellulärer Sequenzen zu stehen. Subgenomische RNS-Transkripte wurden gewebsspezifisch exprimiert (Busch et al., 1983; Niman et al., 1980; Niman et al., 1977a; Niman et al., 1977b). Die Transkription erfolgte differentiell und scheint bei den kurzen Sequenzen gegenüber den annähernd vollständigen erhöht (Soe et al., 1985). Transkription und Translation *env*-verwandter Sequenzen in Geweben gesunder Katzen, darunter Plazenta und lymphatische Gewebe, ist nachgewiesen worden (Busch et al., 1983; McDougall et al., 1994). Die Bedeutung der Expression subgenomischer RNS ist aber nicht klar. Eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber exogenen Retrovirusinfektionen wurde bei Hühnern ohne transkriptionelle Aktivität endogener retroviraler Sequenzen gezeigt (Robinson et al., 1981). In der humanen Plazenta wurde ein Schutz vor exogener retroviraler Infektion durch

den Nachweis endogener *env*- verwandter RNS und die Expression eines Oberflächenproteins (gp70) postuliert (Rabson et al., 1983). Weiterhin wurde gezeigt, dass das verkürzte Hüllprotein, das von einer endogenen Sequenz abstammte, Fibroblasten in Zellkultur vor Infektion durch ein FeLV Typ B-Virus schützte (McDougall et al., 1994).

Gegen einen protektiven Effekt spricht der Nachweis eines von einer endogenen *env*-Sequenz abgeleiteten Proteins, das die Infektion durch ein T-lymphozytotropes exogenes FeLV ermöglicht (Anderson et al., 2000). Eine weitere These, näher untersucht am Beispiel des Aviären Leukose Virus Subtyp J, ist die Induktion einer Immuntoleranz durch embryonale Expression endogener *env*-Sequenzen, die in einer Untersuchung allerdings nicht bestätigt werden konnte (Sacco et al., 2004). Obwohl sie selbst keine Infektiosität besaßen, konnten endogene Sequenzen mit exogenem Virusgenom rekombinieren. Dies ist der Ursprung der FeLV-Subtypen B und C (Chen et al., 1998; Overbaugh et al., 1988; Riedel et al., 1988; Roy-Burman, 1995; Sheets et al., 1993; Stewart et al., 1986b).

Das RD-114-Virus ist ein weiteres endogenes Retrovirus bei Hauskatzen. Es ist eng verwandt mit endogenen Pavianretroviren (BaEV) und liegt mit 15-20 Kopien im Katzensgenom vor (Benveniste und Todaro, 1974). Es liegen keine Hinweise vor, dass das endogene RD-114-Virus am Zustandekommen natürlich auftretender Erkrankungen beteiligt ist.

Die RD-114-Sequenzen wurden transkribiert und translatiert, aber es erfolgte keine komplette Replikation in der Katze (Gardner et al., 1974; Levin et al., 1976; Niman et al., 1977b; Okabe et al., 1973). Eine neuere Untersuchung postulierte weitere endogene Retroviren, sogenannte *Felis catus* endogene Retroviren (FcEVs) und vermutet eine Rekombination aus FcEV und BaEV als Ursprung der RD-114-Sequenzen (Van der Kuyl et al., 1999).

Ausserdem findet man im Genom einiger Feliden, unter anderem auch der Hauskatze, endogene retrovirale Sequenzen mit enger Verwandtschaft zum MAC-1, einem endogenen Retrovirus mit Typ C Morphologie bei Primaten (Todaro et al., 1978).

2.2. FeLV

2.2.1. Geschichte

Das Feline Leukämievirus (FeLV) wurde erstmals im Jahre 1964 durch Jarrett et al. beschrieben (Jarrett et al., 1964b; Jarrett et al., 1964a). Vier zwölf Stunden alte Katzenwelpen entwickelten nach Applikation eines zellfreien Überstandes aus lymphosarkomartig

verändertem Thymusgewebe einer spontan auftretenden multizentrischen Leukose einer achteinhalb Jahre alten Katze ebenfalls Lymphosarkome bzw. Hinweise auf eine autonome Proliferation des lymphatischen Gewebes. Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Tumorgewebes und aus diesem gewonnener Zellkultur erbrachte den Nachweis von dem murinen Leukämievirus ähnlichen Partikeln mit einer Größe von etwa 100 nm, dem FeLV. Es ist davon auszugehen, dass das feline Leukämievirus, wie auch die endogenen, FeLV-verwandten Sequenzen, infolge einer Transspeziesinfektion aus infektiösen Nagerretroviren hervorgegangen ist (Benveniste et al., 1975).

Aufgrund der erheblichen klinischen Relevanz sowie seines interdisziplinären Modellcharakters für virusinduzierte Tumorgenese und Immundefizienz war das Virus seit seiner Entdeckung Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten (Rohn et al., 1996).

2.2.2. Klassifikation

Das Feline Leukämievirus (FeLV) wird aufgrund seiner Fähigkeit der Reversen Transkription zur Familie der *Retroviridae* gezählt. Entgegen der früheren Unterteilung der Retroviren hinsichtlich Morphologie des Virions, der Morphogenese und der Wirtsspezies ist die Genomstruktur das Hauptkriterium der derzeit gültigen Taxonomie (Pringle, 1999). Darauf basierend wird das FeLV als „einfaches“ Retrovirus bezeichnet. Einfache Retroviren, zu denen die drei Genera *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus* und *Gammaretrovirus* gerechnet werden, zeichnen sich durch nur drei Genprodukte, nämlich Gag, Pol und Env aus. Das Feline Leukämievirus zählt zum Genus *Gammaretrovirus*. Dieses Genus mit den meisten bekannten Angehörigen umfasst Viren mit einer Typ C Morphologie des Nukleokapsids. „C“ steht dabei stellvertretend für das englische Wort *crescent*, was soviel wie Halb- oder Sichelmond bedeutet und beschreibt anschaulich die Form des entstehenden Nukleokapsid an der Zellmembran im elektronenmikroskopischen Bild (Cotter, 1998). Die Typspezies des Genus *Gammaretrovirus* ist das Murine Leukämievirus (MuLV) (Pringle, 1999).

Im Gegensatz zu den einfachen Retroviren gelten die Angehörigen der Genera *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* und *Spumavirus* als „komplexe“ Retroviren, deren Genom über Gag, Pol und Env hinaus für weitere kleine regulatorische Proteine codiert (Goff, 2001).

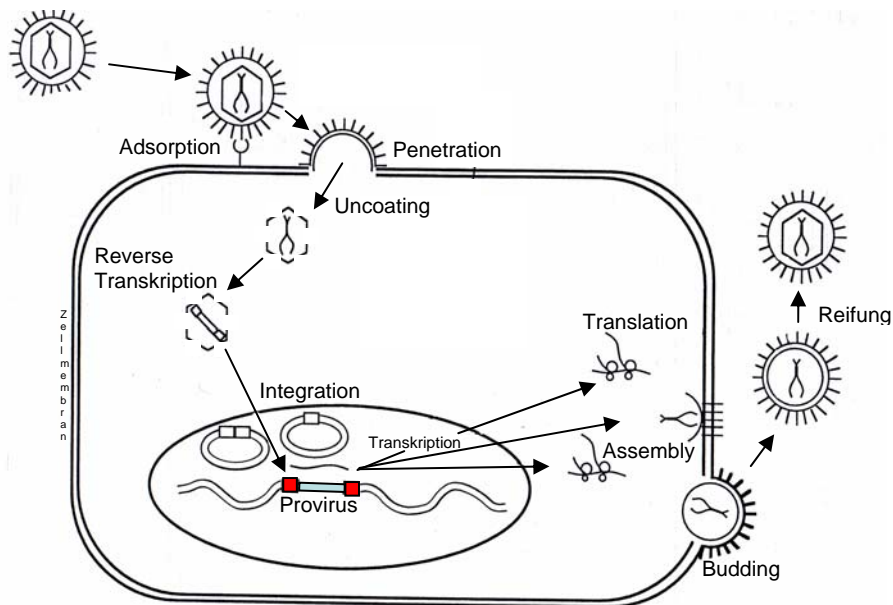
2.2.3 Virusmorphologie, Genomorganisation

Retroviren sind ca. 80-110 nm große, sphärische, behüllte nukleinsäurehaltige infektiöse Agentien. Das diploide Genom besteht aus zwei linearen Einzelstrang-RNS-Molekülen positiver Polarität. Das Genom ist der zellulären messenger RNS aufgrund einem cap-analogen 5'-Ende sowie einem Poly(A)-Schwanz ähnlich (siehe Abbildung 2.2). An die cap-Sequenz am 5'-Ende schließen sich regulatorische Sequenzen an, die für den Ablauf der reversen Transkription und Replikation entscheidend sind. Es beginnt mit einem kurzen, dem sogenannten R-Abschnitt. R steht für „repeated“, da diese Sequenz sich direkt vor dem Poly(A)-Schwanz wiederholt. Stromabwärts schließt sich dem 5'-R-Abschnitt der U5-Abschnitt und an diesen die primer binding site (pbs) für die Hybridisierung mit einer tRNS an. Nach dem sogenannten Psi-Element folgen schließlich die codierenden Sequenzen. Beim einfachen Retrovirus FeLV bestehen diese aus den drei Genen *gag* (group specific antigen), *pol* (polymerase) und *env* (envelope). Stromabwärts folgen der kurze polypurine tract (ppt) und der für die Expression der viralen Proteine und die Integration in die Wirts-DNS wichtige U3-Bereich. An diesen schließt sich der zweite R-Abschnitt und der Poly(A)-Schwanz an. Im reifen Viruspartikel liegt die genomische RNS in enger Assoziation zum Nukleokapsidprotein (NC) und den viralen Enzymen Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT). Dieser zentrale Protein/RNS-Komplex wird durch das Kapsidprotein (CA) zum inneren Kern (Core) vereinigt. Umgeben wird dieses Core-Partikel von einer Proteinhülle, gebildet vom Matrixprotein (MA), die sich ihrerseits in enger Assoziation zur äußeren, beim Budding von der Wirtszelle erworbenen Lipiddoppelmembran befindet. In die Lipidhülle sind das transmembranäre p15E Protein (TM) und das daran gebundene, glykosilierte SU (Surface)-Protein (gp70) eingelagert (Leis et al., 1988; Murphy et al., 1999).

2.2.4 Replikation

Der Lebenszyklus des FeLV umfasst die klassischen Schritte Adsorption, Penetration, Uncoating, Reverse Transkription und Integration der viralen DNS ins Wirtszellgenom, Virusproteinproduktion (Transkription und Translation), Assembling, Freisetzung und Reifung des Viruspartikels. Ein Überblick über den retroviralen Replikationszyklus ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

Abbildung 2.1: Schematische Übersicht über den retroviralen Replikationszyklus
(nach Goff, 2001)



rot: LTR-Bereiche des Provirus; hellblau: virale Strukturproteingene

2.2.4.1 Adsorption

Für das Initiieren der Infektion der Einzelzelle ist eine Kontaktaufnahme von Wirtszelle und Virus notwendig. Dies geschieht über die Interaktion zellulärer Oberflächenmoleküle, den sogenannten Virusrezeptoren, und der SU-Unterheit des Virus (gp70). Aufgrund antigenetischer Unterschiede im gp70-Protein werden Subgruppen des FeLV unterschieden. Mittels Interferenz- und Neutralisationstests sowie Untersuchungen über die Wirtszellspezifität ließen sich ursprünglich die drei Subgruppen A, B und C unterscheiden (Jarrett et al., 1973a; Sarma und Log, 1973). Nach Infektion der Zelle wurde eine Superinfektion mit der gleichen, aber nicht einer anderen Subgruppe verhindert. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die unterschiedlichen Subgruppen unterschiedliche Virusrezeptoren nutzen. Für die Subgruppe B wurden die Oberflächenmoleküle Pit1 und Pit2, transmembranäre Phosphattransportmoleküle, als Virusrezeptoren ermittelt (Anderson et al., 2001). Interessanterweise nutzt das Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) ebenfalls Pit1 als Oberflächenrezeptor (Sommerfelt und Weiss, 1990; Takeuchi et al., 1992). FLVCR (FeLV-C surface receptor), ein Protein mit Homologie zu einem D-Glucarat-Transporter von *C. elegans*, scheint der Rezeptor für die FeLV-Subgruppe C zu sein (Quigley et al., 2000; Taylor

et al., 1999). Für die Subgruppe A wurde ein 70 kDa Oberflächenprotein postuliert und ein dem humanen Thiamin Transport Protein 1 orthologes felines Thiamin Transport Protein 1 (feTHTR1) als Virusrezeptor näher beschrieben (Ghosh et al., 1992; Mendoza et al., 2006). Eine Ausnahme von dem Grundprinzip der Interferenz homologer Subgruppen stellen die Infektionen mit T-lymphozytotropen, stark immunsupprimierenden FeLV-Stämmen dar. Hier findet eine Superinfektion der Zelle mit der homologen Subgruppe statt und es kommt zur intrazellulären Anhäufung unintegrierter Virus-DNS (Donahue et al., 1991; Mullins et al., 1986; Mullins et al., 1989; Rohn et al., 1998). Untersuchungen ergaben, dass diese Stämme neben dem Pit1-Molekül einen zellulären Corezeptor, FeLIX, ein von einer endogenen FeLV-*env*-Sequenz abgeleitetes Protein, zur Zellinfektion brauchten. Verschiedene Autoren schlugen daher eine neue Subgruppe FeLV-T für diese Stämme vor, die wie die Subgruppen B und C aus FeLV A hervorgehen (Anderson et al., 2000; Cheng et al., 2006; Lauring et al., 2002; Moser et al., 1998).

2.2.4.2 Penetration und Uncoating

Nach der initialen Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle erfolgt die Aufnahme in das Zytosol bei den meisten Retroviren durch Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Zelle. Dieser komplexe Vorgang der Penetration ist für das FeLV nicht im Detail bekannt. Unter den Retroviren ist dieser Vorgang insbesondere für das HI-Virus untersucht.

Ausnahmen stellen die Foamyviren und das MuLV dar, die nicht mit der Zellmembran fusionieren, sondern über Endozytose Eintritt ins Zellinnere erhalten. Interessanterweise gelangen HI-Viruspartikel teilweise auch über Endozytose in das Zytoplasma. Allerdings führen die so aufgenommenen Virione nicht zur produktiven Infektion. Durch Destabilisierung und teilweisen Abbau des Viruspartikels im Anschluß an die Penetration kommt es zur Entstehung von RTCs (reverse-transcription complexes) und PICs (pre-integration complexes), molekularen Nukleoproteinclustern, die an nachfolgender reverser Transkription, am Transport in den Zellkern und an der Integration der viralen DNS in Verbindung mit Wirtszellstrukturen wie dem Zytoskelett, beteiligt sind (Nisole und Saib, 2004). Die Zusammensetzung dieser Komplexe beim Felinen Leukämievirus ist allerdings nicht bekannt. Für verschiedene andere Retroviren wurden als Bestandteile die Virionproteine Integrase, Reverse Transkriptase, Capsidprotein sowie DNS neben zellulären Proteinen (BAF, Lap 2 α) analysiert (Fassati und Goff, 1999; Nermut und Fassati, 2003; Suzuki et al., 2004).

2.2.4.3 Reverse Transkription und Integration

Die der Virusfamilie namengebende reverse Transkription beginnt in der Regel kurz nach der Penetration des Viruspartikels in die Zelle und nach Zusammenlagerung eines RTC. Dabei erfolgt in mehreren komplexen Schritten die Synthese eines zur viralen RNS komplementären DNS-Doppelstranges. Die reverse Transkription startet mit der Synthese einer sogenannten minus strand strong stop DNS durch das Andocken einer zur primer binding site (pbs) der viralen RNS komplementären tRNS und der Synthese auf das 5'-Ende zu. Anschließend erfolgt die Degradation der Virus-RNS des DNS/RNS-Hybridabschnittes und eine Translokation des kurzen DNS-Abschnittes, an dessen 5'-Ende die tRNS angehängt bleibt, zur R-Sequenz am 3'-Ende des Virusgenoms. Ausgehend von diesem neuerlichen DNS/RNS-Hybridmolekül erfolgt die Synthese des kompletten, zum Virusgenom komplementären DNS-Moleküls bis in den Bereich der pbs am partiell degradierten 5'-Ende. Danach beginnt der enzymatische Abbau der Virus-RNS. Ein stabiler, purinreicher Abschnitt (ppt) dient vor seinem Abbau als Primer für die Synthese des komplementären DNS-Stranges positiver Polarität. Dabei erfolgt zunächst die Synthese eines kurzen DNS-Abschnittes (plus strand strong stop DNS) in Richtung des 5'-Endes der Minusstrang-DNS, anschließend wird der tRNS-Primer vom 5'-Ende der Minusstrang-DNS entfernt und es findet eine weitere Translokation statt, wobei es zum Annealing beider DNS-Stränge in zirkulärer Form am jeweiligen 3'-Ende im Bereich der pbs-Sequenz kommt. Nun werden die Komplementärstränge vervollständigt und es erfolgt die Öffnung zum linearen Molekül. Die Translokationen während dieses komplexen Vorganges führen zur Duplikation zweier Segmente im Vergleich zur genomischen RNS, nämlich des U5- und des U3-Abschnittes (Goff, 2001). Die so entstehenden homologen Sequenzblöcke aus U3-R-U5 werden als long terminal repeats (LTRs) bezeichnet und sind 450 bp lang (siehe Abbildung 2.1 und 2.2). Die lineare, doppelsträngige DNS ist 8,7 kb lang und gelangt, verpackt mit Virionprotein und zellulären Proteinen als pre-integration complex in den Zellkern und wird dort in das Wirtszellgenom integriert (Mullins et al., 1980; Nisole und Saib, 2004). Für einfache Retroviren gilt bislang, dass sie für den Eintritt in den Kern auf sich in Teilung befindliche Zellen angewiesen sind (Lewis und Emerman, 1994).

Die Integration der revers transkribierten cDNA ins Wirtszellgenom stellt einen komplexen Vorgang dar, der bislang nicht ausreichend geklärt ist.

Es kann dabei nicht von einem zufälligen Integrationsort ausgegangen werden (Shih et al., 1988). Die Sekundärstruktur der DNS scheint dabei eine bestimmende Rolle im Gegensatz zur Basenabfolge, der Primärstruktur, zu besitzen.

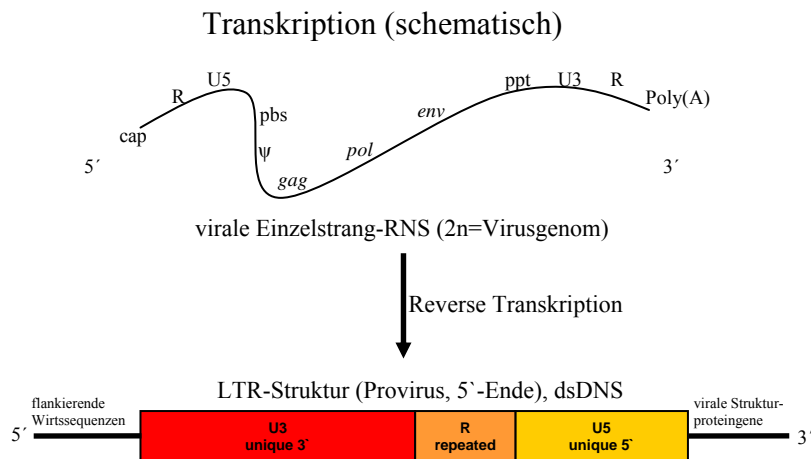
Bei den darauf genauer untersuchten Viren, hier insbesondere HIV und MuLV, zeigt sich die generelle Tendenz zur Integration in exponierte Bereiche nukleosomaler DNS. Mehrere Untersuchungen haben für MuLV und HIV-1 die Bevorzugung transkriptionell aktiver zellulärer Gene gezeigt (Cereseto und Giacca, 2004; Schröder et al., 2002). Diese liegen in Abschnitten mit offener Chromatinstruktur, sogenannten DNase-I-hypersensitiven Regionen. Interessant dabei ist, dass MuLV hier überwiegend in das regulatorische Gebiet stromaufwärts des transkribierten Genes, HIV-1 aber in das Gen selbst integriert (Cereseto und Giacca, 2004). Unterschiedliche Überlebensstrategien könnten die Ursache hierfür sein. Im Falle von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass die basale Transkriptionsrate vom Integrationslokus abhängig ist (Jordan et al., 2003).

Das viruscodierte Enzym Integrase vermittelt die Integration der doppelsträngigen DNS in das zelluläre Genom und scheint bei der Auswahl des Integrationslokus beteiligt zu sein (Nisole und Saib, 2004).

Insertionsmutagenesestudien an feline FeLV-induzierten Lymphosarkomen ergaben bestimmte Domänen für die FeLV-Provirusintegration. Der in diesen Untersuchungen bei experimentellen und natürlich vorkommenden T-Zell-Lymphosarkomen bzw. Tumorzelllinien am häufigsten betroffene Locus war das *c-myc*-Protoonkogen. Neben der Integration innerhalb bzw. stromaufwärts des Gens kommt es allerdings am häufigsten zur Transduktion von *c-myc* (Levy et al., 1984; Neil et al., 1984; Tsatsanis et al., 1994). Ein weiteres Ziel für die FeLV-Integration stellt *flvi-2* dar, das für *bmi-1* codiert. In Thymusleukosen wurde die Integration stromabwärts des Gens nachgewiesen (Levy und Lobelle-Rich, 1992; Levy et al., 1993a). Gleichzeitig traten auch Alterationen im *myc*-Locus auf, wobei keine starke Assoziation zu bestehen schien (Levy et al., 1993b). Ein weitere gebräuchliche 6 kb große Domäne zur Insertion wurde mit *fit-1* gefunden, wobei hier in der Regel auch ein transduziertes *v-myc*-Gen an der Tumorgenese beteiligt war (Tsujimoto et al., 1993). Das galt auch für den in T-Zell-Lymphosarkomen weiterhin auftretenden Integrationslocus des *pim-1*-Protoonkogens. Hier wurden sowohl Insertionen am 5'-, als auch am 3'-Ende der Transkriptionseinheit postuliert (Tsatsanis et al., 1994).

Eine 2,4 kb Integrationsdomäne für das Feline Leukämievirus wurde auch in Nicht-T-Zell-Lymphosarkomen in Form des *flvi-1*-Locus gefunden (Levesque et al., 1990).

Abbildung 2.2: Virusgenomorganisation (ssRNS) und LTR-Struktur nach Reverser



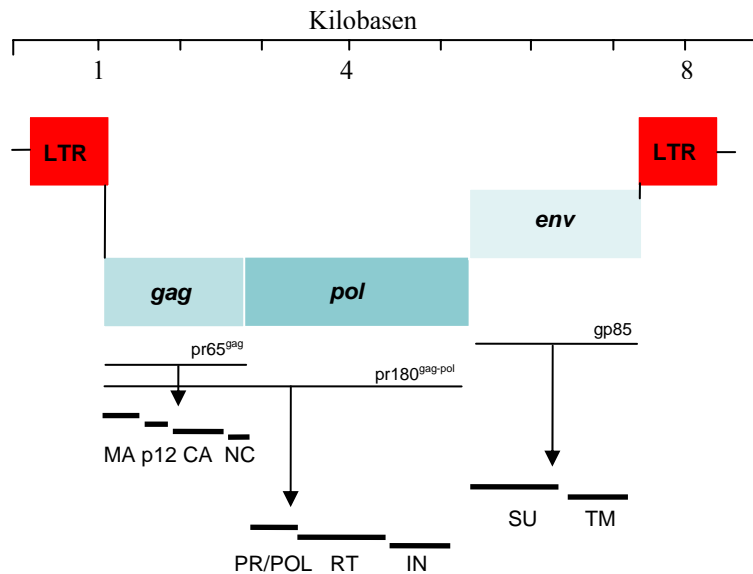
2.2.4.4 Virusproteinproduktion, Assembly, Freisetzung, Reifung

Nach der Integration der viralen Doppelstrang-DNS in das Wirtszellgenom spricht man vom Provirus. Damit beginnt die späte Phase im Replikationszyklus der Retroviren. Der hochkonservierte U3-Abschnitt enthält Promoter- und mehrere Enhancerregionen sowie weitere regulatorische Elemente (Abujamra et al., 2003; Fulton et al., 1990). Ausgehend von der Grenze U3-R beginnt die Synthese eines primären Transkripts analog zur Transkription zellulärer Gene. Das primäre Transkript endet an der Grenze R-U5. Diese virale RNS weist, wie bereits oben erwähnt, die typischen Eigenschaften zellulärer mRNA auf. Bei einfachen Retroviren kommt es zum Splicen einer mRNA für das Env-Glycoprotein (Goff, 2001).

Die Proteine werden als Vorläuferproteine generiert und im Fall der *gag*- und *pol*-Produkte durch eine virale, im Fall der *env*-Produkte durch eine zelluläre Protease im Sinne einer Reifung zum infektiösen Viruspartikel in die Einzelkomponenten gespalten. Aus dem Gag- bzw. dem Gag-Pol-Polyproteinvorläufer Pr65^{gag} und Pr180^{gag-pol}, der durch Überlesen eines Stopcodons entsteht, werden das Matrixprotein MA (p15), das Nukleokapsidprotein NC (p10), das Kapsidprotein CA (p27) und das p12-Protein, einem Phosphoprotein, das vermutlich analog zum Moloney Murinem Leukämievirus sowohl für die Bildung zirkulärer DNS nach der reversen Transkription als auch für das Assembly essentiell ist, gebildet (Yoshinaka et al., 1985; Yuan et al., 1999; Yueh und Goff, 2003). Das *pol*-Gen codiert für die Enzyme Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT). Die *env*-Produkte TM (gp70) und SU (p15E) entstehen durch Spaltung des Vorläuferproteins gp85 (Cotter, 1998; Goff, 2001) (siehe Abbildung 2.3).

Zum Assembly des Virions kommt es an der Plasmamembran. Getriggert durch die Anlagerung des Precursor-Gag-Proteins kommt es zur Abschnürung des Virions unter Einschluss aller Komponenten und anschließender proteolytischer Reifung (Bolognesi et al., 1978; Goff, 2001).

Abbildung 2.3: Provirusgenomstruktur und Proteinsynthese (schematisch)



2.3. FeSV

Ein replikationsdefektes, sehr nahe mit FeLV verwandtes Virus stellt das schnell transformierende Feline Sarkom Virus (FeSV) dar. Snyder und Theilen (1969) isolierten es erstmalig aus einem multizentrischen, subkutanen Fibrosarkom einer zwei Jahre alten Katze (Snyder und Theilen, 1969). Beim FeSV handelt es sich um ein transduzierendes Retrovirus, das ein virales, unter der Kontrolle der LTR-Abschnitte stehendes Onkogen (*v-onc*) in das Genom der Zelle einschleust und somit zur akuten Transformation führt (Besmer, 1983; Frankel et al., 1979). Die Aufnahme der für das Onkogen codierenden Sequenz erfolgt im Austausch gegen für die Replikation essentielle virale Genabschnitte. Dieser Vorgang erfolgt in zwei Schritten. Dabei wird zuerst eine zelluläre, das Provirus flankierende Wirtssequenz zusammen mit dem Virusgenom in ein Virion verpackt. Bei der nächstfolgenden Reversen Transkription kann es nun zur Rekombination durch einen template switch zwischen diesen beiden RNS-Sequenzen kommen (Swain und Coffin, 1992). Dabei gingen Teile der *gag*- und *env*-Region sowie der gesamte *pol*-Abschnitt verloren (Besmer, 1983; Coffin, 1979). Durch

den Verlust dieser Sequenzen ist das FeSV auf ein replikationskompetentes, sogenanntes FeLV-Helfervirus angewiesen. Es sind bislang 11 FeSV-Isolate näher charakterisiert. Sieben unterschiedliche ν -oncs konnten bisher nachgewiesen werden (Rojko und Hardy, 1994). Die regulatorischen Sequenzen im LTR-Abschnitt zeigten eine hohe Homologie zum FeLV-Genom, insbesondere auch im U3-Bereich, so dass bei molekularbiologischem Nachweis von Provirus mittels PCR mit homologen Primern sowohl FeLV als auch FeSV detektiert werden konnten (Ellis et al., 1996; Hampe et al., 1983; Van Groningen et al., 1987).

2.4. Infektionsverlauf und Pathogenese der FeLV-Infektion

Etlliche epidemiologische Studien und Infektionsversuche zeigten, dass das FeLV ein überwiegend horizontal übertragenes Agens darstellt (Essex et al., 1977; Hardy et al., 1976; Hardy et al., 1973b; Jarrett et al., 1973b; Pedersen et al., 1977; Rojko et al., 1979). Die Virusausscheidung erfolgte dabei über Speichel, Urin, Milch, Kot, Vaginal- und Samenflüssigkeit (Francis und Essex, 1977; Hardy et al., 1973b; Hoover und Mullins, 1991; Jarrett et al., 1973b; Pacitti et al., 1986). Obwohl Virusreplikation im Blasen- und Darmepithel stattfand, wurden bei einer Untersuchung an natürlich infizierten, gesunden Katzen nur im Speichel hohe Virustiter gefunden (Francis und Essex, 1977; Rojko et al., 1979). In Speichel nahm die Infektiosität des Virus auf einer glatten, trockenen Oberfläche innerhalb von zwei Stunden rapide ab (Francis et al., 1979b). Die natürliche Infektion erfolgte daher überwiegend durch direkten Kontakt und oronasale Aufnahme des Virus (Essex et al., 1977; Hardy et al., 1976; Hoover et al., 1972; Hoover et al., 1977a). Eine Übertragung des Virus durch Flöhe erschien in einer neueren Untersuchung im Gegensatz zu früheren Ergebnissen ebenfalls wahrscheinlich (Francis und Essex, 1977; Vobis et al., 2003). Aus einem Mosquito konnten nach einer Blutmahlzeit an einer virämischen Katze FeLV-positive Leukozyten gewonnen werden (Hardy et al., 1973b).

Einen sechsphasigen schematisierten Infektionsverlauf lieferten Rojko et al. (1979) nach experimenteller Infektion. Nach dem Eindringen und Haften des Erregers im Wirt fand eine initiale (2-14 Tage post infectionem (d. p. i.)) Virusvermehrung überwiegend in Lymphozyten und Makrophagen der assoziierten lymphatischen Gewebe der Eintrittspforte statt. Im Falle des natürlichen Infektionsweges waren das die Tonsillen und schleimhautassoziierte Lymphfollikel. Es folgte eine Phase der lymphozyten- und makrophagenassoziierten Virämie (1-14 d. p. i.), die zur Dissemination infizierter Zellen ins systemische lymphatische Gewebe

fürte. Daraufhin fanden die Autoren sowohl bei selbstlimitierenden als auch bei progressiven Infektionen eine Virusvermehrung in den Keimzentren von Lymphfollikeln und im Knochenmark (3-12 d. p. i.). Während einer vierten Stufe der Infektion kam es darüberhinaus zur Virusreplikation in nichtlymphatischen, überwiegend myelomonozytären, aber auch erythroischen Knochenmarkvorläuferzellen und Megakaryozyten sowie zur Vermehrung im teilungsaktiven Kryptenepithel des Darmes (7-21 d. p. i.). Diese Stufe wurde sowohl bei anschließend selbstlimitierenden als auch bei progressiven Infektionsverläufen erreicht. Sie galt daher als entscheidend für den späteren Infektionsverlauf. Entweder kam es zur virämischen fünften Phase mit Verbreitung infizierter Blutzellen und zellfreiem Virus im Blut aus dem Knochenmark (14-28 d. p. i.) oder zur Eindämmung bzw. Eliminierung der Virusreplikation (Rojko et al., 1979). Neben hämatopoetischen Vorläuferzellen konnten auch stromale Fibroblasten aus dem Knochenmark als Zielzellen der FeLV-Infektion identifiziert werden (Linenberger und Abkowitz, 1992). In der Studie von Rojko et al. (1979) trat eine initiale Virusvermehrung bei 85 % der über sechs Monate alten Katzen und bei 82 % der unter acht Wochen alten Katzen auf. Eine persistente Virämie entwickelte sich allerdings bei 80 % der jungen Katzen, und nur bei 14 % der erwachsenen Katzen. Die höhere Empfindlichkeit junger Katzen eine persistierende Virämie infolge einer FeLV-Infektion zu entwickeln, wurde schon einige Jahre zuvor gezeigt und mehrfach bestätigt (Grant et al., 1980a; Hoover et al., 1976; Rojko et al., 1979). Einige Katzen beendeten selbst nach Beginn einer vom Knochenmark ausgehenden Virämie eine nachweisbare Virusreplikation (Flynn et al., 2002; Flynn et al., 2000; Hardy et al., 1976; Pedersen et al., 1977; Rojko et al., 1979; Torres et al., 2005). Der initiale Provirusgehalt im Blut beeinflusste den weiteren Verlauf einer Infektion. Der Provirusgehalt transient ELISA-positiver Tiere war geringer als der persistent ELISA-positiver Tiere (Hofmann-Lehmann et al., 2001).

Hoover et al. (1991) lieferten eine allgemein anerkannte Katalogisierung des FeLV-Status von Katzen, die auf diesen und anderen Untersuchungen basierte. Die Autoren unterteilten dabei ausgehend vom phänotypischen Virusnachweis folgende Gruppen:

- Gruppe 1: Katzen mit persistierender Virämie
- Gruppe 2: Katzen mit regressiver Infektion („Regressorkatzen“)
- Gruppe 3: Katzen mit transients Virämie
- Gruppe 4: Katzen mit atypischen Infektionsformen

Diese Einteilung bediente sich dem phänotypischen Virusnachweis über zirkulierendes oder gewebeständiges Antigen oder Virus in Verbindung mit dem Nachweis der Immunreaktion über Antikörper. Der Nachweis von p27-Antigen im Blut korrelierte mit dem Vorliegen einer Virämie (Hardy et al., 1976; Hardy et al., 1973b; Hoover et al., 1977b; Jarrett et al., 1973b). Als atypische Infektionen wurden Verläufe bezeichnet, bei denen keine Virämie aber eine lokale gewebeständige Antigenexpression vorlag (Bechtel et al., 1999; Hayes et al., 1992; Hayes et al., 1989; Lutz et al., 1980b; Pacitti et al., 1986). Eine neuere Studie ergänzte die oben genannte Einteilung der verschiedenen Infektionsstadien um den molekularbiologischen Nachweis von Provirus in Blutzellen und ermöglichte dadurch die weitere Unterteilung der möglichen Virus-Wirt-Beziehungen der im deutschen Sprachraum als Regressorkatzen bezeichneten Tiere und der Tiere mit transients Virämie (Gruppe 2 und 3) (Torres et al., 2005). Folgende Einteilung wurde dabei getroffen:

1. Abortive (gescheiterte) Infektion: Zu keinem Zeitpunkt Nachweis von p27-Antigen und Virus-DNS in Blutzellen
2. Regressive Infektion: Zu keinem Zeitpunkt p27-Antigenämie, transient oder auf niedrigem Niveau persistierend Nachweis von zirkulierender viraler DNS
3. Latente Infektion: Transiente Antigenämie, persistierend Nachweis zirkulierender Virus-DNS auf mäßigem Niveau

Dabei wiesen die Autoren darauf hin, dass in den ersten 14 Tagen nach Infektion eine abortive Infektion vorgetäuscht werden kann, da das Virus bis dahin noch nicht im Blut aufgetaucht sein muss.

2.5. Immunität

Das Zustandekommen einer Infektion und deren Verlauf ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben altersabhängiger Immunkompetenz, allgemeinem Immunstatus, initialer Virusdosis und beteiligten Virusvarianten wurden genetische Faktoren und Sozialverhalten diskutiert (Grant et al., 1980a; Rojko und Hardy, 1994). Die Immunantwort auf einen FeLV-Challenge ist komplex und im Detail nicht geklärt. Es spielen dabei sowohl die spezifischen als auch die unspezifischen Immunmechanismen eine Rolle (Rojko und Hardy, 1994).

Während früher das Hauptaugenmerk auf die spezifische humorale Immunantwort gerichtet war, gewann in jüngerer Zeit die spezifische zelluläre Immunantwort mehr Aufmerksamkeit. FeLV-infizierte Tiere produzieren unabhängig vom Verlauf der Infektion eine Reihe von Antikörpern gegen Proteine des Virions. Daher gilt die Aussagekraft retrospektiver Untersuchung zum aktuellen FeLV-Infektionsstatus als eingeschränkt (Cotter, 1998). Die Antikörpertiter lagen bei persistent virämischen Tieren generell niedriger als bei nicht virämischen, Virus exponierten (Charreyre und Pedersen, 1991; Grant et al., 1980a; Hofmann-Lehmann et al., 2001; Lutz et al., 1980a). Virusneutralisierende Antikörper sind im Wesentlichen gegen antigene Determinaten des gp70-Oberflächenproteins gerichtet, gelten als subgruppenspezifisch und protektiv (DeNoronha et al., 1978; Russel und Jarrett, 1978; Sarma und Log, 1973; Schaller und Olsen, 1975). Der Nachweis spezieller spezifischer anti-gp70-Antikörper entsprach allerdings nicht dem Nachweis virusneutralisierender Antikörper (Charreyre und Pedersen, 1991; Grant et al., 1983; Haley et al., 1985; Youngren et al., 1984). Viele, aber nicht alle Tiere, die eine Virämie abwehrten oder beendeten, entwickelten hohe Titer virusneutralisierender Antikörper ab frühestens vier bis sieben Wochen nach initialer Infektion (Charreyre und Pedersen, 1991; Hardy et al., 1976; Hoover et al., 1976; Jarrett et al., 1973b; Lutz et al., 1980a; Pedersen et al., 1977). Ein überstandene Infektion schützte ohne anhaltende antigenetische Stimulation nicht dauerhaft vor Reinfektion (Charreyre und Pedersen, 1991). Virusneutralisierende maternale Antikörper wurden mit der Kolostralmilch übertragen und schützten vor einer Infektion (Hoover et al., 1977c; Jarrett et al., 1977). Passive Übertragung von Antikörpern durch Infusion schützte bis zu 24 Tage nach experimenteller Infektion vor der Ausbildung einer Virämie bzw. beendete eine Virämie (Haley, 1985). Katzen produzierten auch Antikörper gegen andere FeLV-Strukturproteine, die aber als nicht protektiv angesehen wurden (Lutz et al., 1980a; Noronha et al., 1972)

Bedeutung im spezifischen humoralen Abwehrgeschehen hatten auch Antikörper gegen FOCMA. Bei FOCMA handelt es sich um die Abkürzung für „feline oncornavirus-associated cell membrane antigen“ und es wurde ursprünglich als tumorspezifisches, zellulär codiertes Antigen FeLV-assoziiertes Lympho- und Fibrosarkome angesehen (Essex et al., 1971b; Essex et al., 1976). Humorale Antikörper gegen FOCMA führten zur Tumorregression oder hemmten das Wachstum (Essex et al., 1975c; Essex et al., 1971a, b). Sowohl FeLV-Antigenpositive als auch FeLV-Antigen-negative Lymphosarkome exprimierten FOCMA (Essex et al., 1978). Nachfolgende Studien konnten die Herkunft des Proteins nicht endgültig klären, ergaben aber, dass Fibrosarkom-assoziiertes FOCMA ein durch FeSV codiertes Protein war,

das in transformierten Zellen exprimiert wurde, FOCMA und FeLV C-gp70 sich antigenetisch ähnlich verhielten und dass FOCMA vermutlich durch das FeLV selbst codiert wurde (Ruscetti und Parks, 1976; Sherr et al., 1978a; Sherr et al., 1978b; Snyder et al., 1983; Vedbrat et al., 1983). Anti-FOCMA-Antikörper banden an reifende sich gerade abschnürende Viruspartikel aber nicht an ausgereifte Virione (Vedbrat et al., 1983). Verschiedene Wissenschaftler sahen den persistierenden FOCMA-Antikörpernachweis bei ehemals virämischen Katzen als mögliche Folge einer latenten Infektion bzw. einer auf sehr niedrigem Niveau ohne Virämie verlaufenden floriden FeLV-Infektion des Knochenmarkes (Rice und Olsen, 1981; Rojko et al., 1982).

Das Komplementsystem als Vertreter der unspezifischen humoralen Immunabwehr führte mittels spezifischer Antikörper zur Lyse FOCMA- bzw. FeLV-gp70-positiver Tumorzellen (Grant et al., 1977; Grant et al., 1983; Grant et al., 1978; Grant et al., 1980b). Über eine Schädigung des Komplementsystems durch Verabreichung des komplementaktivierenden Proteins des Kobragiftes konnte eine Reaktivierung einer latenten FeLV-Infektion erreicht werden (Kraut et al., 1985).

Diese teils widersprüchlichen Ergebnisse aus Untersuchungen zur spezifischen humoralen Immunität und die Erkenntnis, dass eine DNS-Vakzination ohne Bildung von anti-FeLV-Antikörpern vor einer Infektion schützte, zeigten, dass die spezifische Immunreaktion gegen den Erreger nicht nur auf der Bildung von antiviralen Antikörpern beruhte (Hanlon et al., 2001). Die Untersuchungen von Flynn et al. (2000, 2002) demonstrierten die bedeutende Rolle von zytotoxischen T-Lymphozyten bei Katzen, die eine Infektion erfolgreich abwehrten. Allerdings gab es in einer Untersuchung auch ein Tier, das eine persistente Infektion ohne nachweisbare zytotoxische T-Lymphozyten überwand, was den schwer fassbaren Charakter der Immunreaktion gegenüber diesem Virus unterstreicht (Flynn et al., 2002).

2.6. Virusnachweis

Der Erregernachweis kann direkt oder indirekt erfolgen. Während der direkte Erregernachweis das Vorhandensein von Virionen erfordert, werden beim indirekten Erregernachweis phänotypische (Antigene) bzw. genotypische (provirale DNS, Virus-RNS) Charakteristika des Viruspartikels nachgewiesen. Der direkte Erregernachweis kann über Virusisolation oder Elektronenmikroskopie vorgenommen werden. Im Gegensatz dazu

bedient sich der retrospektive Erregernachweis der Immunreaktion gegenüber viraler Antigene und erfolgt somit über die serologische Detektion antiviraler Antikörper (siehe Kapitel 2.2.5.), wobei die Aussagekraft dieser Untersuchung im Hinblick auf den aktuellen Infektionsstatus jedoch gering ist (Cotter, 1998).

Jarrett et al. gelang 1964 der Nachweis von Viruspartikeln mit dem Elektronenmikroskop (Jarrett et al., 1964b). 1967 wurde das Virus durch Kawakami et al. isoliert (Kawakami et al., 1967). Weitere elektronenmikroskopische Studien zur Charakterisierung des Virus erfolgten durch Laird et al. (Laird et al., 1968a; Laird et al., 1968b).

Ein spezifisches Antiserum gegen FeLV-Antigen wurde 1969 produziert und in einem Immundiffusionstest angewendet (Hardy, 1971; Hardy et al., 1969). Im gleichen Jahr wurden ein Komplementbindungstest und ein Hämagglutinationstest entwickelt (Fink et al., 1971; Sarma et al., 1971).

1973 wurde zum ersten Mal ein Immunfluoreszenztest (immunofluorescent antibody test, IFA) vorgestellt. Dieser Test weist virale Antigene in Blutleukozyten und Thrombozyten nach und gehört bis heute zu den gängigen Testverfahren zum Nachweis einer Virämie (Cotter, 1998; Hardy und Zuckerman, 1991a; Hardy et al., 1973a; Hardy und Zuckerman, 1991b). Die post mortem-Detektion des p27-Antigens in paraffineingebettetem Gewebe wurde zum ersten Mal 1978 mittels indirekter Immunfluoreszenz erfolgreich durchgeführt (Rojko et al., 1978). Mittels der indirekte Immunperoxidasetechnik an methanolfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe konnten später sowohl p27- als auch gp70-Antigen mit monoklonalen antiviralen Antikörpern nachgewiesen werden (Reinacher und Theilen, 1987). Mit der immunhistologischen Untersuchung von Milz und Knochenmark durch diese Methode waren 99,9 % aller FeLV-positiven Fälle zu diagnostizieren (Wittmer, 1993).

Gp-70-Antigen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Tumorgewebe wurde erstmals von Jackson et al. (1993) durch die ABC-Methode immunhistologisch nachgewiesen (Jackson et al., 1993). In formalinfixiertem Gewebe erreichte man erst später den Nachweis von gp70 und p27 mittels indirekter Immunperoxidase (Kovacevic et al., 1997). Weitere Methoden wie Western Blot und Radioimmunoassay wurden beschrieben (Benveniste et al., 1975; Fujino et al., 2004; Levin et al., 1976)

1983 dienten erstmals monoklonale Antikörper gegen verschiedene p27-Epitope zum Einsatz in einem ELISA (Lutz et al., 1983). Der p27-ELISA ist ein bis heute übliches Testverfahren zum Nachweis einer Antigenämie/Virämie. Großer Vorteil ist die unkomplizierte Anwendung und Auswertung (Kahn et al., 1980). Wittmer (1993) berichtete von diskrepanten

Testergebnissen bei der Auswertung immunhistologischer Untersuchungen, ELISA und Immunfluoreszenztest, wobei für positive ELISA-Tests (n=72) eine Diskrepanz von 27,8 % zum immunhistologischen Nachweisverfahren bestand. Neben Blut, Serum und Plasma konnten mit ELISA-Methoden auch Speichel und Tränenflüssigkeit untersucht werden (Hawkins, 1991; Tonelli, 1991).

Diesen bisher geschilderten Phänotyp-Nachweismethoden stehen unterschiedliche diagnostische Hilfsmittel zur Detektion der viralen Nukleinsäure gegenüber. Ein grundsätzliches Problem stellt dabei die bereits erwähnte Ähnlichkeit der Basenabfolge zwischen exogenem FeLV und den endogenen FeLV-verwandten Sequenzen dar.

Der Hauptunterschied zu den endogenen FeLV-verwandten Gensequenzen liegt im U3-Abschnitt der LTR-Region, der daher zur Differenzierung herangezogen werden muß (Berry et al., 1988; Casey J. W., 1981; Fulton et al., 1990; Okabe et al., 1978). Untereinander zeigten unterschiedliche FeLV-Isolate zu 95 % Sequenzhomologie, ein japanisches Isolat war mit 85 % Homologie weiter entfernt (Elder und Mullins, 1983; Fulton et al., 1990; Guilhot et al., 1987; Miura et al., 1989; Riedel et al., 1986; Stewart et al., 1986a).

Zum FeLV-Nachweis wurden sowohl einfache, nested und real time PCR-Systeme als auch die RT-PCR verwendet (Arjona et al., 2006; Cattori et al., 2006; Cullen et al., 2002; Cullen et al., 1998; Ellis et al., 1996; Fulton et al., 1990; Gabor et al., 2001; Gomes-Keller et al., 2006; Herring et al., 2001a; Herring et al., 2001b; Hofmann-Lehmann et al., 2001; Jackson et al., 1993; Jackson et al., 1996; Miyazawa und Jarrett, 1997; Pinches et al., 2006; Stiles et al., 1999; Tandon et al., 2005; Torres et al., 2005; Uthmann et al., 1996). Die Ausscheidung viraler Nukleinsäuren mit dem Speichel und deren Stabilität ermöglicht eine nichtinvasive Probennahme und unproblematische Verarbeitung unter Erlangung von für den Infektionsstatus aussagekräftigen real time-PCR-Ergebnissen (Gomes-Keller et al., 2006). Ein spezielles PCR-Verfahren zur Unterscheidung von episomaler und integrierter Virus-DNS wurde 2006 vorgestellt (Cattori et al., 2006). Neben der PCR existiert die Möglichkeit des Virusgenomnachweises über Northern und des Provirusnachweises über Southern Blotting (Benveniste et al., 1975; Casey et al., 1981; Fujino et al., 2004; Fujino et al., 2003; Jackson et al., 1993; Koshy R, 1980; Levin et al., 1976; Okabe et al., 1978). Desweiteren sind die DNS-Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) und die RNS-in situ-Hybridisierung beschrieben worden (Büttner, 2004; Fujino et al., 2003).

2.7. Prävalenz der produktiven FeLV-Infektion

Es existieren zahlreiche Untersuchungen zur Epidemiologie der FeLV-Infektion. Die Zahlen in diesen Studien schwankten z. T. stark, abhängig von der verwendeten Untersuchungsmethode, der Zusammensetzung der Katzenpopulation sowie der geographischen Herkunft. Eine Studie aus dem Jahr 1994 erbrachte für die gesamtdeutsche Katzenpopulation, unter Einbeziehung 6101 kranker und gesunder Tiere, eine Prävalenz von 13,4 % FeLV positiver Tiere mittels eines ELISA-Tests zum Nachweis von p27-Antigen im Serum. Katzen mit Krankheitssymptomen wiesen 19 % Seropositivität auf. Bei Katzen, die überwiegend im Freien gehalten wurden, waren 20,4 % ELISA-positiv (Fuchs et al., 1994). 1983 konnten 176 Katzen aus dem Raum Augsburg und Gießen hinsichtlich ihres FeLV-Status untersucht werden. 11 % dieser Katzen waren im Blutausschrieb mittels Immunfluoreszenz positiv. 28 % von 141 Tieren wiesen virusneutralisierende Antikörper auf. Bei 28 % dieser Tiere ließen sich Antikörper gegen das Feline oncornavirus associated cell membrane antigen (FOCMA) nachweisen. 49 % der Seren mit einem Anti-FOCMA-Titer besaßen gleichzeitig einen Anti-FeLV-Titer (Schniewind et al., 1983). Von 637 Katzen in einer postmortem-Studie waren 16,2 % immunhistologisch FeLV-positiv. Katzen, die infolge eines Trauma verstarben, zeigten dabei in 3,2 % der Fälle eine positive Immunreaktion (Reinacher und Theilen, 1987). Eine japanische Untersuchung ergab eine p27-Seroprävalenz von 2,9 % (Maruyama et al., 2003). In einer belgischen Katzenpopulation aus einem städtischen Bereich war bei 3,8 % der 346 Tiere zirkulierendes FeLV-Antigen zu demonstrieren (Dorny et al., 2002). Katzen aus zwei Städten in den USA waren zu 4,3 % FeLV-positiv (Lee et al., 2002). In Birmingham waren 1,4 % gesunder und 6,9 % kranker Katzen FeLV-infiziert (Muirden, 2002).

30,4 % madrilenischer Katzen mit FeLV-assoziierten Symptomen waren im Gegensatz zu 15,6 % gesunder Katzen FeLV-positiv (Arjona et al., 2000). In einer ersten epidemiologischen Untersuchung in der Tschechischen Republik aus 1999 wiesen 13,2 % FeLV-Antigenämie auf (Knotek et al., 1999). Selten scheint die FeLV-Infektion in Australien und Taiwan zu sein, wo unter 894 überwiegend kranken und 75 gemischten Katzen nur 1,4 % bzw. 1,3 % seropositiv für zirkulierendes Virusantigen waren (Lin et al., 1995; Malik et al., 1997). Auch in Norwegen und Finnland stellte die FeLV-Infektion mit 1,0-2,2 % ein geringeres Problem als die FIV-Infektion mit 5,9-10,1 % dar (Sukura et al., 1992; Ueland und Lutz, 1992). Im Serum von gesunden und kranken Katzen aus Oklahoma konnte in 15 % der Fälle FeLV-Antigen nachgewiesen werden (Rodgers und Baldwin, 1990). In der Schweiz

schwanken die Angaben zwischen 3 % bei gesunden und 13 % bei kranken Katzen (Lutz et al., 1990). Daten aus dem Vereinigten Königreich sprachen von 18 % FeLV-positiven kranken und 5 % FeLV-positiven gesunden Tieren (Hosie, 1989). Seroprävalenzen für p27-Antigen wurden in Italien bei kranken Tieren mit 18 % und bei gesunden Tieren mit 8,4 % angegeben (Bandedecchi et al., 2006; Bandedecchi et al., 1992). Bei türkischen Katzen lag die Prävalenz bei 2,7 % bei gesunden und 7,6 % bei kranken Tieren (Yilmaz et al., 2000). Frühere Untersuchungen, die FOCMA-Antikörper nachgewiesen haben, ergaben in einem Fall 74 % Seropositivität in Glasgower Katzen älter als drei Jahre (Rogerson et al., 1975). Gesunde Katzen aus Boston waren zwischen 50,4 % und 63 % positiv (Cotter et al., 1975; Essex et al., 1975a). In New Yorker Haushalten lagen die Werte in Abhängigkeit von der Haltungform bei 30 % bei Einzelkatzen und 57 % bei Mehrkatzenhaushalten (Grant et al., 1980b). 1990 wurden bei 33 % aller gesunden FeLV seronegativen Katzen und bei 57 % aller kranken älteren Katzen Anti-FOCMA-Antikörper festgestellt, was als Hinweis gewertet wurde, dass die Tiere FeLV-Kontakt gehabt hatten (Swenson et al., 1990).

2.8. Pathologie der produktiven FeLV-Infektion

2.8.1. Allgemeines

Das nosologische, durch Retroviren hervorgerufene Spektrum ist breitgefächert. Die durch FeLV hervorgerufenen Erkrankungen lassen sich unter anderem in neoplastische und nicht neoplastische, sogenannte FeLV-assoziierte, gliedern. Reinacher (1989) ermittelte in einer breit angelegten Studie an 1095 Sektionskatzen eine Verteilung von 23 % neoplastischer und 77 % nicht-neoplastischer Erkrankungen (Reinacher, 1989; Reinacher und Theilen, 1987). Das Überwiegen der nicht-neoplastischen Erkrankungen in Folge einer produktiven FeLV-Infektion wurde mehrfach bestätigt (Cotter et al., 1975; Hardy, 1981; Wittmer, 1993). Unter 3054 Sektionskatzen war die produktive FeLV-Infektion mit 66 % nicht-neoplastischen Erkrankungen die häufigste infektiöse Todesursache (Wittmer, 1993). Mit 3,1 % trat die produktive FeLV-Infektion in dieser Untersuchung dabei auch bei Sektionskatzen ohne Krankheitserscheinungen auf (Traumakatten).

2.8.2. Neoplasien

2.8.2.1. Leukose-Komplex

Etwa 30 bis 45 % aller Tumoren bei Katzen sind hämatopoetischen Ursprungs (Rojko und Hardy, 1994). Bei etwa 30 % aller Katzentumoren handelt es sich um Lymphosarkome, die damit die häufigsten Katzentumoren darstellen (Murphy et al., 1999; Vail et al., 1998). Bereits die Erstbeschreibung des FeLV stand in Verbindung mit einer Leukose-Erkrankung (Jarrett et al., 1964b; Jarrett et al., 1964a). Je nach Untersuchung ergaben sich für den FeLV-Status deutliche Unterschiede. Wohingegen frühere Zahlen sich in der Größenordnung von 60 bis 70 % FeLV-positiver Lymphosarkome bewegten, lagen neuere Zahlen zwischen 25 und 50 % (Cotter et al., 1975; Hardy, 1981; Köhler, 2003; Reinacher und Theilen, 1987; Vail et al., 1998; Wittmer, 1993). Vail et al. (1998) machten dafür verstärkt durchgeführte FeLV-Tests und FeLV-Impfungen verantwortlich. Köhler (2003) bemerkte, dass die Vergleichbarkeit der Studien aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden eingeschränkt sei. Wittmer (1993) ermittelte unterschiedlich starke Assoziationen verschiedener Leukoseformen mit der produktiven FeLV-Infektion, wobei die Thymusleukose (Lymphosarkom) herausragte. 37,2 % der FeLV-positiven Leukosen waren Thymusleukosen. FeLV-Prävalenzen bei Thymusleukosen lagen bei 68 bis 92 %, bei multizentrischen Leukosen bei 31 bis 80 %, bei intestinalen Leukosen bei 5,4 bis 50 % und bei unklassifizierten Leukosen bei 40 bis 66 % (Cotter et al., 1975; Francis et al., 1979a; Hardy et al., 1980; Reinacher und Theilen, 1987; Rojko und Hardy, 1994; Vail et al., 1998). Den bisher zitierten Studien ist gemein, dass der FeLV-Status nur hinsichtlich des Phänotyps (Nachweis von Virusantigen) beurteilt wurde. Eine Studie von Jackson et al. (1993) ergab den Nachweis von proviralem Genom in 16 von 30 Antigen-negativen Lymphosarkomen. Verschiedene Studien beschrieben ebenfalls das Auftreten myeloischer Leukosen in Verbindung mit einer FeLV-Infektion (Blue, 1988; Comazzi et al., 2000; Hisasue et al., 2001; Nishigaki et al., 1997; Shimoda et al., 2000; Toth et al., 1986). Eine signifikante Assoziation von myeloischen Leukosen mit der produktiven FeLV Infektion konnte gezeigt werden (Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993).

2.8.2.2. Andere Tumoren

Reinacher und Theilen (1987) sowie Wittmer (1993) konnten eine signifikante Assoziation zwischen einer FeLV-Infektion und dem Auftreten mesenchymaler Tumoren bei Sektionskatzen nachweisen. Eingeschlossen waren dabei Fibrosarkome, Osteosarkome und Meningiome.

Für multizentrische Fibrosarkome wurde eine Virusätiologie nachgewiesen. Snyder und Theilen (1969) isolierten aus einem multizentrischen, subkutanen Fibrosarkom einer zwei Jahre alten Katze das Feline Sarkom Virus (FeSV). Das replikationsdefekte FeSV war auf ein FeLV-Helfervirus angewiesen, so dass Tiere mit FeSV-induzierten Fibrosarkomen immer auch FeLV-positiv waren (Rojko und Hardy, 1994). Bei zwei von drei Katzen mit Ästhesioneuroblastomen konnte neben buddenden C-Typ-Viruspartikeln, die als FeLV identifiziert wurden, eine FeLV-Antigenämie nachgewiesen werden (Schrenzel et al., 1990). Ein Einzelfall eines Plattenepithelkarzinoms erlangte eine statistisch signifikante Assoziation mit der produktiven FeLV-Infektion (Reinacher und Theilen, 1987). In der Untersuchung von Wittmer (1993) waren epitheliale Tumoren bei persistent FeLV-infizierten Tieren signifikant seltener als bei FeLV-negativen. In einer Untersuchung wurde bei 21 % der Katzen mit Mammakarzinomen FeLV nachgewiesen (Weijer et al., 1974).

2.8.3. FeLV-assozierte Erkrankungen

In klinischen, pathologischen und experimentellen Studien wurde von einer Vielzahl von nicht-neoplastischen Erkrankungen im Zusammenhang mit einer produktiven FeLV-Infektion berichtet. Dabei wurden Knochenmarksuppressionssyndrome mit verschiedenen Formen der Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie, die FeLV-assozierte Enteritis, das Panleukopenia-like-syndrome, der FeLV/FAIDS-Komplex, eine FeLV-assozierte Myelopathie, Fertilitätsstörungen, das fading kitten syndrome, cartilaginäre Exostosen und Osteopetrosen, FeLV-assozierte Dermatosen und FIP geschildert. Sekundäre, indirekt durch die FeLV-Infektion bedingte Erkrankungen wurden als Folgen der durch FeLV hervorgerufenen Immunsuppression, die mit opportunistischen Infektionen und unspezifischen Entzündungen einherging, und immunpathologischer Phänomene, wie Glomerulonephritis, Iridocyklitis und Polyarthrit, angesehen (Carmichael et al., 2002; Cotter et al., 1975; Essex et al., 1975b; Favrot et al., 2005; Francis et al., 1980; Hardy, 1981, 1982; Hardy et al., 1969; Hardy et al., 1976; Hoover und Kociba, 1974; Hoover und Mullins, 1995;

Lutz, 1992; Lutz et al., 1995; Mackey et al., 1975; Reinacher, 1987; Reinacher und Theilen, 1987; Rojko und Hardy, 1994; Theilen, 1984; Wittmer, 1993). In den Studien von Reinacher und Theilen (1987) sowie Wittmer (1993), die auf der Auswertung von Erkrankungen bei Sektionskatzen basierten, konnten weitere deutlich signifikante Assoziationen der FeLV-Infektion mit pathologisch-anatomischen, –histologischen und aetiologischen Diagnosen gefunden werden. Dazu zählten Ikterus, Kachexie, Hepatitiden, degenerative Lebererkrankungen, Hyperplasie lymphatischen Gewebes, bestimmte Blutungstypen, Myokardnekrosen und Kokzidiose. In den Untersuchungen konnte z. T. ein negativer Zusammenhang mit Urämie, feliner Panleukopenie, primärer Kardiomyopathie und unspezifischen Enteritiden sowie Trauma festgestellt werden. Nicht festgestellt werden konnten im Gegensatz zu anderen Untersuchungen Assoziationen mit parasitären Infektionen außer Flohbefall, Mykosen, virologisch bestätigten felinen und porcinen Herpes-, felinen Calici- und felinen Parvovirusinfektionen, bakteriellen Infektionen allgemein sowie hochgradiger Glomerulonephritis (Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993).

2.8.4. FeLV-induzierte Immunsuppression

Die Mehrzahl der FeLV-infizierten Tiere erkrankten an nicht-neoplastischen Krankheiten (Reinacher, 1989). Die Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Infektionen schien beim Vorliegen einer FeLV-Infektion erhöht (Anderson et al., 1971; Cotter et al., 1975; Essex et al., 1975b; Essex et al., 1975d; Hardy, 1982; Hardy et al., 1976; Reinacher und Theilen, 1987; Theilen, 1984). Reinacher (1989) vermutete aufgrund seiner Untersuchungsergebnisse keine generelle, sondern nur eine gegenüber spezifischen Sekundärinfektionen erhöhte Anfälligkeit. Experimentelle Infektionen zum Geburtszeitpunkt führten zu Thymusatrophie und Lymphozytendepletion (Anderson et al., 1971; Perryman et al., 1972). Insbesondere erfolgte hierbei eine Depletion kortikaler Thymozyten, wobei keine signifikante Erhöhung von pyknotischen bzw. karyorhektischen Kernen vorlag (Hoover et al., 1973). Neonatal infizierte Welpen wiesen im Vergleich zu nichtinfizierten eine verlängerte Transplantatabstoßungszeit auf. Die gemischte Leukozytenreaktion (mixed leukocyte reaction), einem in vitro-Analogen der Transplantatabstoßungszeit, wurde durch FeLV-Protein signifikant supprimiert (Stiff und Olsen, 1983). Katzen mit bestehender, natürlicher FeLV-Infektion zeigten eine T-Zell Lymphopenie, wobei im Gegensatz zur FIV-Infektion keine Verschiebung des CD4+/CD8+-Verhältnisses erfolgt (Tompkins et al., 1991). In dieser Arbeit demonstrierten die Autoren

auch die Auswirkungen einer experimentellen Infektion von Welpen auf die Lymphozytenzahlen in der Anfangsphase der Infektion. Sie zeigten eine initiale Lymphopenie sowohl der T- als auch der B-Lymphozyten mit Rückkehr zu Normalwerten nach 20 Wochen. Ein Leukozytenabfall zu Beginn der Virämie konnte sowohl nach natürlicher als auch nach experimenteller Infektion demonstriert werden (Pedersen et al., 1977; Rojko et al., 1979). Zwischen der fünften und achten Woche nach experimenteller Infektion stellten Cockerell et al. (1976) eine überwiegend B-Zell betonte Lymphopenie fest (Cockerell et al., 1976). Eine Lymphopenie bei natürlicher Infektion konnte auch von Essex und Mitarbeitern im Jahr 1975 gefunden werden (Essex et al., 1975c). Die FeLV/FAIDS-Variante zeigte einen CD4+-Tropismus (Quackenbush et al., 1990). Dabei kam es zur direkten Zerstörung der infizierten Lymphozyten durch die Anhäufung unintegrierter Provirus-DNS (Mullins et al., 1986). Eine Alteration in der gp70-Sequenz konnte hierbei identifiziert werden (Donahue et al., 1991). FeLV-Varianten vom gp70 Subtyp C induzierten in vitro Apoptose hämolymphatischer Zellen (Rojko et al., 1996). Stimulierte Lymphozyten FeLV-infizierter Katzen produzierten weniger Interleukin-2 (Tompkins et al., 1989). Die IL-2-Sekretion von Mäusesplenozyten und von murinen T-Lymphozyten wurde durch inaktiviertes Virus und p15E gehemmt (Orosz et al., 1985b). Die Lymphoblastenstimulation durch Mitogene zeigte sich sowohl nach experimenteller Infektion als auch in vitro durch inaktiviertes FeLV bzw. FeLV-Proteine eingeschränkt (Cockerell et al., 1976; Hebebrand et al., 1977; Orosz et al., 1985a). Der Mediator dieser verminderten Ansprechbarkeit war das Virionprotein p15E (Mathes et al., 1978). Dieses Protein verminderte in vivo auch die Ausbildung einer effektiven Immunantwort auf eine FeLV enthaltende Totvakzine (Mathes et al., 1979). Es wurde gezeigt, dass FeLV-Proteine Suppressorzellen, die die Lymphoblastenstimulation hemmen, induzieren konnten (Langweiler et al., 1983). Unterschiedliche Untersuchungen hatten auch eine Einschränkung der Neutrophilenfunktion in Verbindung mit einer FeLV-Infektion ergeben. Die in vitro gemessene Chemotaxis virämischer, klinisch kranker, insbesondere jüngerer Tiere lag dabei unter der von gesunden, infizierten Tieren. Die polymorphkernigen Leukozyten FeLV-infizierter Katzen zeigten einen geringeren „respiratory burst“ als die gleichen Zellen nichtinfizierter Katzen. Inaktiviertes Virus und das Virionprotein p15E vermochten die gleiche Wirkung in vitro auszulösen (Lafrado et al., 1987; Lewis et al., 1986). Interessanterweise konnten Lafrado et al. (1986, 1989) die eingeschränkte Funktion auch noch lange nach Beendigung einer FeLV-Virämie demonstrieren (Lafrado et al., 1989; Lafrado und Olsen, 1986). Die funktionelle Kapazität des für den „respiratory burst“

wichtigen Enzyms Proteinkinase C war sowohl bei produktiven als auch bei nicht produktiven Infektionen herabgesetzt (Dezutti et al., 1989). FeLV-infizierte lymphatische Zellen wiesen einen basal erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel sowie eine geringere Stimulationsrate nach Inkubation mit verschiedene Substanzen auf (Wright et al., 1989).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass die FeLV-Infektion Auswirkungen auf das humorale Immunsystem hat. Alle virämischen Katzen mit Lymphosarkomen wiesen in einer Studie eine Hypokomplementämie auf (Kobilinsky et al., 1979). UV-inaktiviertes FeLV führte zu einer Verminderung der Interferon γ -Produktion (Engelman et al., 1985). Mehrere Untersuchungen zeigten eine verzögerte und verminderte Antikörperbildung bei FeLV-infizierten Katzen nach antigener Stimulation (Pardi et al., 1991; Trainin et al., 1983; Wernicke et al., 1986).

2.9. Latente FeLV-Infektionen

2.9.1. Definition

Das lateinische Verb *latere* (unbekannt bleiben, verborgen sein) ist die altsprachliche Wurzel des in der Medizin verwendeten Begriffes der Latenz. Der Begriff der latenten FeLV-Infektion wurde 1992 beim “Colloquium on Feline Leukemia Virus/ Feline Immunodeficiency Virus: Tests and Vaccination“ im Panel Report allgemein definiert als Vorhandensein von integrierter Provirus-DNS und Fehlen von Virusreplikation (1992). Bezogen auf die Diagnostik wurde die Definition ergänzt um den fehlenden Nachweis von Virus oder Virusantigen mit herkömmlichen Methoden. Wie oben schon erwähnt bezeichneten Torres et al. (2005) in ihrer Untersuchung latente Infektionen als solche, bei denen nach einer transienten Antigenämie persistierend zirkulierende Virus-DNS nachweisbar war. Tiere bei denen zudem zu keinem Zeitpunkt Antigenämie, aber transient oder persistent Virus-DNS nachweisbar war, bezeichneten diese Autoren als regressiv infiziert.

2.9.2. Epidemiologie, Zielzellen der latenten Infektion

Die ersten Nachweise latenter Infektionen basierten auf der Möglichkeit der Virusisolierung nach Reaktivierung der Replikation. Dadurch konnte aber nur intaktes, replikationsfähiges Virus nachgewiesen werden. Molekularbiologische Methoden zum Nachweis viraler Nukleinsäuren geben keinen Aufschluss über die Reaktivierbarkeit der Virusproduktion,

allerdings können so auch replikationsdefekte Proviren als Nachweis einer rezenteren exogenen Infektion erkannt werden (siehe Kapitel 2.2.8.4.)

Rojko et al. (1982) manifestierten ihre Hypothese, dass scheinbare Regressorkatzen nach einer transienten produktiven Infektion hämolymphatischer Zellen latent (persistent nichtproduktiv) infiziert bleiben, durch den Nachweis der in vivo- und in vitro-Reaktivierbarkeit der Virus- bzw. Virusproteinproduktion (Rojko et al., 1982). Dabei handelte es sich in der Regel um den FeLV-Subtyp A (Rojko et al., 1988). Reaktivierung konnte in vivo durch mehrtägige Kortikosteroidbehandlung erreicht werden (Post und Warren, 1980; Rojko et al., 1982). Als Zielzellen latenter Infektionen konnten myelomonozytäre Vorläuferzellen im Knochenmark sowie eine spezielle Subpopulation von T-Lymphozyten identifiziert werden. Virusreaktivierung konnte in vitro in diesen Zellen, in Lymphknotenmaterial und in Makrophagen nachgewiesen werden (Rojko et al., 1982; Rojko und Olsen, 1984). Linenberger et al. (1992) hielten es für möglich, dass auch feline Knochenmarkfibroblasten ein Reservoir für latente Infektionen sein könnten (Linenberger und Abkowitz, 1992).

In einer Studie konnte die Reaktivierbarkeit der Virusproduktion noch bei 56 % der Katzen 36 Wochen nach transients Virämie gezeigt werden (Madewell und Jarrett, 1983). 14 % dieser Katzen blieben langzeitinfiziert (Pacitti und Jarrett, 1985). Bei Pedersen et al. (1984) fiel der Anteil latent und reaktivierbar infizierter kultivierter Knochenmarkzellen - abhängig vom Virusstamm - von 32 bis 59 % auf 4 % innerhalb von 190 Tagen (Pedersen, 1984). Auch durch den das Komplementsystem schädigenden Anteil des Giftes der Kobra waren latente Infektion zu reaktivieren (Kraut et al., 1985). Bei der latenten Infektion einer säugenden Katze kam es nach lokaler Reaktivierung zur Ausscheidung des Virus über die Milch, ohne dass eine Virämie nachweisbar war (Pacitti et al., 1986). Es gab keine Hinweise darauf, dass das Virus im latenten Stadium horizontal übertragen wurde (Pacitti, 1987). Nicht gesichert sind die Erkenntnisse zur vertikalen Übertragung. Rojko et al. (1982) berichteten über zum Geburtszeitpunkt latent infizierte Welpen aus latent infizierten Muttertieren (Rojko et al., 1982). In einer anderen Studie war ein Welpe einer latent infizierten Katze zwei Wochen nach der Geburt virämisch (Pedersen, 1984). Eine weitere Studie konnte keine vertikale Übertragung des Virus auf die Nachkommen bei acht latent infizierten Katzen feststellen (Pacitti, 1987).

Manche Autoren sahen den persistierenden FOCMA-Antikörpernachweis bei ehemals virämischen Katzen als mögliche Folge einer latenten Infektion bzw. einer auf sehr niedrigem

Niveau ohne Virämie verlaufenden floriden FeLV-Infektion des Knochenmarkes (Rice und Olsen, 1981; Rojko et al., 1982).

Bei der einzigen groß angelegten Studie zur Prävalenz der FeLV-Infektion, in der sowohl phänotypische als auch genotypische Nachweisverfahren eingesetzt wurden, konnte bei 10 % von 597 überwiegend gesunden, ELISA-negativen Katzen aus der Schweiz das Vorhandensein von Provirus mit der PCR in Blutzellen demonstriert werden. Alle ELISA-positiven Tiere dieser Untersuchung waren auch PCR-positiv. Die Antigen-negativen, aber Provirus-positiven (latent infizierten) Tiere hatten einen durchschnittlich 300fach niedrigeren Provirusgehalt als p27-positive Tiere (Hofmann-Lehmann et al., 2001). In zwei experimentell infizierten Katzen, die sich in einem latenten Infektionsstadium befanden, konnte die Anzahl von Proviruskopien im Blut auf 2-166 Kopien/10⁴ Zellen bestimmt werden (Gomes-Keller et al., 2006). Spanische Wissenschaftler fanden mit einer nested-PCR in einer Gruppe von insgesamt 179 Katzen für die keine Angaben zu Erkrankungen gemacht wurden über 12 % Provirus-positiv in einer Gruppe von 131 ELISA-negativen Tieren (Arjona et al., 2006). Einer anderen Gruppe gelang es mit einer semiquantitativen real time-PCR bei 11 % der untersuchten Katzen, für die ebenfalls keine Angaben zu Erkrankungen gemacht wurden, Provirus bei negativem ELISA-Ergebnis und negativer Virusisolation im Blut zu finden. Von diesen latent infizierten Katzen wiesen 13 von 16 Anti-FOCMA-Antikörper auf. Bei drei von sechs darauf untersuchten Tieren konnten virusneutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Pinches et al., 2006).

2.9.3. Pathogenese

In experimentellen in vitro-Studien wurde gezeigt, dass sowohl produktive als auch latente Infektionen zu einer Depression der spezifischen und unspezifischen zellulären Immunabwehr führten (Lafrado et al., 1989; Lafrado und Olsen, 1986; Olsen et al., 1987; Rojko und Olsen, 1984). Die in der LTR-Region des Genoms vorliegenden basalen Promoter- und Enhancer-Sequenzen benötigten zur Entfaltung ihrer biologischen Wirkung keine Virusexpression (Ghosh et al., 2000). Die Integration von proviralen Sequenzen ins Wirtsgenom stellt eine infektiöse Mutation im Sinne einer Insertion dar, die zu veränderter Genexpression führen kann (Goff, 2001; Jun et al., 2000). Um eine Infektion vollständig zu überwinden, müssten alle durch Provirus parasitierten Zellen durch den Wirt eliminiert werden. Weiterhin zeigten Studien die mögliche Transaktivierung zweier zellulärer Gene, die für die Proteine

Kollagenase IV und Monocyte chemotactic protein I kodieren, über ein exogenes LTR-spezifisches Transkript (Abujamra et al., 2006; Ghosh und Faller, 1999; Ghosh et al., 2000). Eine Aktivierung der AP 1- und der NFkappaB-Signalkaskaden wurden nachgewiesen (Abujamra et al., 2006; Ghosh und Faller, 1999). Diese drei Mechanismen zeigen mögliche pathogenetische Grundlagen auf, die hinsichtlich der latenten Infektion nosologische Bedeutung erlangen könnten. Es ist daher bei Vorliegen einer latenten Infektion eine Disposition sowohl für Tumorerkrankungen als auch für andere FeLV-assoziierte Erkrankungen vorstellbar (siehe auch Abbildung 5.1)

2.9.4. Erkrankungen im Zusammenhang mit der latenten FeLV-Infektion

Ergebnisse aus verschiedenen Studien zu Latenz-assoziierten Erkrankungen sind allerdings widersprüchlich. McClelland et al. (1980) stellten keine Mortalitätsunterschiede beim Vergleich von FeLV-naiven Katzen mit Katzen, die nach initialem FeLV-Kontakt nicht mehr persistent virämisch waren, fest. Dabei war davon auszugehen, dass zumindest ein Teil dieser Tiere latent infiziert war (McClelland et al., 1980). Rekombinante, replikationskompetente FeLV-B-Stämme führten in einem Infektionsversuch zur Etablierung von latenten Infektionen des Knochenmarkes ohne signifikante Serokonversion und ohne Krankheiten auszulösen (Bechtel et al., 1999).

Von 26 latent infizierten Versuchskatzen entwickelte in einer bis zu vier Jahre dauernden Studie ein Tier eine Pyometra (Pacitti, 1987). Dagegen berichten Swenson et al. (1990) von einer erhöhten Krankheitsinzidenz bei nichtvirämischen Tieren mit nachgewiesenem FeLV-Kontakt (Swenson et al., 1990). Diesselbe Autorin wies bei einem latent infizierten Tier eine zyklische Neutropenie nach (Swenson et al., 1987). Auch Pedersen et al. (1984) berichteten über Erkrankungen bei Katzen nach Überstehen der virämischen Phase (Pedersen, 1984). FeLV-Antigen-negative Lymphosarkome traten signifikant häufiger nach vorherigem FeLV-Kontakt auf (Francis et al., 1979a; Francis et al., 1981; Hardy et al., 1980). Antigen-negative Lymphosarkome traten in einem Bestand mit hohem Durchseuchungsgrad bei zwei Katzen mit virusneutralisierenden Antikörpern auf (Francis et al., 1980). In zwei Fällen konnten latente Infektionen bei Katzen mit Lymphosarkomen durch Kultivierung von Knochenmarkzellen nachgewiesen werden, wohingegen dies in einer anderen Untersuchung misslang (Madewell und Jarrett, 1983; Rojko et al., 1982). In einer Untersuchung aus dem Jahr 1981 konnte durch Southern Blotting in sechs Antigen-negativen Lymphosarkomen

keine exogene U3-Sequenz entdeckt werden (Casey et al., 1981). Koshy et al. (1979) stellten dagegen fest, dass die Mehrheit der nichtvirämischen Katzen, gleichgültig ob sie gesund oder an einem Lymphosarkom erkrankt waren, U3-Sequenzen besaßen. Sie vermuteten als Grund dafür unter anderem weitverbreitete exogene FeLV-Infektionen ohne Virusexpression. Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten Jackson et al. (1993) in 16 von 30 Antigen-negativen Lymphosarkomen exogen erworbenes Provirus in Tumorzellen nachweisen (Jackson et al., 1993). Bei 86 australischen, ELISA-negativen Katzen mit Lymphosarkomen konnte in 22 % latentes Provirus im Tumorgewebe gefunden werden (Gabor et al., 2001). In einem Antigen-negativen Mycosis fungoides-Fall einer 8-Jahre alten Katze konnten die Autoren ebenfalls Provirus-DNS im Tumor nachweisen (Tobey et al., 1994). Im Gegensatz dazu waren in Fibrosarkomzellen und Zellen okulärer Sarkome keine U3-LTR-Provirussequenzen mit der PCR nachweisbar (Cullen et al., 1998; Ellis et al., 1996; Herring et al., 2001b). DNS-Proben zehn diffuser Irismelanome enthielten in einer Untersuchung keine exogenen FeLV-Sequenzen, wohingegen eine andere Arbeitsgruppe in drei DNS-Proben von insgesamt 36 Irismelanomen exogene U3-Sequenzen nachweisen konnte (Cullen et al., 1998; Stiles et al., 1999). In einer österreichischen Untersuchung konnte bei zwei von 15 nicht-antigenämischen Katzen exogenes U3 in Gewebe aus entzündeter Mundschleimhaut demonstriert werden. Eine Antigen-negative Thymusleukose sowie sechs intestinale Tumoren waren auch U3-negativ (Uthmann et al., 1996). Bei einer Katze mit einer Dermatose konnte eine latente FeLV-Infektion mit der PCR bestätigt werden (Favrot et al., 2005). In einer Gießener Untersuchung konnten latente Infektionen bei neun von neun untersuchten, immunhistologisch FeLV-negativen Tieren festgestellt werden. Dabei traten zwei Lymphosarkome, drei Myeloproliferationen, eine Mastzellen-Leukämie, eine Anämie mit Lymphozytose, eine Panleukopenie und ein Adenokarzinom apokriner Drüsen auf (Schwartz et al., 2001). Von Herring et al. (2001a) konnte an lebenden Katzenpatienten mit klassischen FeLV-assoziierten Krankheitsbildern der Verdacht auf latente Infektionen durch Provirusnachweis in Knochenmark und Blut mittels PCR nicht bestätigt werden (Herring et al., 2001a). Ein signifikanter Unterschied zwischen PCR-Ergebnis aus Blutzellen-DNS und Antigen-Elisa ergab sich bei einer weiteren Untersuchung von 68 Katzen nicht. Hier wies lediglich ein Tier von 32 Kriterien einer latenten Infektion auf. Es war 14 Jahr alt und litt an einer chronischen Neutropenie. Vielmehr ergab sich bei zwei Tiere mit positivem ELISA-Ergebnis ein negatives PCR-Ergebnis (Jackson et al., 1996). Miyazawa et al. (1997) konnten bei keiner von sieben Katzen mit negativem ELISA-Ergebnis exogene U3-Sequenzen in

Blutleukozyten mittels nested PCR nachweisen. Vielmehr konnten sie bei 26 von 39 ELISA-positiven Katzen, bei denen kein Virus isoliert werden konnte, auch kein Provirus im Blut nachweisen (Miyazawa und Jarrett, 1997).

2.9.5. Mögliche Latenz-Mechanismen

Man ging davon aus, dass die Replikation des Virus im latenten Stadium durch eine ausgeprägte zelluläre und humorale Immunantwort verhindert wird (Kraut et al., 1985; Lutz et al., 1980a; Rojko et al., 1982). In einer Studie waren in zwei Fällen reaktivierbare latente Infektionen die Folge einer Antikörperinfusion (Haley et al., 1985). Zusatz von Anti-FeLV-Antikörpern zu einer Knochenmarkkultur verhinderte die Reaktivierung von Virus (Pacitti, 1987).

Es gab auch Hinweise darauf, dass es sich um eine retrovirale Strategie im Sinne einer evolutionären Selektion handelt, Virusmutanten zu fördern, die möglichst wenig immunogenes Protein exprimieren und so der Immunantwort des Wirtes entgehen (Merezak et al., 2001). Infizierte Knochenmarkfibroblasten schienen z. B. nur wenig gp70-Antigen zu exprimieren und zeigten keine signifikante antikörperabhängige, komplement-vermittelte Zelllyse im Gegensatz zu hämatopoetischen Vorläuferzellen (Linenberger und Abkowitz, 1992). Latent HIV-infizierte Zellen zeigten keine signifikanten phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu nichtinfizierten, was zusammen mit der fehlenden Virusexpression ebenfalls zur Tolerierung durch das Immunsystem beitragen könnte (Brooks und Zack, 2002). Eine zellspezifische nichtpermissive (latente) Infektion muriner Fibroblasten mit einem speziellen Subtyp des MuLV scheint durch eine über den viralen U3-LTR-vermittelte Induktion eines zellulären Suppressionsfaktors zu entstehen, der gleichzeitig die Replikation eines anderen Retrovirus verhinderte (Gorska-Flipot et al., 1992). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es durch Verlust essentieller Provirussequenzen zur Replikationsdefizienz kommt. Replikationsdefekte, kryptische Proviren könnten durch den Verlust von Genomabschnitten im Verlauf einer Infektion entstehen (Svoboda et al., 1977). Ursache dafür waren unter anderem auch Rekombinationsvorgänge, wie sie auch für das FeLV bekannt sind. Eine Virusproduktion konnte hierbei ohne ein sogenanntes Helfervirus nicht mehr aktiviert werden (Besmer, 1983; Roy- Burman, 1995). Als molekulare Mechanismen latenter Infektionen wurden bei der HIV1-Infektion eine veränderte Chromatinstruktur bzw. epigenetische Modifikationen am Integrationsort, Mangel an Transkriptions- oder anderen Wirtsfaktoren

und auch die Möglichkeit eines ineffizienten mRNA-Export zur Proteinproduktion diskutiert (Jordan et al., 2003; Persaud et al., 2003). Svoboda et al. (2000) schildern in einem Übersichtsartikel aus dem Jahr 2000 einen Mechanismus der Überwachung des zellulären Genoms analog zu einer Immunantwort in Hinblick auf die vollständige oder teilweise Abschaltung transkriptioneller Aktivität retroviraler Sequenzen durch Methylierung („provirus silencing“) in ausdifferenzierten Zellen (Svoboda et al., 2000). Beim Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV), einem RNA-Virus, das nicht der Retrovirusfamilie angehört, wurde postuliert, dass die Persistenz viraler DNA zur Aufrechterhaltung eines immunologischen Gedächtnis beitragen könnte (Klenermann et al., 1997).

3. Material und Methoden

3.1. Sektionskatzen

In die Untersuchung wurden 302 Katzen einbezogen, die zur Sektion an das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Zeitraum von 7. Mai 2002 bis 8. Dezember 2003 überwiesen wurden. Im Folgenden werden diese Katzen Sektionskatzen genannt.

Die Aufnahme der Tiere in die vorliegende Studie erfolgte kontinuierlich und unabhängig von anamnestischen Angaben, Signalement, Herkunft, pathologisch-anatomischer, pathologisch-histologischer sowie ätiologischer Diagnosen. Längere Pausen bei der Probenentnahme entstanden nur durch Urlaubszeiten des Doktoranden.

Angaben zu Anamnese, Signalement und Herkunft der Tiere wurden den jeweiligen Untersuchungsanträgen entnommen.

Ergebnisse pathologisch-anatomischer, pathologisch-histologischer sowie weiterführender Untersuchungen wurden nach Abschluß der Untersuchungen den Sektionstagebüchern des Institutes für Veterinär-Pathologie entnommen.

Die virologischen Untersuchungen erfolgten am Institut für Virologie, die bakteriologischen Untersuchungen am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und die parasitologischen Untersuchungen am Institut für Parasitologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

3.2. Sektion

Die Zerlegung der Tierleichen erfolgte in der Sektionshalle des Institutes für Veterinär-Pathologie nach anerkannten Methoden der Zergliederungskunst im diagnostischen Routineablauf. Die Erhebung der pathologisch-anatomischen und histopathologischen Diagnosen erfolgte durch den dienstverehenden Sekanten und den zuständigen Diagnostikleiter.

3.3. Probenentnahme und –aufbereitung

3.3.1 Proben für die immunhistologische Untersuchung auf das Vorliegen einer FeLV-Infektion

3.3.1.1. Sektionskatzen

Für den immunhistologischen Nachweis von FeLV-Antigen im Gewebe wurden Teile folgender Organe entnommen:

1. Knochenmark des Oberschenkelknochens
2. Mesenteriallymphknoten
3. Milz
4. Jejunum
5. Thymus (falls ausgebildet)
6. Tumorgewebe (falls vorhanden)

Die genannten Organe wurden 18-36 Stunden in 10 % Formalin fixiert. Danach erfolgte das Zuschneiden der Organe in ein oder zwei Einbettkapseln, die Entwässerung und Paraffineinbettung im institutseigenen Einbettautomaten Tissue Tek[®]-VIP (Miles Scientific, Naperville; Illinois/USA) (s. Tabelle 3.1)

Im Anschluß an die Paraffineinbettung erfolgte die Herstellung 2-3 µm dicker histologischer Schnitte (Mikrotom HM 335E, Microm GmbH, Walldorf), die nach Streckung im Wasserbad bei 60°C (Wasserbad WB 10, Willi Memmert, Fabrik für Laboratoriumsgeräte, Schwabach) auf Objektträger (SuperFrost[®] Plus, Menzelgläser Braunschweig) aufgezogen und 18-24 Stunden luftgetrocknet wurden. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei 4°C über Nacht, wenn die Immunhistologie nicht direkt im Anschluß an die Trocknungszeit durchgeführt wurde.

Tabelle 3.1: Programm für die Entwässerung und Einbettung der formalinfixierten Gewebeproben

Station	Medium	Zeit (gesamt: 15:30h)	Temperatur
1	Formalin 10 %	1:00 h	40°C
2	Ethanol 50 %	0:30 h	40°C
3	Ethanol 70 %	1:00 h	40°C
4	Ethanol 80 %	1:00 h	40°C
5	Ethanol 90 %	1:00 h	40°C
6	2-Propanol 100 %	1:00 h	40°C
7	2-Propanol 100 %	1:00 h	40°C
8	Roti-Histol [®]	1:30 h	40°C
9	Roti-Histol [®]	1:30 h	40°C
10	Roti-Histol [®]	1:30 h	40°C
11	Paraffin	1.00 h	60°C
12	Paraffin	1:00 h	60°C
13	Paraffin	1:00 h	60°C
14	Paraffin	1:30 h	60°C

3.3.1.2. Immunhistologische Kontrollen

Als Positivkontrolle diente ein formalinfixiertes, paraffineingebettes Stück aus der Milz einer Katze, die wiederholt FeLV-positiv getestet wurde und ebenfalls aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie stammte. Diese Kontrolle wurde auch in der Routinediagnostik als FeLV-Kontrolle eingesetzt.

Als Negativkontrolle dienten Folge- oder Vorgängerschnitte aus dem gleichen Paraffinblock, aus dem auch die Schnitte für die Inkubation mit den FeLV-spezifischen Antisera hergestellt wurden. Er wurde mit einem Kontroll-Antikörper gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten inkubiert (Hirschberger, 1987) (siehe Kapitel 3.4.).

3.3.2. Proben für die DNS-Aufbereitung

3.3.2.1. Knochenmark (Sektionskatzen)

Zur DNS-Gewinnung wurde der bei der Sektion intakt gebliebene Oberschenkelknochen eröffnet und das Knochenmark mittels steriler, in 1N NaOH gewaschener Pinzette und Schere entnommen. Das Knochenmark wurde in sterile Petrischalen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt, anschließend unverzüglich in zylinderförmigen Hütchen aus Aluminiumfolie mit einem Durchmesser von 1,8 cm und einer Höhe von ca. 3 cm mit Tissue Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) ca. 0,5 cm überschichtet und in einer durch flüssigen Stickstoff gekühlten, den Boden ca. 1 cm hoch mit Isopentan (2-Methylbutan, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm) bedeckten Kammer aus Aluminium schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Aufbewahrung in Form dieser Gefrierblöcke bei -80° C. Für die DNS-Extraktion zur PCR-Analyse wurde das Gewebe vorbereitet, indem 20 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt (2700-Frigocut, Reichert-Jung/ Lahntechnik GmbH) und in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) bis zu 100 mg Gewebe eingewogen wurden. Für die DNS-Extraktion nicht im direkten Anschluß an das Einwiegen statt erfolgte eine Lagerung bei -80°C.

3.3.2.2. Molekularbiologische Kontrollen

3.3.2.2.1. Negativkontrolle

Als Negativkontrolle für die PCR zum FeLV-Nachweis diente in allen Fällen Rinder-DNS, die von einem Tier aus dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie stammte. DNS wurde aus Muskelgewebe gewonnen und behandelt wie die Knochenmarkproben der Katzen. Außerdem diente teilweise aus nicht FeLV-infizierten feline Embryozellen (FE-Zellen) gewonnene DNS (freundlicherweise überlassen von D. Schwartz, Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-universität Gießen) als Negativkontrolle.

3.3.2.2.2. Positivkontrolle

Als positive Kontrollprobe diente die permanente, in Suspensionskultur wachsende lymphomatische Lymphoblasten-Zelllinie FL74-UCD-1. Sie war aus einem Lymphosarkom der Niere einer FeLV-inokulierten Katze etabliert worden und ist persistent mit dem FeLV-Stamm KT-FeLV-UCD-1 infiziert (Theilen et al., 1969).

3.3.2.2.2.1 Kultivierung der FL74-Zellen

Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen (IWAKI, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus 90 % RPMI-Medium (RPMI 1640; PAA-Laboratories, Cölbe), dem 9 % Fetales Kälberserum (FKS; PAA-Laboratories GmbH, Cölbe) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (P/S; PAA-Laboratories GmbH, Cölbe) zugesetzt wurden (siehe Anhang). Die Inkubation der Zellkultur erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einem mit 5 % CO₂ angereicherten Luftgemisch (Function line™, Begasungsbrutschrank Typ B5060 EK CO₂, Heraeus Instruments GmbH, Hanau).

Es erfolgte jeden dritten bis fünften Tag eine Kombination aus Mediumwechsel und Passagierung in folgenden Schritten. 9 ml frisches Nährmedium wurde in eine neue Kulturflasche vorgelegt. Die gesamte Zellsuspension wurde mit 10 ml steriler, wattegestopfter Glaspipette durch vorsichtiges dreimaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der resuspendierten, alten Zellsuspension in 9 ml frisches Nährmedium überführt. Nach mehrmaligem Wiederholen der Schritte 1-3 zur Herstellung mehrerer neuer Suspensionskulturen erfolgte abschließend der Volumenausgleich des entnommenen Mediums der Ursprungkultur mit frischem Kulturmedium auf 10 ml.

Wenn der Zellgehalt ausreichend war, was aus der Trübung des Kulturmediums gefolgert wurde, erfolgte die Ernte der Zellen für die DNS-Extraktion. Dafür wurden die 10 ml Zellsuspension jeder Kulturflasche wie oben geschildert resuspendiert, in 14 ml fassende Glaszentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei 350 x g bei 4°C zentrifugiert (Rotina 48 RC, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen). Je nach Pelletgröße erfolgte eine Resuspension in 3-5 ml Kulturmedium. Diese Zellsuspension wurde zu je 1 ml in DNase- und RNase-freie 2 ml Mikrozentrifugengefäße überführt (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) überführt und nun bei 15000 x g für 20 Sekunden abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5415 C; Eppendorff AG, Hamburg)

3.4. FeLV-Immunhistologie

3.4.1 Nachweis von gp70 und p27

Zum Nachweis von FeLV-Antigen diente die indirekte Immunperoxidase-Technik (IPO) (Kovacevic et al., 1997; Reinacher und Theilen, 1987). Dabei wurde ein Gemisch zweier monoklonaler Maus-Primärantikörper gegen die FeLV-Strukturproteine gp70 und p27 verwendet. Zur Detektion wurde ein Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper genutzt (siehe Tabellen 3.2 und 3.3). Die Negativkontrollschnitte wurden primär mit einem Antikörper (T1) gegen ein Oberflächenantigen von T-Lymphozyten des Huhnes inkubiert (Hirschberger, 1987). Ansonsten wurden die Kontrollschnitte genau wie die restlichen Schnitte behandelt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte, wenn sie nicht auf die unten beschriebenen speziellen Vorrichtungen aufgebracht waren, in Glasküvetten bei Raumtemperatur. In diesen Glasküvetten waren alle Schnitte durch ein Flüssigkeitsvolumen von 180 ml vollständig bedeckt.

1. Entparaffinieren der Schnitte:

- a) Xylol-Ersatz (Roti-Histol®; Karl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe): 3 x 5 Minuten
- b) Isopropanol: 2 x 3 Minuten
- c) 96 % Ethanol: 3 Minuten
- d) 80 % Ethanol: 3 Minuten

2. Hemmung/Inaktivierung der endogenen Peroxidase

Die Vorbehandlung mit Methanol/H₂O₂ diente der Hemmung der endogenen Peroxidase, um unspezifische Signale nach der Detektionsreaktion zu unterdrücken.

- Methanol mit 0,5 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol® 30 % H₂O₂ p.a.; 7210, Merck KGgA, Darmstadt): 30 Minuten

3. Schnitte in TBS waschen

- TBS (s. Anhang): 10 Minuten

4. Vorbehandlung

- TUF® (Target Unmasking Fluid®; Kretech Diagnostics) 1:3 in Aqua dest.,
 - TUF®-Gebrauchslösung vorwärmen im Wasserbad (97°C)
 - Objektträger 10 Minuten in vorgeheiztem Wasserbad bei 97°C inkubieren
 - Objektträger 15 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen

5. Waschen der Schnitte in TBS (s. Anhang)

- TBS (s. Anhang): 10 Minuten

6. Aufsetzen der Objektträger auf Coverplates™ (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einsetzen in deren Halterung

7. Blocken unspezifischer Proteinbindung

- a) Auftragen von 100 µl TBS mit 20 % Schweineserum (SS) pro Objektträger
- b) 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur

8. Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe auch Tabelle 3.2)

- a) Auftragen von jeweils 100 µl eines Antikörpergemisches aus Maus-Anti-FeLV p27 (1:100 in TBS/20 % SS) und Maus Anti-FeLV gp70 (1:200 in TBS/20 % SS) bzw. des Kontrollantikörpers T1 (1:100 in TBS/20 % SS) als Negativkontrolle
- b) Inkubation über Nacht (zwischen 14 Stunden und 18 Stunden) bei 4-5° C

9. Schnitte mit TBS waschen (s. Anhang)

- TBS 3 x 5 Minuten

10. Inkubation mit Sekundärantikörper (siehe auch Tabelle 3.3)

- a) Auftragen von 100 µl des peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers (1:100 in TBS mit 20 % SS Kaninchen Anti-Maus IgG-PO (DAKO Diagnostika GmbH; Hamburg)
- b) Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur

11. Schnitte mit TBS (3 x 5 Minuten) waschen (s. Anhang) und Herausnahme aus den Coverplates™

12. Detektionsreaktion

- Inkubation der Schnitte für 10 Minuten in einer 0,5 %igen 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Lösung (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; siehe Anhang) mit 0,01 % H₂O₂.

13. Schnitte in TBS waschen (s. Anhang)

- TBS 3 x 5 Minuten

14. Schnitte 5 Minuten in Aqua dest. waschen

15. Gegenfärbung

a) Papanicolaous Hämatoxilin (Papanicolaou 1b; E.Merck, Darmstadt, 1/10 in aqua dest.) 10- 20 Sekunden

b) in Leitungswasser bläuen 5 Minuten

16. Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe

a) 50 % Ethanol: 3 Minuten

b) 70 % Ethanol: 3 Minuten

c) 80 % Ethanol: 3 Minuten

d) 96 % Ethanol: 3 Minuten

e) Isopropanol: 6 (2 x 3) Minuten

f) Xylol-Ersatz (Roti-Histol®; Karl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe): 6 (2 x 3) Minuten

g) Xylol: 3-5 Minuten

17. Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (Tissue Tek®, Modell 4765; Vogel GmbH, Giessen)

Tabelle 3.2: Primärantikörper, immunhistologische Nachweismethode, Vorbehandlungsmethode und Sera zum Blocken

Antikörper/Klon	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung, Methode	Vorbehandlung, Blocken
Maus α -gp70 (Klon C11D82i)	Custom Monoclonals Int.; Sacramento, CA., USA	1:200 in TBS/20 % SS, IPO	TUF®, 20 % SS
Maus α -p27 (KlonPF12J-10A)	Custom Monoclonals Int.; Sacramento, CA. USA	1:100 in TBS/20 % SS, IPO	TUF®, 20 % SS
Kontrollantikörper T1 (Oberflächenantigen von Thymus- Lymphozyten des Huhnes)		1:100 in TBS/20 % SS	TUF®, 20 % SS

Tabelle 3.3. Sekundärantikörper, Bezugsquelle, Verdünnung

Antikörper	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung
Kaninchen α -Maus IgG-PO	DAKO Diagnostika GmbH; Hamburg (P0161)	1:100 in TBS/20 % SS

3.4.2. Auswertung der FeLV-Immunhistologie

Die Auswertung erfolgte qualitativ. Als positives Immunhistologie-Ergebnis galt ein dunkelbraunes feinkörniges zellassoziertes Präzipitat (s. Abb. 9.6).

3.5. DNS-Extraktion

Das Prinzip der DNS-Extraktion beruhte auf der Lyse der kernhaltigen Zellen mittels anionischen Detergentien. Anschließend erfolgte eine Salzpräzipitation der Proteine. Die DNS wurde dann mit Alkohol gefällt und gewaschen und in die zum verwendeten Kit gehörige Pufferlösung (TE-Puffer) aufgenommen.

Für die DNS-Extraktion wurde das in Tissue Tek® O.C.T.™ Compound eingebettete Knochenmark am Gefriermikrotom (2700-Frigocut; Reichert-Jung/Lahntechnik GmbH, Wetzlar) in 20 µm dicke Schnitte geschnitten und zu jeweils 60-100 mg je Probe in 1,5 ml Mikrozentrifugengefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) gesammelt und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert. Die Extraktion erfolgte mit dem Puregene® DNS-Extraktionskit (Gentra Systems Inc., Minneapolis, USA) nach dem Standardprotokoll für Gewebe, angepasst an die jeweilige Menge eingesetzten Gewebes.

Wenn viel Blutbeimengung vorhanden war, wurde das Protokoll für Gesamtblut verwendet.

Nach Aufnahme der DNS in der beigegeführten Pufferlösung erfolgte eine Rehydrierung über Nacht bei Raumtemperatur. Im Anschluß wurde eine Konzentrationsbestimmung jeder DNS-Probe in einer Verdünnung von 1/1000 in TE-Puffer mittels UV-Absorptionsspektroskopie bei 260 nm (UV-1202® Spektralphotometer, Shimadzu Corporation, Japan) durchgeführt.

Je ein Aliquot der DNS-Proben wurde danach auf eine Gebrauchskonzentration von 50 ng/µl bzw. 125 ng/µl durch Zugabe des entsprechenden Volumens der Puregene®-DNS-Rehydrierungslösung (Gentra Systems Inc., Minneapolis, USA) eingestellt.

Im Rahmen einer Agarosegeleelektrophorese wurden 18 zufällig ausgewählte DNS-Proben auf ihren Fragmentierungsgrad kontrolliert. Dazu wurden jeweils 1,5 µl DNS-Lösung mit 0,3 µl Ladepuffer gemischt und in die Gelschlitze gegeben. Die Auftrennung erfolgte 2 Stunden lang in einem 0,7 % Agarosegel bei 80 V. Als Größenmarker diente ein λ HIND III-Größenmarker (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) (siehe Abb. 9.5).

3.5.1. DNS-Extraktion für Gewebe

Diese Vorgehensweise wurde bei den Proben durchgeführt, bei denen makroskopisch nur wenig Blutbeimengungen zu erkennen waren. Außerdem wurde die DNS der Muskelprobe für die Negativkontrolle nach dem folgenden Protokoll isoliert.

1. Zellyse

- a) Zugabe von 600 μ l Cell Lysis Solution pro 60-100 mg Knochenmark-/Muskelgewebe
- b) Suspendieren durch vorsichtiges auf- und abpipettieren und falls erforderlich durch 5 Spritzenhübe durch eine sterile 20-G Luer-Kanüle in eine 1ml Luer-Spritze.
- c) Inkubation des Lysats für 60 Minuten bei 65°C, dabei mehrmals wenden und mit den Fingerspitzen antippen

2. RNase-Behandlung

- a) Zugabe von 3 μ l RNase A Solution (Konzentration: 4mg/ml) pro 60-100 mg eingesetztem Gewebe zum Lysat, mischen durch 25maliges Wenden
- b) Inkubation für 15 Minuten bei 37°C

3. Proteinfällung

- a) Auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- b) Zugabe von 100 μ l Protein Precipitation Solution/10-50 mg Gewebe
- c) 20 Sekunden heftig vortexen
- d) Bei 16000 x g für 3 Minuten zentrifugieren

4. Fällern und Waschen der DNS

- a) Zugabe des Überstandes aus Punkt 3 in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit 600 μ l 100 % Isopropanol pro 60-100 mg eingesetztem Geweb und 50maliges Wenden des Mikrozentrifugenröhrchens
- c) Bei 16000 x g für 1 Minute zentrifugieren und Überstand abgießen
- d) Zugabe von 600 μ l Ethanol pro 60-100 mg eingesetztem Knochenmark und ca. 20maliges Wenden des Mikrozentrifugenröhrchens
- e) Bei 16000 x g für 1 Minute zentrifugieren und Überstand vorsichtig abgießen
- f) Bei Raumtemperatur 10 bis 15 Minuten lufttrocknen

5. Rehydrierung der DNS

- a) Zugabe von 25-100 μ l DNA Hydration Solution
- b) Rehydrieren bei Raumtemperatur über Nacht

6. Lagerung der DNS bei -20° C oder als Gebrauchslösung bei 2-6°C

3.5.2. DNS-Extraktion aus blutreichem Knochenmark

1. Zelllyse

- a) Zugabe von 1800 µl RBC Lysis Solution pro 60-100 mg Knochenmark und Mischen durch mehrmaliges Wenden
- b) 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- c) Bei 16000 x g 20 Sekunden lang zentrifugieren und Überstand vorsichtig bis auf einen Rest von 10-20 µl abpipettieren
- d) Zellpellet durch heftiges Vortexen in Restflüssigkeit resuspendieren
- e) Zugabe von 600 µl Cell Lysis Solution zur Zellsuspension und Mischen durch auf- und abpipettieren

2. Schritte 2-6 wie im Protokoll für die DNS-Extraktion aus Gewebe angegeben

3.5.3. DNS-Extraktion aus Zellkultur

1. Zelllyse

- a) Zentrifugation von Zellsuspension mit 1–2 Millionen Zellen bei 15000 x g für 5 Sekunden
- b) Nach Entfernen des Überstands bis auf einen Rest von etwa 10–20 µl heftig Vortexen und Zellpellet vollständig resuspendieren
- c) Zugabe von 300 µl Cell Lysis Solution pro 1-2 Millionen Zellen
- d) Homogenisieren durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

2. Schritte 2-6 für die oben angegebene Zellzahl wie im Protokoll für die DNS-Extraktion für Gewebe angegeben

3.6. PCR

3.6.1. Herstellung des DEPC-Wassers für die molekularbiologischen Untersuchungen

Ein Liter H₂O (aqua bidest.) wurde mit 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC, Fluka Chemie AG, Buchs, CH) versetzt und für zwölf Stunden bei Raumtemperatur in einem nicht verschlossenem Gefäß inkubiert. Anschließend wurde das DEPC-Wasser für 15 Minuten bei 134°C autoklaviert (VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 250 T, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim).

3.6.2. Desoxytrinukleotidtriphosphate als Grundbausteine der PCR

Durch den Hersteller wurden die Einzeldesoxynukleotidtriphosphate dATP, dGTP, dTTP, dCTP in wässriger Stammlösung in einer Konzentration von 100 mM geliefert (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Zur Herstellung eines gebrauchsfertigen Prämixes mit einer Gebrauchskonzentration von je 10 mM wurden folgende Komponenten zusammengefügt:

100 µl	dATP
100 µl	dGTP
100 µl	dCTP
100 µl	dTTP
600 µl	DEPC-H ₂ O

Aus dieser Stammlösung wurden Aliquots von 100 µl in 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.6.3. PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNS (gp70-PCR)

Um falsch negative Testergebnisse aufgrund mangelhafter Beschaffenheit der DNS (PCR-Inhibitoren, Degradation) zu vermeiden, wurden alle DNS-Proben mittels eines etablierten PCR-Systems durch Amplifikation eines 341 bp großen Fragment aus dem gp70-Bereich

endogener FeLV-verwandter Retroviren bzw. FeLV Subtyp B getestet, da alle Katzen dafür positiv sein müssten (Schwartz et al., 2001). Aufgrund von Sequenzhomologie zu exogen erworbenen Proviren wurden diese ebenfalls amplifiziert. Dabei bestand zwischen den Sequenzen der endogenen FeLV verwandten Retroviren und dem FeLV-Subtyp B in dem amplifizierten Bereich kein Längenunterschied, so dass keine Unterscheidung mittels Gelelektrophorese möglich war (Schwartz et al., 2001).

Die Amplifikation des entsprechenden gp70-Abschnittes der FeLV-Subtypen A und/oder C lieferte dahingegen ein Fragment mit der Länge von nur 305 bp (Schwartz et al., 2001).

3.6.3.1. Primersequenzen und –verdünnung

Die folgende gp70-spezifische Primerkombination wurde nach Literaturangabe via Internet bestellt und als Lyophilisat geliefert (MWG Biotech AG, Ebersberg) (Schwartz et al., 2001).

Forward Primer: 5'-TATACCGTCAGGATAGACC-3' (sense)

Reverse Primer: 5'-CCAACAACAACTAAGACTGTTG-3' (antisense)

Das vom Hersteller angegebene Volumen zur Erlangung einer Primerstammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl DEPC-Wasser wurde hinzugegeben, danach die dadurch tatsächlich erreichte Konzentration mittels UV-Spektroskopie gemessen (GeneQuant II; Amersham Biosciences, Freiburg). Basierend auf diesem Messergebnis erfolgte die Zugabe von DEPC-Wasser, um aus dieser Primerstammlösung Aliquots von 100 µl mit einer Konzentration von 25 pmol/µl zum Einsatz als Gebrauchslösung zu verdünnen.

Das zuzugebende Volumen Primerstammlösung errechnete sich folgendermaßen:
Verdünnungsfaktor $y = \frac{25 \text{ pmol/}\mu\text{l}}{100 \text{ pmol/}\mu\text{l}}$: tatsächlich gemessene Konzentration in pmol/µl

Benötigtes Volumen Primerstammlösung in µl: $100 \cdot y$

Das zuzugebende Volumen DEPC-Wasser errechnete sich daraus wie folgt:

Benötigtes Volumen DEPC-Wasser in µl = $100 - (100 \cdot y)$

Die 100 µl Aliquots wurden in 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.6.3.2. PCR-Ansatz für die gp70-PCR

3.6.3.2.1. Mastermix

Das Ansetzen und Aufteilen des PCR-Mastermixes erfolgte nach Auftauen der bei -20°C gelagerten Reagentien auf Eis in einem speziell dafür vorgesehenen Raum. Pro Reaktionsgefäß (Reaktionsgefäße, ultradünn 0,2 ml; Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) wurden 23,5 μl Mastermix vorgelegt. Folgende Bestandteile wurden dafür nach kurzem Anzentrifugieren (Microcentrifuge SD; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) je 23,5 μl Mastermix gemischt (Tabelle: 3.4).

Tabelle 3.4: Mastermix gp70-PCR/DNS-Probe

Komponente	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge	Hersteller
10x Reaktionspuffer	2,5 μl	1x	NatuTec GmbH
dNTP-Mix Gebrauchslösung (je dNTP 10 mM)	0,5 μl	dATP:dTTP:dGTP:dCTP (1:1:1:1), je 0,2 mM	Peqlab Biotechnologie GmbH
DEPC- H ₂ O	18,375 μl		
Forward Primer (1) (10 pmol/ μl)	1 μl	0,4 pmol/ μl	MWG Biotech AG
Reverse Primer (10 pmol/ μl)	1 μl	0,4 pmol/ μl	MWG Biotech AG
TAQ-DNA Polymerase (5 U/ μl)	0,125 μl	0,75 U	NatuTec GmbH
Gesamtvolumen	23,5 μl		

3.6.3.2.2. Kontrollen und Proben

Zum Mastermix wurden in einem separaten Raum jeweils 1,5 μl der auf 50 ng/ μl verdünnten DNS-Proben bzw. der Kontrollen pipettiert.

Als Positivkontrolle diente DNS der persistent FeLV-infizierten Zelllinie FL74-UCD-1 (Theilen et al., 1969). Als Nullkontrolle diente DEPC-Wasser.

3.6.3.3. PCR-Zyklus und Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese

3.6.3.3.1. PCR-Zyklus

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte im Multicycler PTC-200™ (MJ Research, Inc., USA) nach folgendem Programm:

1. 94°C 2 Minuten
2. 94°C 1 Minute
3. 47,9°C 1 Minute
4. 72°C 1 Minute
5. 34 malige Wiederholung der Schritte 2. bis 4.
6. 72°C 5 Minuten
7. 4°C ∞

3.6.3.3.2. Agarosegelelektrophorese und Auswertung

Die Darstellung der 305 und 341 bp großen Banden erfolgte nach Auftrennung in einem 2 %igem Ethidiumbromid enthaltendem Agarosegel (siehe Anhang) in 1x TBE-Puffer (Trisborat-EDTA; siehe Anhang).

Vor dem Befüllen der Schlitze wurde das erstarrte Agarosegel in die Elektrophoresekammer („Midi“, horizontal; Keutz, Reiskirchen) eingebracht und mit 1x TBE-Puffer circa 1 cm überschichtet.

Nach Ablauf des gesamten PCR-Zyklus erfolgte eine Mischung von 15 µl pro PCR-Ansatzes mit je 3 µl eines Xylencyanol-Ladepuffers (siehe Anhang) und das Einfüllen dieser Mischung in die dafür vorgesehenen Schlitze im Gel. Als DNS-Größenstandard wurde mit dem Enzym MSP I geschnittene pUC19-Plasmid DNS aufgebracht (Carl Roth GmbH, Karlsruhe).

Mittels eines elektrischen Spannungsgebers (Consort, Belgien) wurde eine Spannung von 120 V für 36 Minuten angelegt. Es folgte die Dokumentation des Ergebnisses nach Sichtbar-

machung der Banden durch UV-Transillumination (230 nm) (Vilber Lourmat, Torcy, FR) und Digitalfotografie mit dem Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Eastman Kodak Company, USA).

Die Gelanalyse erfolgte mit der Software 1D Image Analysis Software Windows Version 3.0 (Kodak Digital Science™, Eastman Kodak Company, USA). Als gp70-positive und damit als PCR-geeignete DNS-Proben wurden Proben mit einer Bande bei 341 bp gewertet. Eine zusätzliche Bande bei 305 bp zeigte darüber hinaus eine FeLV-Infektion mit dem FeLV-Stamm A und/oder C an (Schwartz et al., 2001).

3.6.4. PCR zum Nachweis der FeLV-Infektion (U3-PCR)

Aufgrund umfangreicher Sequenzhomologien zwischen dem Felinen Leukämievirus und den endogenen FeLV-verwandten Retroviren der Hauskatze eignet sich für die Diagnostik einer Infektion mittels PCR nur der Nachweis eines DNS-Abschnittes aus dem U3-LTR Bereich des proviralen Genoms, da nur hier deutliche Sequenzunterschiede vorhanden sind und daher durch die Primerpaare keine endogenen Sequenzen amplifiziert werden, was zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte (siehe Literaturübersicht). Diese U3-PCR wurde als seminested-PCR konzipiert und in zwei getrennte, hintereinandergeschaltete PCR-Reaktionen (1. Reaktion und 2. (seminested) Reaktion) aufgeteilt. Das Prinzip einer seminested PCR ist schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt. In der 2. Reaktion erfolgte, wie dort gezeigt, eine Neukombination des reverse Primers der 1. Reaktion mit einem anderen forward Primer, der innerhalb des Bereiches hybridisierte, den die beiden Primer aus der 1. Reaktion begrenzten. Die 2. Reaktion wurde nur durchgeführt, wenn eine Probe nach der 1. Reaktion negativ blieb. Die gesamte U3-PCR wurde einmal wiederholt, wenn eine Probe in der ersten Gesamt-PCR (1. und 2. Reaktion) negativ blieb. Wurde ein Tier in der 2. Reaktion der ersten Gesamt-PCR positiv, so wurde die 1. Reaktion der U3-PCR mit dieser Probe einmal wiederholt (Abbildung 3.1).

Abbildung 3.1: Fließschema zur Durchführung der 1. und 2. PCR (mit 1. und 2. Reaktion)
zum Nachweis der FeLV-Infektion

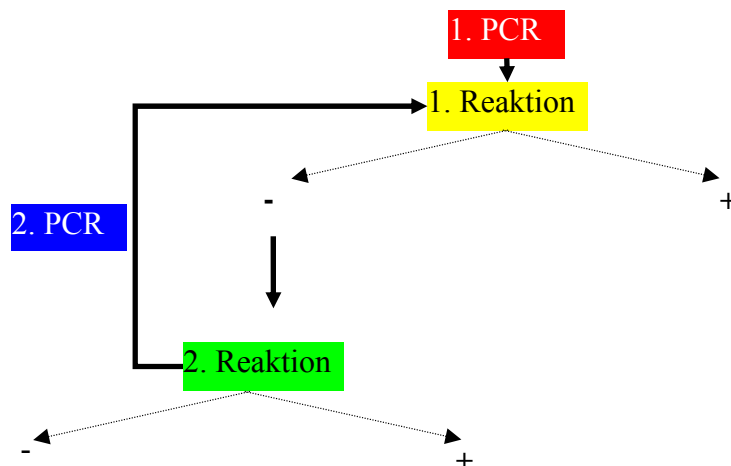
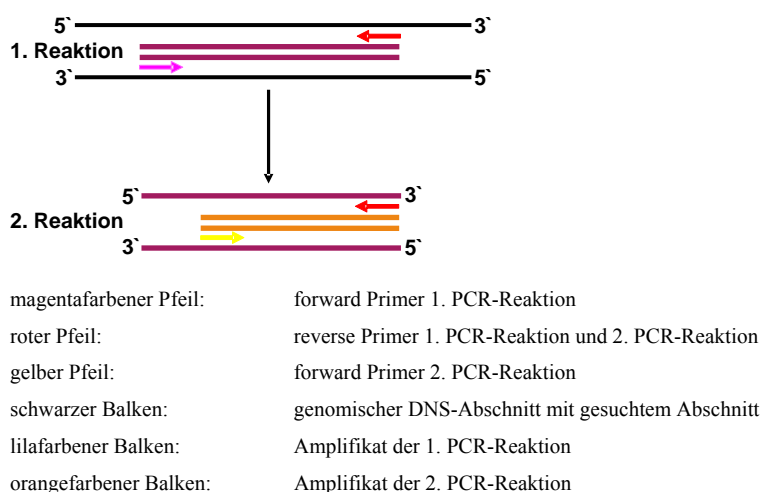


Abbildung 3.2: Prinzip der seminested PCR (schematisch)



3.6.4.1. Primersequenzen und –verdünnung (1. Reaktion)

Die 1. PCR-Reaktion erfolgte mit einer Kombination zweier Primer, deren Sequenzen zwei etablierten und publizierten PCR-Systemen zum U3-Nachweis entstammten, nachdem sie mittels des Computerprogrammes OLIGO 4. 0 (Molecular Biology Insights, Inc.; USA) auf Kompatibilität überprüft worden waren. Sie wurden wie die Primer für die gp70-PCR bei der Firma MWG-Biotech bestellt und als Lyophilisat geliefert. Die Primer wurden wie für die gp70-PCR geschildert aufgelöst und anschließend verdünnt. Die Primersequenzen lauteten folgendermaßen:

Forward Primer (1. Reaktion): 5'-TTACTCAAGTATGTTCCCATG-3' (sense)

(Jackson et al., 1993)

Reverse Primer: 5'-AGGTCGAACTCTGGTCAACT-3' (antisense)

(Schwartz et al., 2001)

3.6.4.2. PCR-Ansatz für die U3-PCR (1. Reaktion)

Das Ansetzen und Aufteilen des PCR-Mastermixes erfolgte wie für die gp70-PCR beschrieben. Pro Reaktionsgefäß wurden allerdings 23 µl Mastermix vorgelegt. Folgende Bestandteile wurden dafür nach kurzem Anzentrifugieren (Microcentrifuge SD; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) je 23 µl Mastermix gemischt. (Tabelle: 3.5)

Tabelle 3.5: Mastermix U3-PCR (1.Reaktion)/DNS-Probe

Komponente	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge	Hersteller
10x Reaktionspuffer	2,5 µl	1x	NatuTec GmbH
DEPC-H ₂ O	17,875 µl		
dNTP-Mix Gebrauchslösung (je dNTP 10 mM)	0,5 µl	dATP:dTTP:dGTP:dCTP (1:1:1:1), je 0,2 mM	Peqlab Biotechnologie GmbH
Forward Primer (1) (10 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol/µl	MWG Biotech AG
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol/µl	MWG Biotech AG
TAQ-DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl	0,75 U	NatuTec GmbH
Gesamtansatz	23 µl		

3.6.4.3. Kontrollen und Proben

Als Probe wurden 2 µl der auf 125 µg/ml eingestellten Knochenmark-DNS-Lösung eingesetzt. Die Probenzugabe erfolgte in einem separierten Raum.

Es wurde jeweils als Nullkontrolle DEPC-Wasser mitgeführt. Die Nullkontrolle blieb während der gesamten Zeit der Probenzugabe in dem dafür vorgesehenen Raum geöffnet, um auch Kontaminationen während des Pipettiervorgangs anzuzeigen. Als Positivkontrolle diente FL74-DNS-Lösung. Als Negativkontrollen dienten Rinder-DNS und DNS aus FE-Zellen.

Es wurden getrennte Pipettensätze für Mastermix-Ansatz und Zugabe der Proben verwendet.

Die Pipetten, mit denen die Proben zugegeben wurden, sowie die Halterungen für die PCR-Reaktionsgefäße wurden vor jeder neuen PCR UV-bestrahlt (GS Gene Linker® UV-Chamber; BioRAD-Laboratories, USA)

3.6.4.4 PCR-Zyklus (1. Reaktion) und Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese

3.6.4.4.1 PCR-Zyklus (1. Reaktion)

Folgendes Programm wurde auf dem Multicycler PTC-200 (MJ Research, Inc., USA) programmiert und durchlaufen:

1. 94°C 120 Sekunden
2. 92°C 60 Sekunden
3. 55°C 30 Sekunden
4. 72°C 30 Sekunden
5. 34malige Wiederholung der Schritte 2. bis 4.
6. 72°C 60 Sekunden
7. 4°C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler (max. 240 Minuten)

3.6.4.4.2. Agarosegelelektrophorese und Auswertung

Die Auswertung dieser PCR erfolgte wie für die gp70-PCR beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese (2,5 % Agarose) bei 120 V für 36 Minuten. Als positiv galt dabei

eine Bande bei ca. 190 bp im Vergleich mit dem pUC19/MSP I-Größenstandard und auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle.

3.6.4.5. Primersequenz und –verdünnung (2. Reaktion)

Für die 2. (seminested) Reaktion wurde der Reverse Primer der ersten PCR beibehalten und kombiniert mit einem anderen Forward Primer. Diese neue Primerkombination entsprach der aus dem Institut für Veterinär-Pathologie entstammenden Arbeit von Schwartz et al. aus dem Jahr 2001. Auch der neue Primer wurde von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg als Lyophilisat bezogen. Der Primer wurde ebenfalls wie für die anderen Primer bereits angegeben auf 25 pmol/µl verdünnt. Die Primersequenz lautete folgendermaßen:

Forward Primer (2. Reaktion): 5`-CTTGAGGCCAAGAACAGTTA-3` (sense)
(Schwartz et al., 2001)

3.6.4.2. PCR-Ansatz für die U3-PCR (2. Reaktion)

Das Ansetzen und Aufteilen des PCR-Mastermixes erfolgte wie für die gp70-PCR beschrieben. Pro Reaktionsgefäß wurden allerdings 24 µl Mastermix vorgelegt. Folgende Bestandteile wurden dafür nach kurzem Anzentrifugieren (Microcentrifuge SD; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) je 24,0 µl Mastermix gemischt (s. Tab. 3.6).

3.6.4.6 Kontrollen und Proben

Als Probe wurde der erste PCR-Ansatz 1/1000 mit DEPC-H₂O verdünnt und 1 µl davon eingesetzt. Als Nullkontrolle diente die ebenfalls im gleichen Arbeitsschritt 1/1000 verdünnte Nullkontrolle der ersten Reaktion, die exakt wie eine Probe behandelt und als letzte hinzupipettiert wurde. Als Positivkontrolle fungierte wie in der ersten Reaktion FL74-DNS. Als Negativkontrolle diente Rinder-DNS und zum Teil DNS nichtinfizierter FE-Zellen.

Tabelle 3.6: Mastermix U3-PCR (2.Reaktion) / Probe

Komponente	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge	Hersteller
10x Reaktionspuffer	2,5 µl	1x	NatuTec GmbH
DEPC-H ₂ O	18,875 µl		
dNTP-Mix Gebrauchslösung (je dNTP 10 mM)	0,5 µl	dATP:dTTP:dGTP:dCTP (1:1:1:1), je 0,2 mM	Peqlab Biotechnologie GmbH
Forward Primer (2) (10 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol/µl	MWG Biotech AG
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol/µl	MWG Biotech AG
TAQ-DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl	0,75 U	NatuTec GmbH
Gesamtansatz	24 µl		

3.6.4.7. PCR-Zyklus (2. Reaktion) und Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese

3.6.4.7.1. PCR-Zyklus (2. Reaktion)

Folgendes Programm wurde auf dem Multicycler PTC-200 (MJ Research, Inc., USA) programmiert und durchlaufen:

1. 94°C 120 Sekunden
2. 92°C 60 Sekunden
3. 52,7°C 30 Sekunden
4. 72°C 30 Sekunden
5. 29 malige Wiederholung der Schritte 2. bis 4.
6. 72°C 120 Sekunden
7. 4°C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler (max. 240 Minuten)

3.6.4.7.2. Agarosegelelektrophorese und Auswertung

Die Auswertung dieser PCR erfolgte wie für die gp70-PCR beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese (3 % Agarose) bei 120 V für 36 Minuten. Als positiv galt dabei eine Bande bei ca. 110 bp im Vergleich mit dem pUC19/MSP I-Größenstandard und auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle.

3.7. Klonierung und Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob das Amplifikat der 1. PCR mit dem neu zusammengestellten Primerpaar FeLV-spezifisch war, wurde das erwartete, ca. 185 bp lange PCR-Produkt aus der 1. Reaktion mit DNS der FL74-Zellen kloniert und anschließend kommerziell sequenziert. (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Frankfurter Str.107, 35392 Gießen)

3.7.1. Klonierung

Die Klonierung erfolgte als TOPO® TA Klonierung (pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Expression Kit, Invitrogen™ GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland). Als Vektor für die Klonierung wurde dabei das pcDNA3.1/V5-His TOPO®-Plasmid eingesetzt. Das Prinzip der TOPO® TA Klonierung beruht auf der Eigenschaft der Taq-Polymerase, Adenin-Reste an die 3'-Enden der Amplifikationsprodukte anzuhängen. Der Vektor verfügt über einen überhängenden Thymidinrest. Zwischen dem überhängenden Thymidinrest und den A-Resten erfolgt eine Ligation zwischen dem Vektor und dem Amplifikationsprodukt (Insert).

3.7.1.1. dATP-„Tailing“-Reaktion

Durch Lagern des Amplifikationsproduktes kann es zum Abfallen überhängender Adeninreste kommen. Um diesem Vorgang entgegen zu arbeiten wurde direkt vor der eigentlichen Klonierung eine dATP-„Tailing“-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden PCR-Produkt, Taq-Polymerase, PCR-Puffer, DEPC-Wasser und dATP-Lösung vermischt und bei 72°C für eine Stunde inkubiert (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: dATP-, „Tailing“-Reaktion

Volumen	Reagentien
4 µl	10x PCR-Puffer (enthält 15mM MgCl ₂)
4 µl	dATP (10mM)
1 µl	Taq-Polymerase
25 µl	PCR-Produkt
6 µl	DEPC-Wasser
40 µl	Gesamtvolumen dATP-, „Tailing“-Reaktion

Dieser Ansatz wurde nach Abschluß der Inkubationszeit auf 4°C heruntergekühlt und ohne weitere Verzögerung in die TOPO® TA-Klonierungsreaktion eingesetzt.

3.7.1.2. Herstellung des Nährmediums und des Nährbodens

Einen Tag vor der Klonierungsreaktion wurden Nährböden und Flüssigmedien für die Anzucht von Kolonien hergestellt (siehe Anhang). Es wurden Luria Bertani (LB)-Agar und -Flüssigmedium verwendet. Zur Hemmung des Begleitkeimwachstums wurde 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt. Als zusätzliche Kohlenstoffquelle wurden die Medien mit 50 ml/l einer 20 %igen D-Glukose-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) versetzt.

3.7.1.3. Klonierungsreaktion und Transformation, Beimpfen der Nährböden

Die Gewinnung des Amplifikats für die Klonierung erfolgte mit der oben beschriebenen U3-PCR (1. Reaktion). Als Ausgangsmaterial diente FL74-DNS.

1. Die einzelnen Komponenten für die **Klonierungsreaktion** wurden wie in der Tabelle 3.8 angegeben vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur (22-23°C) inkubiert.

Tabelle 3.8: Klonierungsreaktion

Komponente	Volumen	Herkunft
PCR Produkt	4 µl	Siehe U3-PCR (1) und anschließende dATP-„Tailing“-Reaktion
Salt solution	1 µl	pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Expression Kit
pcDNA3.1/V5-His© TOPO® - Vektor	1 µl	pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Expression Kit
Gesamtansatz	6 µl	

- Für die **Transformation** wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5α™ Subcloning Efficiency (DH5α™ Subcloning Efficiency™ Chemically Competent E. coli, Invitrogen™ GmbH, 76131 Karlsruhe) verwendet. 100 µl der E. coli-Zellsuspension wurde auf Eis aufgetaut. 5 µl des Klonierungsansatzes wurden in 100 µl dieser Zellsuspension pipettiert und vorsichtig durch Antippen mit dem Finger gemischt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 37°C inkubiert (Hitzeschock). Anschließend wurde die Zellsuspension noch einmal für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurden dazu 900 µl raumtemperiertes S.O.C.-Medium zugegeben. Diese Mischung wurde horizontal in einem Schüttelinkubator bei 37°C eine Stunde bei ständiger langsamer Bewegung aufbewahrt.
- Im Folgenden wurde die Zellsuspension in aufsteigenden Volumina von 20 µl bis 120 µl in 20 µl-Stufen auf den auf Zimmertemperatur gebrachten Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.7.1.4. Koloniescreening (Analyse der selektierten Klone) und Animpfen der Flüssigkulturen

Eine Screening-PCR diente zum Überprüfen des Erfolgs der Klonierungsreaktion und der Transformation und erfolgte im Anschluß an die Übernachtinkubation der ausplattierten E. coli.

1. Übernachtkulturen wurden mit einer sterilen 200 µl Pipettenspitzen gepickt und in 20 µl sterilem aqua dest. resuspendiert.
2. 10 µl dieser Bakterienkoloniesuspension wurden in 10 ml angewärmtes LB-Medium mit 100 µg Ampicillin/l und 8 g/l Glucose gegeben und über Nacht bei 37° C in einem Schüttelinkubator aufbewahrt.
3. 10 µl Bakteriensuspension wurden in einem speziell dafür bereitgestellten Thermocycler (Thermocycler 60/2, bio-med, Gesellschaft für Biotechnologie und Medizintechnik mbH, Deutschland) bei 95 °C für 20 Minuten inkubiert (Abtöten der Bakterien), bevor sie als Probe in die folgende Screening-PCR eingesetzt wurden. Die anschließende Screening-PCR erfolgte im Multicycler PTC-200™ (MJ Research, Inc., USA). Es wurde die 1. Reaktion der U3-PCR durchgeführt. Als Probe dienten je 2 µl der Bakteriensuspension.

3.7.1.5. Präparation der Plasmid-DNS für die Sequenzierung, PCR-Screening der isolierten Plasmid-DNS

3.7.1.5.1. Plasmid-Präparation

Das Prinzip beruht dabei auf einer Affinitätsreinigung der Plasmid-DNS über eine Säulenmatrix. Die an die Matrix gebundene DNS wird anschließend eluiert.

Von vier der in der Screening-PCR positiv getesteten Übernachtkulturen wurde Plasmid-DNS gewonnen. Dazu diente das Nucleo Spin® Plasmid DNS Aufreinigungsakit (Macherey- Nagel GmbH & Co. KG, 52313 Düren)

1. Je 8 ml der über Nacht inkubierten Kulturen wurden bei 6000xg für 10 Minuten

zentrifugiert (Labofuge 400, Heraeus Instruments GmbH, 63405 Hanau, Deutschland). Das überstehende LB-Medium wurde dann durch Abgießen entfernt.

2. Plasmid-DNS-Freisetzung und Fällung des Zelldebris:

Zum Bakterienpellet wurden 250 µl A1-Puffer hinzugegeben.

Das Pellet wurde daraufhin durch Vortexen resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) überführt.

Anschließend wurden 250 µl A2-Puffer zugegeben und das Röhrchen achtmal gewendet. Diese Mischung ließ man für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Nun wurden 300 µl A3- Puffer zugegeben und das Röhrchen wiederum achtmal gewendet.

3. Klärung des Lysats

Die Suspension wurde bei 11000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert

4. Adsorption der Plasmid-DNS

Der geklärte Überstand aus Schritt 3 wurde auf die Membran einer dem Kit beigegefügt und in einem 2 ml Sammelröhrchen platzierter Nucleo Spin® Plasmid Säule pipettiert und bei 11000 x g eine Minute lang zentrifugiert.

5. Waschen

Der Waschschrift erfolgte durch Zugabe von 500 µl des auf 50 °C angewärmten AW-Puffers, Zentrifugation bei 11000 x g für eine Minute, Zugabe von 600 µl des mit 96 % Ethanol angesetzten A4-Puffers und erneuter Zentrifugation bei 11000 x g für eine Minute

6. Trocknung

Um die Ethanolreste des A4-Puffers komplett zu entfernen, wurde die Säule im entleerten Sammelgefäß für zwei Minuten mit 11000 x g

trocken zentrifugiert.

7. Elution der Plasmid-DNS

Die Säule wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) gesetzt, 50 µl steriles DEPC-Wasser wurden direkt auf die Säulenmembran pipettiert und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte der finale Zentrifugationsschritt bei 11000 x g für eine Minute.

3.7.1.5.2. Screening-PCR zur Analyse der isolierten Plasmid-DNS

Nach Abschluß der Plasmid-DNS-Isolierung erfolgte eine Vektor-Screening-PCR um zu überprüfen, ob die isolierte Plasmid-DNS ein Insert der vermuteten Größe enthält. Sie erfolgte im Multicycler PTC-200™ (MJ Research, Inc., USA). Als Primerbindungsstellen fungierten die auf dem Vektor befindlichen Priming sites T7 und BGH Reverse. Die Sequenzen wurden dem Vektorhandbuch (pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Expression Kit, Version H, Invitrogen™ GmbH, 76131 Karlsruhe) entnommen. Sie lauteten folgendermaßen:

T7: 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'

BGH Reverse: 5' - TAGAAGGCACAGTCGAGG - 3'

Der PCR-Ansatz umfasste die in Tabelle 3.9 angegebenen Komponenten:

Tabelle 3.9: PCR-Ansatz Vektor-Screening-PCR

Komponente	Volumen	Konzentration	Hersteller
REDTaq™ ReadyMix™	10 µl		Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen
T7	0,4 µl	10 pmol/µl	MWG Biotech AG, Ebersberg
BGH Reverse	0,4 µl	10 pmol/µl	MWG Biotech AG, Ebersberg
Plasmid-DNS	0,5 µl		
DEPC-Wasser	9,5 µl		
Gesamtansatz	20,8 µl		

Die PCR-Zyklus umfasste folgende Schritte

1. 94°C 300 Sekunden
2. 92°C 30 Sekunden
3. 50°C 60 Sekunden
4. 72°C 150 Sekunden
5. 29 malige Wiederholung der Schritte 2. bis 4.
6. 68°C 300 Sekunden
7. 4°C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler (max. 240 Minuten)

Die Spezifität der amplifizierten Produkte wurde durch ihre Größe im 2 % Agarosegel verifiziert. Es war aufgrund der Lage der Primerbindungsstellen auf dem Plasmid eine Länge des Amplifikates von ca. 455 bp (265 bp Plasmidabschnitt + ca. 190 bp Insert) zu erwarten.

Im Anschluss an diese PCR erfolgte zusätzlich eine U3-spezifische PCR (1. Reaktion) nach dem dort geschilderten PCR-Zyklus. Als Probe wurden 2,0 µl der Plasmid-DNS-Lösung (1:20 verdünnt aus eluierter Plasmid-DNS) eingesetzt.

3.7.2. Messung der Plasmid-DNS-Konzentration, Sequenzierung

Die Messung der Konzentration der isolierten Plasmid-DNS erfolgte als UV-Absorptionsspektroskopie bei 260 nm am GeneQuant II (Amersham Biosciences, Freiburg) nach einer Verdünnung von 1:100 mit aqua dest..

Für die Sequenzierung wurde die nun mehrfach auf erfolgreiche Insertion überprüfte Plasmid-DNS mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt. Zur Sequenzierung wurde weiterhin der vektorspezifische T7 (Forward) Primer in eine Konzentration von 10 pmol/µl bereitgestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Sequenzierung selbst erfolgte im Cycle-Sequencing-Verfahren am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden als Email-Attachment in Form einer .SCF-Datei als Vierfarben-Elektropherogrammes übermittelt und mit einer Shareware-Version (1.45) des Programmes Chromas analysiert. Die Nukleotidsequenz wurde in das FASTA-Format transformiert (.SEQ-Datei) und mit bekannten Sequenzen verglichen. Dafür wurden über die Internetplattform des National Institutes for Biotechnology Information (NCBI) mittels des

Programmes BLASTSearch (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) (megablast; NCBI, MD, USA) die bereitgestellten, zugänglichen Sequenzdatenbanken (GenBank) (NCBI, USA) nach Sequenzhomologien durchsucht (Altschul et al., 1990).

Die Primer der zwei PCR-Reaktionen wurden ebenfalls mittels des Programmes BLASTSearch (NCBI, USA) auf Sequenzhomologien gescreent.

3.8. Bestimmung der Sensitivität der U3-PCR-Reaktion, Test auf Eignung in der Erfassung latenter FeLV-Infektionen

3.8.1. Sensitivitätsbestimmung

Die Ausgangskonzentration der sequenzierten Plasmid-DNS wurde durch UV-Absorptionsspektroskopie bei 260 nm am Gene Quant II (Amersham Biosciences, Freiburg) nach einer Verdünnung von 1:100 bestimmt. Die durch die Klonierung gewonnene U3-Plasmid-DNS wurde mit DEPC-H₂O verdünnt. Die ersten 13 Stufen erfolgten als 2er-Verdünnungsreihe bis 1:8.192, danach wurden vier 10er-Verdünnungsschritte bis 1:81.920.000 durchgeführt. Anschließend erfolgten vier weitere 2er-Schritte bis 1:1.310.720.000 und noch zwei 10er Schritte zu 1:131.072.000.000.

3.8.2. Test auf Eignung in der Erfassung latenter FeLV-Infektionen

Eine wässrige Lösung aus Plasmid-DNS entspricht nicht der in einer diagnostischen PCR vorgefundenen Versuchssituation (Rolfs et al., 1992). Z. B. ist im Fall latenter FeLV-Infektionen von einer sehr geringen Anzahl von Zielsequenzen vor einem starken Hintergrund zellulärer DNS auszugehen (Gomes-Keller et al., 2006). Um festzustellen, ob die seminested PCR auch geeignet war, um unter Routinebedingungen latente FeLV-Infektionen nachweisen, wurde aus dem Knochenmark (in Form von OCTTM-Gefrierblöckchen) experimentell mit dem FeLV Stamm Glasgow A infizierter Katzen DNS nach dem oben geschilderten Verfahren für Gewebe isoliert. Diese Gewebe wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Lutz aus Zürich zur Verfügung gestellt und stammten aus einer Dissertation aus dem Departement für Innere Veterinärmedizin der Universität Zürich (Ruckstuhl, 2000). Gewebe dieser Tiere, unter anderem auch das Knochenmark, waren in dieser Arbeit mit einer quantitativen U3-PCR

positiv getestet worden, ELISA- und immunhistologische Ergebnisse lagen ebenfalls vor. Fünf nach diesen Kriterien latent infizierte Tiere sowie ein immunhistologisch und im ELISA-Test FeLV-positives Tier aus dieser Untersuchung wurden für eine Kontroll-PCR nach dem oben angegebenen Protokoll für die U3-PCR verwendet, um die Eignung der PCR in der tatsächlichen Versuchssituation festzustellen.

3.9. Statistische Analyse

3.9.1 Datenaufbereitung

Die Angaben zu den Tieren wurden zuerst in roher Form in eine Microsoft-Access 2003-Datenbank eingegeben. Anschließend wurden die verschiedenen Angaben in einen Zahlencode transformiert und für die statistischen Berechnungen in einer Microsoft-Excel 2003-Tabelle als .xls-Datei formatiert. Neben den Monatsangaben bezüglich des Alters wurden drei Altersgruppen zusammengefasst (siehe Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Altersgruppen

Altersgruppe	Monate
1	0-23
2	>23-120
3	>120

Neben Einzeldiagnosen wurden auch Diagnosegruppen aus pathologisch begründeter Sicht sinnvoll zusammengefasst.

3.9.2. Auswertung

Die Auswertung der statistischen Daten erfolgte an Personal Computern der AG Biomathematik des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen mit der Software BMDP4F und Testimate V 6.0.65 sowie einer im Internet verfügbaren JavaScript Vierfeldertafel-Analyse Software des Institutes für medizinische Informatik und

Biomathematik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (<http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/bio/vierf.html>).

Das Alter der Tiere wurde mittels der statistischen Kenngrößen arithmetischer Mittelwert und Median beschrieben. Weiterhin wurden absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Die Altersangabe erfolgte in Monaten.

Als Signifikanztests dienten bezüglich qualitativer Merkmale der Chi-Quadrat-Test und bei kleinen Erwartungswerten der exakte Test nach Fisher. Altersunterschiede wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Rangsummentest (Testimate V 6.0.65) bezüglich der Altersgruppen bzw. dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest (BMDP4F) bezüglich des tatsächlichen Alters in Monaten analysiert. Als Nullhypothese wurde formuliert, dass kein Zusammenhang der latenten FeLV-Infektion und einem der Vergleichsparameter (verschiedene Diagnosen, Alter, Herkunft etc.) besteht. Als Signifikanzniveau diente $\alpha = 0,05$. Darunter wurde die Nullhypothese abgelehnt. Dies entsprach einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Für die Berechnungen der Signifikanztests wurde die zu untersuchende Stichprobenpopulation von den immunhistologisch positiven Sektionskatzen bereinigt. Die Stichprobe für die Signifikanzberechnungen umfasste folglich alle immunhistologisch negativen Katzen.

Signifikante Unterschiede wurden gegenüber zwei Vergleichsgruppen untersucht. Zum einen diente die fortlaufend untersuchte Gesamtpopulation („fortlaufend“) als Vergleichsgruppe. Zum anderen diente die Gruppe von Katzen, bei denen als einziger Befund ein Trauma als Erkrankungs- und Todesursache gefunden werden konnte („reine Traumakatten“), als Vergleichsgruppe. Sie bestand aus 19 Katzen, von denen sechs U3-positiv waren. Sie repräsentierten eine „normale Population“ unter der Annahme, dass ein Trauma nicht kausal durch eine latente FeLV-Infektion hervorgerufen wird (Reinacher, 1987a; Wittmer, 1993).

Bei den Diagnosen, bei denen eine signifikante Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion dargestellt werden konnte, wurde als weiteres Assoziationsmaß das Relative Risiko, das das Verhältnis zweier Risiken angibt, gewählt. Dafür wurden die relativen Häufigkeiten einer Diagnose in der Gruppe der latent FeLV-infizierten Katzen (q) und in der Gruppe der auch

latent FeLV-negativen Katzen (p) bestimmt und der Quotient ermittelt (q/p). Bei relativem Risiko >1 ist ein positiver statistischer Zusammenhang zwischen Einfluß- und Zielgröße vorhanden, was bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, dass eine Diagnose bei Vorliegen einer latenten FeLV-Infektion auftritt. Ein negativer statistischer Zusammenhang gilt bei einem Quotienten < 1 . Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer Diagnose bei FeLV-negativen Tieren erhöht ist. Die Angabe erfolgte im Falle eines negativen statistischen Zusammenhanges als reziprokes Relatives Risiko (Kehrwert) um die Stärke des Zusammenhangs zu verdeutlichen. Je größer dabei die Abweichung von 1 ist, desto stringenter ist der statistische Zusammenhang zwischen Einfluss- und Zielgröße. Ist das Relative Risiko = 1 liegt kein statistischer Zusammenhang vor (Bender und Lange, 2001).

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung und Sequenzierung

4.1.2 Koloniescreening und Überprüfung der Plasmid-DNS

Das Ergebnis des Koloniescreenings zeigte an, dass sämtliche untersuchten Kolonien das transformierte Plasmid enthielten, denn sie zeigten alle eine positive Bande bei der U3-spezifischen PCR (Abb. 9.1). Die nach der Präparation der Plasmid-DNS durchgeführte PCR-Reaktion (T7/BGH-PCR) bestätigte, dass die isolierte Plasmid-DNS ein Insert von ca. 180-200 bp enthielt, denn das PCR-Produkt (plus 265 bp Vektor-DNS) lag zwischen 400 bp und 500 bp Länge (Abb. 9.2). Die U3-spezifische PCR mit der gewonnenen Plasmid-DNS ergab bei allen untersuchten Proben, dass es sich dabei um ein ca 180-190 bp langes Insert handelte (Abb. 9.3).

4.1.3 Primerscreening und Sequenzierung

Das Ergebnis der Sequenzierung wurde per email als Windows Explorer Command Datei verschickt, anschließend im FASTA Format gespeichert.

Die sequenzierte Basenabfolge ist in Abbildung 4.1. mit Primerbindungsstellen dargestellt.

Abbildung 4.1: Sequenzierergebnis (vektorbereinigt), U3-Sequenz mit farbigen Primerbindungsstellen

```
AGGTCGAACTCTGGTCAACTGGGGAGCCTGGAGACTGCTGGCAGTGGCCTT  
GAAACTTCTGCTGTTTCAGCTATATCCGAGGCTTAACCGTTCTTGGCTTTAA  
GCCGGGGCCCAGGTGCTTAACCACAGATATCCTGTTTTTCAGCCCCTAACTTC  
CTTATATCTCATGGGAACATACTTGAGTAA
```

grün: U3-forward Primer (1. Reaktion)

rot: U3-reverse Primer

schwarz: amplifizierter U3-Abschnitt

Die Analyse des durch die Primer begrenzten Amplifikates ergab 125 Treffer mit dem Programm BLASTSearch (megablast) (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit Sequenzen zwischen 185 und 174 bp Länge und Sequenzhomologien zwischen 97 % und 93 % zu exogenen U3-Sequenzen in der Gendatenbank. Von den 122 als Feline Leukämievirussequenzen klassifizierten waren 117 als Feline Leukämieviren, drei als Gardner-Arnstein Feline Leukämie Oncoviren B und zwei als Feline Sarkomviren klassifiziert. Ein als Säugersequenz klassifizierter Treffer war eine rekombinante *v-myc*-FeLV-Provirussequenz und eine als unklassifiziert eingeordnete Sequenz war eine Klonvariante des Snyder-Theilen Felinen Sarkomvirus.

Die Primer für die zwei Reaktionen der U3-PCR wurden auf ihre Spezifität mit publizierten Sequenzen verglichen. Dies erfolgte ebenfalls mit dem Programm BLASTSearch (megablast) des NCBI (National Center for Biotechnology Information). Der Forward-Primer ergab für 31 in der NCBI Gendatenbank (GenBank, National Center for Biotechnology Information, USA) vorhandene FeLV-Sequenzen 100 % Übereinstimmung für alle 21 Basen, vier bekannte Sequenzen stimmten in 20 von 21 Basen überein. Der FeLV-Klon fMDS6-1 (GenBank Accession number: AB159693.1) zeigte in seiner Sequenz viermal eine Übereinstimmung von 100 % in 18 Basen im Abstand von 20-30 bp. Für den Reverse Primer fanden sich 37 Übereinstimmungen zu 100 % für alle 20 Basen mit bekannten FeLV-Sequenzen und weitere 29 Treffer mit weniger Übereinstimmung. Es waren keine Übereinstimmungen des Primerpaares mit in der Gendatenbank vorhandenen endogenen FeLV-verwandten Sequenzen anzutreffen.

4.2. Sensitivitätsanalyse

Die Konzentration der eingesetzten Plasmid-DNS ergab sich als arithmetischer Mittelwert aus zwei Messungen als 214 ng/μl. Die Plasmid-DNS bestand aus 5523 bp Vektor-DNS und 185 bp Zielsequenz. Das ergab insgesamt 5708 bp. Für die Berechnung des Molekulargewichtes wurde auf 5700 bp abgerundet. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht für DNS von 635 g/mol/bp ergaben sich folglich 3.619.500 g/mol für das Plasmidmolekül. In der Ausgangslösung befanden sich also bei der Verdünnungsstufe 1:327.680.000, bei der die U3-PCR negativ verlief etwa 140 Zielmoleküle. Die zwei nächsten Verdünnungsstufen lieferten bis zu einer Verdünnung von 1:1.310.720.000, was etwa 55 Zielsequenzen entsprach, wieder ein positives Ergebnis in der 1. Reaktion. Die anschließende

2. Reaktion ergab bei der nächst höheren Verdünnungsstufe von 1:13.107.200.000 noch eine Bande bei 110 bp in der zweiten Reaktion, also ein positives Ergebnis. Das entsprach ca. sechs Zielmolekülen.

4.3. Ergebnis der U3-PCR bei experimentell FeLV-infizierten Katzen

Alle immunhistologisch negativen und die immunhistologisch positiven Versuchskatzen waren in der U3-PCR positiv (Abbildungen 9.3 und 9.4). Die Tiere mit den Nummern 159 und 224 waren in der 1. Reaktion nur schwach positiv (Abbildung 9.3). Daher wurden die 1:1000 verdünnten PCR-Ansätze der 1. Reaktion in die 2. (seminested) Reaktion eingesetzt. Hier zeigten sie eine deutliche Bande bei 110 bp und eine etwas schwächere Bande bei ca. 185 bp (Abbildung 9.4).

4.4. Prävalenz der FeLV-Infektion

4.4.1. Immunhistologische Ergebnisse

Von 302 Katzen zeigten 26 Tiere ein positives immunhistologisches Ergebnis und wurden somit als produktiv FeLV-infiziert gewertet (Abb.: 9.6.). Das entspricht einem Prozentsatz von 9 % FeLV-infizierter Katzen. Die produktive FeLV-Infektion war somit in der untersuchten Sektionskatzenpopulation die dritthäufigste Infektionskrankheit nach der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIP) mit 36 Fällen und einer relativen Häufigkeit von 12 % und der felines Panleukopenie mit einem Anteil von 9 % (27 Fälle).

91 %, das bedeutet 276 Katzen, waren in der vorliegenden Untersuchung immunhistologisch negativ und waren infolge dessen als nicht produktiv FeLV-infiziert anzusehen.

4.4.2. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktionen

4.4.2.1. gp70-PCR (Abb. 9.7)

Alle 26 immunhistologisch positiven Sektionskatzen zeigten eine oder zwei Banden bei der gp70-PCR. 16 der immunhistologisch positiven Tiere zeigten eine spezifische Bande bei ca. 341 bp und eine zweite Bande bei ca. 305 bp als Hinweis auf eine exogene Infektion mit den FeLV-Subtypen FeLV-A und/oder FeLV-C. Die restlichen 10 immunhistologisch positiven

Tiere zeigten nur eine Bande bei ca. 341 bp. Alle immunhistologisch negativen Tiere (n=276) zeigten bei der Auswertung der PCR eine Bande bei ca. 341 bp. Alle isolierten DNS-Proben wurden damit als PCR-geeignet eingestuft.

4.4.2.2. U3-PCR

Als positiv wurden in der 1. PCR Reaktion Banden mit der Größe von ca. 185 bp gewertet, in der zweiten (seminested) PCR galten Banden von ca 110 bp als positiv. In der 1. Reaktion zeigten einige positive Proben eine oder mehrere weitere Banden oberhalb des 190 bp Amplifikats bis zu ca. 500 bp (Abb. 9.3 (weißer Kasten)). Insgesamt zeigten 178 Proben eine U3-spezifische Bande in den PCR-Reaktionen. Alle immunhistologisch positiven Katzen wurden bereits in der ersten PCR positiv. 24 davon in der 1. Reaktion, zwei in der 2. Reaktion (seminested). Von diesen zwei Tieren wurde in der 1. Reaktion der 2. PCR (Wiederholungs-PCR) eines positiv. Von den 276 immunhistologisch negativen Tieren waren insgesamt 152 PCR positiv (Abb. 9.8 und 9.9). Dies entspricht einem Anteil von 55 % an den immunhistologisch negativen Katzen und einem Anteil von 50 % an der gesamten Stichprobenpopulation. Insgesamt wurden 59 davon in den zwei PCRs in der 1. Reaktion positiv. 93 Tiere wurden erst in der 2. (seminested) Reaktion positiv, 53 in der 1. PCR und weitere 40 in der 2. PCR (Wiederholungs-PCR). Insgesamt wurden 9 Tiere in der 1. Reaktion der 2. PCR positiv. Alle diese Proben waren in der 2. Reaktion der 1. PCR bereits positiv geworden. Eine Übersicht über die PCR-Ergebnisse zeigen Tabellen 4.1 und 4.2.

Die Kriterien einer latenten Infektion erfüllten anhand dieser Ergebnisse also 152 von 302 Tieren (50 %). FeLV negativ waren 124 Sektionskatzen (41 %). Die Stichprobe für die Signifikanzberechnungen umfasste also insgesamt 276 Sektionskatzen. Einen Überblick über den FeLV-Infektionsstatus in der untersuchten Sektionskatzenpopulation gibt Diagramm 4.1.

Tabelle 4.1. Überblick über die Ergebnisse von FeLV-Immunhistologie und –PCR

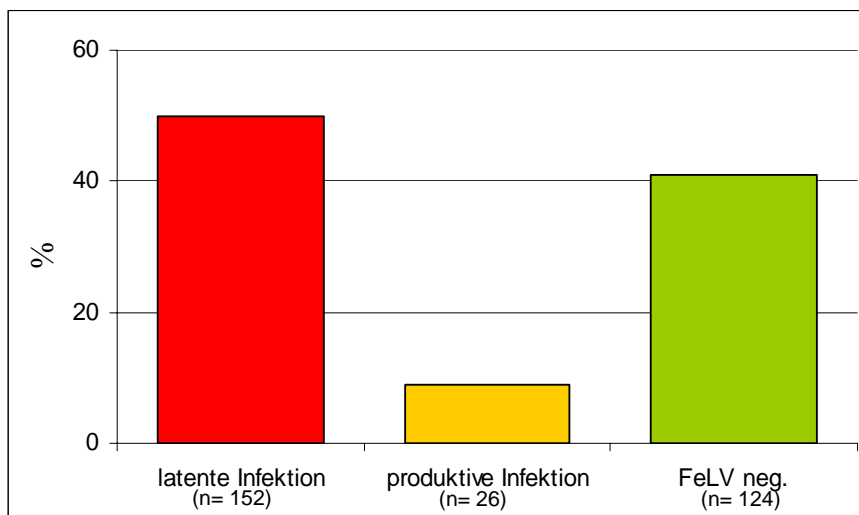
FeLV-Immunhistologie \ U3-PCR		FeLV-Immunhistologie		gesamt
		+	-	
U3-PCR	+	26	152	178
	-	0	124	124
gesamt		26	276	302

Tabelle 4.2: Überblick über die positiven U3-PCRs der insgesamt 302 Katzen

PCR-Reaktion	1. PCR		2. PCR (Wiederholungs-PCR)	
	1.	2. (seminested)	1.	2. (seminested)
Anzahl positiver PCR-Ergebnisse gesamt (178)	74	64	10 (bereits in der 2. Reaktion der 1. PCR positiv)	40
Anzahl positiver PCR-Ergebnisse immunhistologisch positiver Tiere (26)	24	2	1	-
Anzahl positiver PCR-Ergebnisse immunhistologisch negativer Tiere (152)	50	62	9	40

- : nicht durchgeführt

Diagramm 4.1: FeLV-Infektionsstatus basierend auf den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchung und der PCR



4.4.3. Statistische Auswertung

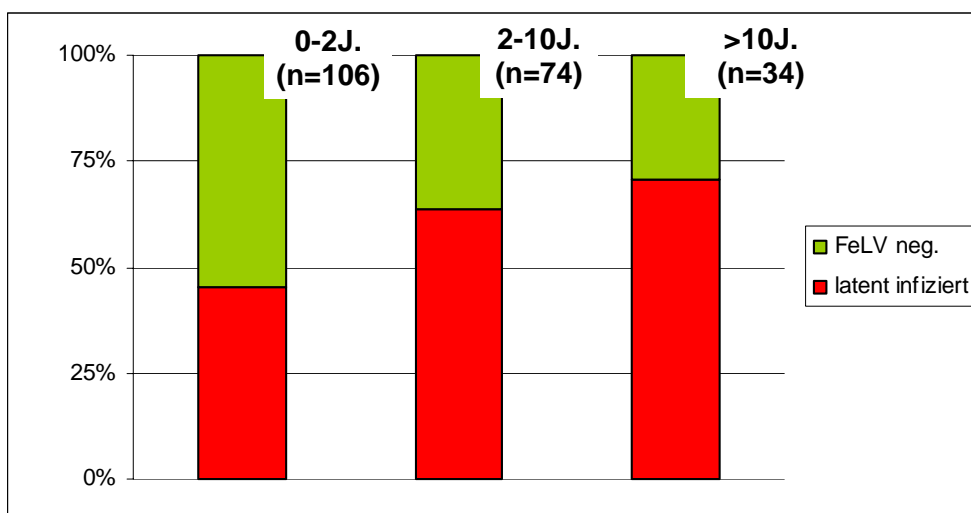
4.4.3.1. Alter der Tiere

Von 236 Katzen konnte das Alter ermittelt werden. Die Tiere waren im Durchschnitt 52 Monate (vier Jahre, vier Monate) alt. Der Median lag bei zwei Jahren. Das jüngste Tier war eine Woche, das älteste 20 Jahre alt. Insgesamt fielen 111 Katzen in die Altersgruppe 1 mit 0-23 Monaten (47 %), 88 Katzen waren zwischen >23 und 120 Monaten (37 %), 35 Tiere waren älter als 10 Jahre (15 %).

Von vier produktiv FeLV-infizierten Tieren war kein Alter zu ermitteln. Die übrigen immunhistologisch FeLV-positiven Katzen waren durchschnittlich 55 Monate alt, der Median lag bei 45 Monaten. Die jüngste FeLV-positive Katze war 3 Monate, die älteste 156 Monate alt. Fünf Tiere (23 %) gehörten zur Alterskategorie 1 (0-23 Monate), 16 Tiere (73 %) zur Alterskategorie 2 (24-120 Monate), ein Tier (5 %) gehörte in die Alterskategorie 3 (>120 Monate).

Die Altersverteilung der nicht und latent infizierten Katzen war folgendermaßen: Von 214 Katzen waren 50 % (106) in Altersgruppe 1 vorzufinden, 35 % (74) waren in Altersgruppe 2 und 16 % (34) in Altersgruppe 3. Der Altersdurchschnitt belief sich auf 52 Monate (Median: 24 Monate). Von den 106 Katzen in Altersgruppe 1 waren 45 % (48), aus Altersgruppe 2 64 % (47) und aus Altersgruppe 3 71 % (24) latent FeLV infiziert (siehe Diagramm 4.2).

Diagramm 4.2: Anteil latenter FeLV-Infektionen in den verschiedenen Altersklassen



Mit dem Chi-Quadrat-Test konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang gesichert werden ($p = 0,0085$). Ein statistischer Zusammenhang konnte auch mit dem exakten Wilcoxon–Mann-Whitney-U-Rangsummentest ermittelt werden. Unter Beibehaltung der Altersklasseneinteilung ergab sich ein p-Wert von 0,0023 für diesen Test. Ein p-Wert von 0,026 ergab sich bei Berücksichtigung der Einzelwerte im Wilcoxon–Mann-Whitney-U-Rangsummentest.

Die jüngste latent infizierte Katze war einen Monat alt, die älteste 20 Jahre. Der Altersdurchschnitt latent infizierter Katzen lag bei 61,7 Monaten (Median: 24 Monate), der Altersdurchschnitt bei den nichtinfizierten Katzen bei 40,1 Monaten (Median: 12 Monate).

Altersunterschiede zwischen latent infizierten Tieren und FeLV-negativen Tieren einer Diagnose(gruppe) sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

4.4.3.2. Rasse

Hinsichtlich der Katzenrassen wurde die Gesamtpopulation in drei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe (EKH) wurden die Europäisch Kurzhaarkatzen sowie deren Mischlinge, in der zweiten Perserkatzen (Perser) und in der dritten andere Edelkatzen zusammengefasst.

Von 250 Tieren waren Rasseangaben vorhanden.

Insgesamt bestand die Population aus 174 EKH-Katzen, 20 Perserkatzen, 58 Edelkatzen und 52 Tieren unbekannter Rasse.

Bei den 26 produktiv FeLV-infizierten Tieren handelte es sich um 21 Europäisch Kurzhaarkatzen und zwei Perserkatzen. Bei drei Tieren war keine Rasseangabe vorhanden.

Von 276 latent und nichtinfizierten Tieren waren 151 Europäisch-Kurzhaar-, 18 Perser- und 58 andere Edelkatzen. Unbekannt war die Rasse von 49 Tieren.

Von den 151 EKH-Tieren waren 87 (58 %), von den 18 Persern 10 (56 %), von den anderen Edelkatzen 30 (52 % %), von den 49 Tieren unbekannter Rasse 25 (51 %) latent infiziert. Es ergab sich daraus keine signifikante Assoziation zwischen der Rasse und der latenten FeLV-Infektion

4.4.3.3. Herkunft und Haltungsbedingungen

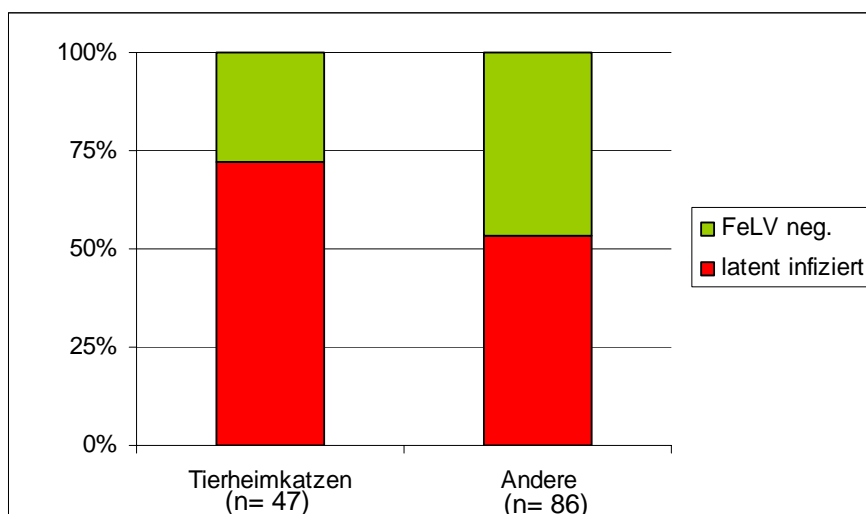
Die Lebensumstände der Tiere wurden, soweit sie aus dem Vorbericht ersichtlich waren, in zwei Kategorien zusammengefasst. Dies war bei 148 Tieren möglich. Es wurde prinzipiell unterschieden zwischen in Privathaushalten lebenden und in Tierheimen oder Tierschutzeinrichtungen lebenden Katzen („Tierheimkatzen“). Zu den privat gehaltenen Katzen zählten einzeln gehaltene, reine Wohnungskatzen, einzeln gehaltene Katzen mit Freigang, Tiere aus Mehrkatzenhaushalten und Zuchtkatzen. Zuchtkatzen aus Mehrkatzenhaushalten wurden zu den Zuchtkatzen gerechnet. Von 17 Zuchtkatzen war eine produktiv FeLV-infiziert. Von den 16 übrigen waren 8 (50 %) latent FeLV-infiziert. 31 Freigänger wiesen zu 10 % (3) produktive FeLV-Infektionen auf, während von den 28 immunhistologisch negativen Tieren 15 (54 %) latent FeLV-infiziert waren. Es waren nur sechs reine Wohnungskatzen in der Gesamtpopulation vertreten. Keine war

immunhistologisch positiv, drei (50 %) waren in der PCR positiv und damit latent infiziert. Die zweitgrößte Gruppe waren die Katzen, die mit anderen Katzen in einem Haushalt lebten. 20 (59 %) von 34 immunhistologisch negativen Tieren waren latent infiziert. Zehn von insgesamt 44 Tieren (23 %) waren immunhistologisch positiv.

Die größte Gruppe stellten die Tierheim- bzw. Fundkatzen dar. Von insgesamt 50 Tieren waren drei persistent produktiv und 34 (72 %) der restlichen 47 Tiere latent FeLV infiziert. Damit war diese Gruppe auch diejenige mit dem höchsten Anteil latenter FeLV-Infektionen. Es war ein gerade noch signifikanter Zusammenhang von der latenten FeLV-Infektion mit der Herkunft aus einem Tierheim mit einem p-Wert $< 0,05$ ($p = 0,04780$) festzustellen (siehe Diagramm 4.3). Von 38 der 47 Antigen-negativen Tiere war die Rasse bekannt. 34 waren EKH-Tiere, weiterhin zählten eine Perserkatze und drei weitere Edelrassen aus Tierschutzeinrichtungen zu diesen Tieren. Tiere, von denen keine Herkunft bekannt war, wiesen im Vergleich zu denen, von denen sie bekannt war, mit 48 % eine um 16 % niedrigere latente FeLV-Infektionsrate auf. Der Unterschied zu der Gruppe mit bekannter Herkunft war mit $p = 0,00667$ statistisch signifikant.

Von 27 Tierheimkatzen konnte das Alter ermittelt werden. Sie waren durchschnittlich 28 Monate alt (Median: 4 Monate). Latent FeLV-infizierte Katzen waren dabei 33 Monate alt (Median: 9 Monate), FeLV-negative Katzen 14 Monate alt (Median: 3 Monate). Bei der statistischen Auswertung mit allen bei privat gehaltenen Herkünften genannten Untergruppen ergab sich keine signifikante Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion

Diagramm 4.3: Herkunft der Tiere und Häufigkeit latenter FeLV-Infektionen



4.4.3.4. Geschlecht

Bis auf fünf Tiere wurde das Geschlecht aller Katzen vermerkt. Von 297 Tieren waren 73 männlich, 73 männlich kastriert, 85 weiblich und 66 weiblich kastriert. Unter den 26 immunhistologisch positiven Tieren waren nur sieben Kater, davon sechs kastriert. 19 Kätzinnen waren in dieser Gruppe, neun davon kastriert. Von 271 immunhistologisch FeLV-negativen war das Geschlecht bekannt. Die Geschlechtsverteilung dieser Tiere gestaltete sich derart, dass 139 männliche Tiere, von denen 67 kastriert waren, 132 weiblichen, von denen 57 kastriert waren, gegenüberstanden.

63 % (n= 87) der männlichen Tiere waren latent infiziert, das galt auch für 48 % der weiblichen Tiere (64). Damit waren die latente Infektion und die Eigenschaft männlich zu sein signifikant miteinander assoziiert ($p < 0,01946$). Unterteilte man die zwei Gruppen weiter in männliche Tiere, männlich kastrierte Tiere, weibliche Tiere und weibliche kastrierte Tiere so zeigte sich bei Auswertung des Signifikanztests kein signifikantes Ergebnis ($p=0,1276$).

Die 109 männlichen und nicht produktiv FeLV-infizierten Tiere, von denen das Alter bekannt war, waren im Mittel 57 Monate alt (Median: 24 Monate). 42 % der männlichen Tiere waren in der Altersgruppe 1, 40 % waren in Altersgruppe 2, 17 % waren in der Altersgruppe 3.

Die 119 weiblichen Tiere, von denen das Alter bekannt war, waren durchschnittlich 45 Monate alt (Median: 12 Monate), 58 % waren in Altersgruppe 1, 29 % waren in Altersgruppe 2, 13 % in Altersgruppe 3. Weitere Angaben zur Altersverteilung siehe Tabelle 4.3.

Tabelle 4.3: Altersverteilung der latent infizierten und FeLV-negativen Katzen unter Angabe des arithmetischen Mittelwertes und des Medians

	Männlich (Alter in Monaten)		Weiblich (Alter in Monaten)	
	Arithmetischer Mittelwert	Median	Arithmetischer Mittelwert	Median
Gesamt	57	24	45	12
Latent infiziert	64	39	59	24
FeLV negativ	39	13	32	12

4.4.3.5. Erhaltungszustand der Tierleichen/DNS-Qualität

Bei der Sektion wurde der Erhaltungszustand der Tierleichen in vier Kategorien eingeteilt: „Frisch“ (I), „nicht mehr frisch“ (II), „fortgeschritten autolytisch und faul“ (III), „gefroren“ (IV). Das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese zur Abklärung der Degradation der DNS nach Extraktion aus Knochenmark unterschiedlichen Erhaltungszustandes findet sich in Abb. 9.5. Bei allen zufällig ausgewählten 18 DNS-Proben konnte hochmolekulare DNS nachgewiesen werden. Eine Probe eines fortgeschritten autolytischen und faulen Tieres zeigte einen höheren Grad der Degradation, was durch einen lang ausgezogenen DNS-Schmier angezeigt wurde. Die gefrorenen Proben wiesen gegenüber den anderen Proben einen etwas stärkeren Degradationsgrad auf, was durch einen geringgradig verlängerten DNS-Schmier gezeigt wurde.

Eine Übersicht über die Häufigkeit positiver U3-PCR-Ergebnisse unter Angabe der verschiedenen Erhaltungszustände gibt Tabelle 4.4.

Bei Anwendung des Chi-Quadrat-Tests für alle vier Kategorien von Erhaltungszuständen ergab sich hierfür ein p-Wert von 0,0963. Fasste man gefrorene und frische Tierkörper (I + IV) sowie nicht mehr frische und fortgeschritten autolytisch und faule Tierkörper (II + III) in jeweils einer übergeordneten Kategorie zusammen, so ergab sich ein signifikanter p-Wert von 0,03521.

Tabelle 4.4: Übersicht über Erhaltungszustände der Tierleichen mit absolutem und relativem Anteil latenter Infektion sowie Angabe des Durchschnittsalters der latent FeLV-Infizierten

Erhaltungszustand	Anzahl gesamt	U3-positiv	% U3-positiv	Alter in Monaten (arithm. Mittelwert)	Alter in Monaten (Median)
I	35	24	69 %	81	36
II	172	85	49 %	48	18
III	41	25	61 %	40	12
IV	28	18	64 %	55	20

Die Tiere aus der übergeordneten Kategorie gefroren oder frisch (I + IV) waren mit einem Durchschnittsalter von 71 Monaten (Median: 30 Monate) älter als die Tiere der anderen übergeordneten Kategorie (II + III) (47 Monate, Median: 18 Monate). Am ältesten waren die Tiere der Kategorie „frisch“ mit dem höchsten Prozentsatz U3-positiver Tiere und einem Durchschnittsalter von 81 Monaten (Median: 36 Monate).

4.4.3.6. Erkrankungen im Zusammenhang mit der produktiven FeLV-Infektion

In diesem Kapitel sind die Diagnosen der Katzen, bei denen immunhistologisch FeLV-Antigen nachgewiesen werden konnte, zusammengefasst.

4.4.3.6.1. Allgemeindiagnosen, organübergreifende Diagnosen, Neoplasien

Die vorherrschende Diagnose bei den immunhistologisch FeLV-positiven Tieren waren die Leukosen. Insgesamt litten 15 der 26 Katzen an Erkrankungen des Leukose-Formenkreises (58 %). Damit waren 65 % der untersuchten Leukosen immunhistologisch FeLV-positiv. Es traten 14 lymphatische Leukosen und eine Myeloproliferation auf. Weitere Neoplasien waren bei vier Tieren aufgetreten. Es handelte sich um ein Meningiom des Großhirnbereichs, ein Bronchialadenom, ein Plattenepithelkarzinom der Haut im Kopfbereich und ein Adenokarzinom des Gesäuges. Anämien wurden bei sieben (27 %) der 26 Katzen festgestellt. Eine Feline Infektiöse Peritonitis war bei vier Tieren (15 %) ausgebildet. Bei zwei Tieren konnten eitrige Entzündungen festgestellt werden.

4.4.3.6.2. Organspezifische Diagnosen

In Tabelle 4.5 sind die organspezifischen Diagnosen, die bei produktiv infizierten Tieren auftraten zusammengestellt, ausgenommen diejenigen, die bereits in Kapitel 4.4.3.6.1. erwähnt wurden.

Tabelle 4.5: Organdiagnosen bei den produktiv FeLV-infizierten Sektionskatzen (ohne Neoplasien)

Organ	Diagnose	Anzahl
Niere	Nichteitrige interstitielle Nephritis	3
	Chronische Glomerulonephritis	1
	Zysten	1
	Beidseitige Schrumpfnieren	1
Leber	Diffuse Verfettung	5
Lunge	Atelektase	4
Lymphknoten	Follikuläre Hyperplasie	1
	Follikeldepletion	2
Milz	Follikuläre Hyperplasie	2
	Pulpöse Hyperplasie	1
	Extramedulläre Hämatopoese	1
Gefäße	Wandverkalkungen	2
Augen	Phthisis bulbi	1
Pankreas	Knotige Hyperplasie	2

4.4.3.7. Erkrankungen im Zusammenhang mit der latenten FeLV-Infektion

In diesem Abschnitt wurden die Diagnosen der 276 Katzen zusammengefasst, bei denen immunhistologisch kein FeLV-Antigen nachgewiesen werden konnte.

4.4.3.7.1. Allgemeindiagnosen, organübergreifende Diagnosen, Neoplasien

4.4.3.7.1.1. Unklare Erkrankungs- oder Todesursache

Hier wurden alle Sektionsfälle erfasst, die zu keinem eindeutigen Ergebnis bei der Feststellung der Todesursache bzw. der zugrunde liegenden Erkrankung führten. Das ist nicht so zu verstehen, dass hier keinerlei Befunde erhoben werden konnten. Die gestellten Diagnosen wurden vielmehr als nicht ausreichend zur Klärung des Krankheitsgeschehens angesehen.

Bei 26 Tieren musste dieses unbefriedigende Gesamtergebnis nach Abschluss der Untersuchungen anerkannt werden. Es konnte bei 14 der 26 Tiere eine latente FeLV-Infektion mit der PCR gezeigt werden (54 %). Dieser Anteil unterschied sich nicht signifikant von der Häufigkeit der latenten FeLV-Infektion in den beiden Vergleichsgruppen („fortlaufend“ und „reine Traumakatten“).

4.4.3.7.1.2. Anämie

18 % der Tiere, bei denen immunhistologisch keine FeLV-Infektion nachzuweisen war, litten an einer Anämie. Von diesen 49 Katzen wiesen 28 genomische U3-Sequenzen auf, galten also als latent FeLV-infiziert. Der Unterschied in der Häufigkeit aller Anämien war gegenüber den Vergleichsgruppen „Fortlaufend“ und „reine Traumakatten“ statistisch nicht signifikant. Bereinigt man die Anämiegruppe von Katzen, die infolge eines Traumas anämisch waren, so blieben 45 Tiere übrig, von denen 28 U3-positiv waren (62 %). Nahm man weitergehend gleichzeitig an FIP, Pankeukopenie oder Leukose erkrankte Tiere und Traumakatten aus, bei denen die Anämie als Begleiterscheinung dieser Erkrankungen gewertet werden konnte, so blieben 27 Katzen übrig, von denen 19 U3 positiv waren (70 %). Diese Katzen wiesen durchschnittlich ein Alter von 59 Monaten auf (Median: 30 Monate). Der mittlere Altersunterschied kann Tabelle 4.10 entnommen werden. 14 Katzen wiesen eine Anämie als Haupterkrankung auf. Von diesen waren zehn U3-positiv (71 %) und wiesen ein Durchschnittsalter von 54 Monaten auf (Median: 48 Monate).

Sieben dieser Katzen waren bekannter Herkunft. Fünf stammten aus Tierschutzeinrichtungen, davon waren zwei latent FeLV infiziert. Eine latent infizierte Katze stammte aus einer Zucht und eine aus einer Wohnungshaltung.

Die p-Werte < 0,05 (hervorgehoben) in Tabelle 4.6 zeigten eine statistisch signifikante Assoziation der latenten FeLV-Infektion mit verschiedenen Anämiegruppen im Vergleich zur Gruppe der „reinen Traumakatten“ an.

Tabelle 4.6.: p-Werte bei Anämien

Anämie	Vergleichsgruppe (p-Werte)	
	„fortlaufend“	„reine Traumakatzen“
gesamt	0,74801	0,05852
excl. Trauma	0,29190	0,02480
excl. Trauma, FIP, Panleukopenie, Leukose	0,09248	0,00930
als Hauptdiagnose	0,20667	0,02359

4.4.3.7.1.3. Neoplasien

Es traten insgesamt 8 lymphatische Leukosen auf. Vier betroffene Tiere waren latent FeLV-infiziert. Es war keine signifikante Assoziation zur latenten FeLV-Infektion festzustellen. Tiere mit lymphatischen Leukosen waren durchschnittlich 97 Monate (Median: 78) alt. Die latent infizierten Tiere waren dabei im Durchschnitt 136 Monate (Median: 169), FeLV-negative Tiere mit Leukosen waren durchschnittlich 69 Monate alt (Median: 66 Monate) (vgl. Tabelle 4.10).

Von zwei Tieren mit Fibrosarkom der Unterhaut und drei Tieren mit Meningiom waren zwei U3-positiv. Hierbei war ebenfalls keine Signifikanz auszumachen. Die fünf Tiere waren durchschnittlich 116 Monate (Median: 111 Monate) alt. Ein Tier mit einem Hämangiosarkom im großen Netz war nicht latent FeLV-infiziert. Bei den epithelialen Tumoren entfielen von insgesamt 17 Fällen 13 auf Karzinome und vier auf Adenome. Adenome traten zweimal im Pankreas, einmal in der Schilddrüse und einmal als Bronchialdrüsenadenom auf. Von den Karzinomen waren vier in der Lunge und drei in der Leber lokalisiert. Daneben lagen ein Adenokarzinom der Nase, ein Adenokarzinom des Darmes, ein Pankreaskarzinom, zwei Plattenepithelkarzinome in der Haut und eines in der Mundschleimhaut vor. Während von den Karzinomträgern neun (69 %) latent FeLV-infiziert waren, waren alle vier Katzen mit Adenomen positiv, insgesamt also 77 % aller Tiere mit epithelialen Tumoren. Damit war ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit dieser Neoplasien im Vergleich zur Gruppe der reinen Traumakatzen vorhanden ($p=0,00707$). Der Unterschied gegenüber der fortlaufenden Population war noch nicht signifikant ($p=0,06710$). Tiere mit epithelialen Tumoren waren im Mittel 145 Monate (Median: 156) alt. Für Altersunterschiede zwischen latent infizierten Katzen und FeLV-negativen Katzen mit epithelialen Tumoren siehe Tabelle 4.10.

4.4.3.7.1.4. Mißbildungen

Von insgesamt 13 Katzen mit Mißbildungen waren nur sechs U3-positiv, was einen nicht signifikanten Unterschied darstellte (46 %). Die Mißbildungen beinhalteten eine renale Dysplasie, eine Nierenhypoplasie, sechs Tiere mit Nierenzysten, einen Hydrocephalus internus, eine cerebelläre Abiotrophie, einen persistierenden Ductus arteriosus botalli, einen subaortalen Ventrikelseptumdefekt und eine Polydaktylie (Durchschnittsalter von fünf Tieren: 46 Monate, Median 5 Monate).

4.4.3.7.1.5. Feline Infektiöse Peritonitis (FIP)

Die Feline Infektiöse Peritonitis (FIP) war mit 37 Fällen die häufigste Infektionskrankheit und stellte hinter der Anämie die häufigste aller Diagnosen dar (13 %). Bei allen FIP-Diagnosen konnte der Erreger immunhistologisch nachgewiesen werden. In 18 Fällen konnte exogene U3-Sequenz im FIP-Virus-infizierten Tier nachgewiesen werden (49 %). Dieser Anteil unterschied sich nicht signifikant zu den in den beiden Vergleichsgruppen festgestellten FeLV-Raten. 25 FIP-erkrankte Katzen waren im Durchschnitt 15 Monate (Median: 9 Monate) alt. Latent FeLV-infizierte und an FIP erkrankte Tiere waren im Durchschnitt 19 Monate (Median: 8 Monate), FeLV-negative FIP-erkrankte Tiere waren im Mittel 11 Monate (Median: 9 Monate) alt.

4.4.3.7.1.6. Feline Panleukopenie

Die auch als Katzenseuche bezeichnete feline infektiöse Panleukopenie (Parvovirusinfektion) war ebenfalls mit 27 Fällen (10 %) eine häufige Infektionskrankheit. In 23 Fällen konnte der Erreger immunhistologisch oder virologisch nachgewiesen werden. Bei den vier übrigen Tieren wurde die Diagnose nur morphologisch gestellt. 16 Katzen mit Panleukopenie wiesen zusätzlich auch eine latente FeLV-Infektion auf (59 %). Dieser Prozentsatz lag nur geringfügig höher als der in der fortlaufenden Vergleichsgruppe, infolgedessen sich hier, wie auch im Vergleich zu den reinen Traumakatten, kein signifikanter Unterschied nachweisen ließ, obwohl der p-Wert beim Vergleich mit der Traumapopulation mit $p=0,06424$ in der Nähe des Signifikanzniveaus lag. Vergleich man die Häufigkeit der latenten FeLV-Infektion in der reinen Traumagruppe mit der Häufigkeit der latenten FeLV-Infektion in den Fällen, in denen Parvovirus virologisch oder immunhistologisch nachgewiesen werden konnte, so

verhielt sich dieser Unterschied statistisch signifikant (15 von 23 Tieren U3-positiv; $p=0,03$). Die Tiere mit Parvovirusinfektionen waren im Durchschnitt 19 Monate (Median: 3 Monate) alt. Altersunterschiede zwischen latent FeLV-infizierten Katzen und FeLV-negativen Parvovirus-positiven Tieren sind in Tabelle 4.10 dargestellt. Von 18 Katzen war die Herkunft bekannt. 15 stammten aus Tierschutzeinrichtungen und drei aus Mehrkatzenhaushalten.

4.4.3.7.1.7. Sepsis

Infolge einer Sepsis verstarben 14 Tiere. Als Sepsiserreger wurden Klebsiellen, Streptokokken, Salmonellen, E. coli und Pasteurella multocida festgestellt. Siebenmal konnte dabei gleichzeitig eine latente FeLV Infektion (50 %) nachgewiesen werden. Kein statistisch signifikanter Unterschied war zwischen diesem Anteil und dem Anteil latenter FeLV-Infektionen in reiner Trauma- und fortlaufender Vergleichsgruppe zu ermitteln.

4.4.3.7.1.8. Trauma

Insgesamt waren 30 Katzen infolge eines Traumas verstorben („Traumakatten“). Das waren 11 % der von immunhistologisch FeLV-positiven Katzen bereinigten Stichprobe. 19 dieser Tiere wiesen keine weiteren Diagnosen auf („reine Traumakatten“). Bei diesen Tieren wurde von der Hypothese ausgegangen, dass sie mit Sicherheit nicht an einer FeLV-bedingten Erkrankung verstorben sind. Deshalb dienten die „reinen Traumakatten“ auch neben der Gruppe „Fortlaufend“ als zweite Vergleichsgruppe. Insgesamt wurden bei zwölf „Traumakatten“ exogene U3-Sequenzen festgestellt (40 %). Der Unterschied im Vergleich zur fortlaufenden Population war noch nicht signifikant ($p=0,0788$), was sich nach der Beschränkung auf die „reinen Traumakatten“ änderte. Von den 19 Katzen waren sechs latent infiziert (32 %; $p=0,03289$). Die Herkunft von neun „reinen Traumakatten“ konnte ermittelt werden. Sechs waren Freigänger, eine stammte aus einer Zucht und zwei waren aus Tierschutzeinrichtungen.

Nichtinfizierte „Traumakatten“ waren im Mittel mit einem Alter von 33 Monaten gerade noch signifikant jünger als latent infizierte mit einem Durchschnittsalter von 65 Monaten ($p=0,048$). Es konnte von 12 der 19 „reinen Traumakatten“ das Alter ermittelt werden. Nichtinfizierte „reine Traumakatten“ waren durchschnittlich 13 Monate, latent infizierte 42 Monate alt.

4.4.3.7.1.8. Eitrige Entzündungen

In verschiedenen Organen wurden eitrige Entzündungen festgestellt. Da die Fallzahlen in manchen Organsystemen sehr klein waren, wurden sie als übergeordnete Diagnose zusammengefasst. In dieser Kategorie traten als Entzündungen des Respirationstraktes die Streptotrichose, katarrhalisch-eitrige bis eitrig-nekrotisierende Pneumonien bzw. Bronchopneumonien, Bronchitiden, Rhinitiden und Laryngitiden auf. Ebenfalls aufgenommen wurde der Einzelfall einer pyogranulomatösen Pneumonie infolge einer Mykobakterieninfektion.

Weiterhin fanden hier eitrige Meningitiden, Nephritiden, Cholangitiden, Dermatitisen und Phlegmonen, Otitiden, Keratitiden und eine Panophthalmitis, Endo- und Myocarditiden, eine eitrige Entzündung der Kastrationsstümpfe einer ovari- und teilhysterektomierten Katze sowie eitrige Osteomyelitiden und Arthritiden Eingang. Insgesamt wurde 62 mal bei 50 verschiedenen Tieren die Diagnose einer eitrig-Entzündung gestellt. 38 dieser Diagnosen traten im Zusammenhang mit einer latenten FeLV-Infektion auf (61 %), 24 (39 %) nicht. Dieser Unterschied war zur Vergleichsgruppe „reines Trauma“ statistisch signifikant ($p=0,02293$). Bei neun latent infizierten Tieren und drei nicht latent infizierten trat zweimal eine solche Diagnose auf, so dass 50 verschiedene Tiere von eitrig-Entzündungen betroffen waren, von denen 29 (58 %) latent infiziert waren. Auch aus dieser Sicht war im Vergleich mit der „reinen Traumagruppe“ der Unterschied gerade noch statistisch signifikant ($p=0,04989$). Die Tiere mit eitrig-Entzündungen waren durchschnittlich 61 Monate (Median: 24) alt. Bei den zwölf Tieren mit multiplen eitrig-Entzündungen (75 % latent infiziert) war im Vergleich zur Gruppe „reines Trauma“ ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,02901$) in der Häufigkeit latenter FeLV-Infektionen festzustellen.

4.4.3.7.2. Aetiologische Diagnosen

4.4.3.7.2.1. Nichtvirale Infektionen

Zu den nichtviralen Infektionen können verschiedene bakterielle, parasitäre und pilzbedingte gezählt werden. 49 nichtvirale Infektionen wurden insgesamt diagnostiziert. Dabei trat bei einem Tier gleichzeitig eine bakterielle Infektion und eine Helminthose und bei einem eine bakterielle und eine mykotische Infektion auf, so dass 47 verschiedene Tiere von nichtviralen Infektionen betroffen waren. Von diesen waren 33 latent FeLV-infiziert (70 %). Das waren

signifikant mehr Tiere im Vergleich zur fortlaufenden Population ($p= 0,02197$). Die Tiere waren im Durchschnitt 37 Monate (Median: 6 Monate) alt. Zum Altersvergleich zwischen latent infizierten Katzen und FeLV-negativen Katzen bei dieser Diagnose kann Tabelle 4.10 herangezogen werden. Von 33 Tieren war die Herkunft bekannt. 13 stammten aus Tierheimen, 11 aus Mehrkatzenhaushalten, sechs waren Freigänger und drei stammten aus einer Zucht.

4.4.3.7.2.1.1 Bakterielle Infektionen

Bei 37 Tieren konnte eine bakterielle Infektion nachgewiesen werden. Insgesamt waren 24 dieser Tiere zusätzlich latent FeLV infiziert. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 65 %. Dieser Unterschied war im Vergleich zu den „reinen Traumakatten“ (32 %) statistisch signifikant ($p= 0,01804$), nicht aber im Vergleich zur fortlaufenden Population ($p= 0,19815$). Als bakterielle Infektion wurde der Nachweis von obligat oder fakultativ pathogenen Keimen unter Berücksichtigung antibakterieller Vorbehandlungen, postmortalen Fäulnisprozesse und Umweltkontamination in Verbindung mit einer morphologischen Organveränderung oder Hinweisen auf eine Sepsis gewertet. Die Tiere mit bakteriellen Infektionen waren durchschnittlich 39 Monate (Median: 6 Monate) alt (vgl. auch Tabelle 4.10).

4.4.3.7.2.1.2 Parasitosen

Bei acht Tieren konnte ein Befall mit Nematoden oder Cestoden nachgewiesen werden. Sieben Tiere waren U3-positiv (88 %). Der Vergleich zur fortlaufenden Population lieferte hier noch kein signifikantes Ergebnis, im Vergleich mit der reinen Traumapopulation war allerdings eine signifikante Assoziation nachweisbar ($p= 0,07759$ bzw. $p= 0,01275$). Von sechs Katzen mit Wurmbefall war das Alter bekannt. Sie waren durchschnittlich 38 Monate (Median: 30 Monate) alt. Ein Tier stammte aus einer Tierschutzeinrichtung.

U3-Sequenzen wurden bei zwei von drei von Flohbefall betroffenen Tieren gefunden (67 %). Es konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

4.4.3.7.2.1.3 Mykosen

Bei einem Tier konnte eine Histoplasmosose diagnostiziert werden. Dieses Tier war U3-positiv. Gleichzeitig konnte bei diesem Tier eine beta-Streptokokkeninfektion nachgewiesen werden.

4.4.3.7.2.2. Virusinfektionen

Hier wurden feline Herpesvirus-, feline Calicivirus- und eine feline enterale Coronavirusinfektion, die nicht zur Ausbildung einer FIP geführt hat, zusammengefasst. Parvovirusinfektionen sind bereits in Kapitel 4.4.3.7.1.6 abgehandelt.

Das häufigste Virus war dabei mit sechs Nachweisen das feline Calicivirus. Fünf mit Calicivirus-infizierte Tiere waren auch latent FeLV-infiziert (83 %). Dreimal wurde das feline Herpesvirus entdeckt. Ein Tier wies sowohl Herpes- als auch Caliciviren auf. Dies war das einzige Tier mit Herpesvirusinfektion, welches auch U3-Sequenzen aufwies und daher als latent FeLV infiziert galt. Das enterale Coronavirus konnte bei einem U3-negativen Tier nachgewiesen werden. Insgesamt waren damit 56 % aller virusinfizierten Katzen U3-positiv. Es gab keinen signifikanten Unterschied zu den beiden Vergleichsgruppen.

4.4.3.7.3. Organspezifische Diagnosen

4.4.3.7.3.1. Leber

Die häufigste Diagnose, die an der Leber gestellt wurde, war die diffuse Leberverfettung. Hiervon waren 35 Tiere betroffen. 46 % davon waren latent FeLV infiziert (n= 16). Von sechs Tieren mit Pericholangitiden waren vier U3-positiv (67 %). Das galt auch für fünf von acht Katzen, bei denen Lebernekrosen festgestellt werden konnten (63 %). Bei drei Tieren mit hepatozellulären Degenerationserscheinungen waren keine exogenen U3-Sequenzen nachweisbar. Ein Tier mit einem nicht FIP-assoziierten Granulom und zwei Tiere mit Leberzysten waren ebenfalls nicht latent FeLV-infiziert.

Latente FeLV-Infektionen waren weiterhin in Verbindung mit einer Peliosis hepatis (100 %) sowie einer Fibrose des Leberparenchyms (100 %) und in zwei von vier Fällen mit Leberzelldissoziation (50 %) festzustellen.

Bei den genannten Diagnosen konnte weder eine statistisch signifikante Häufung noch eine signifikante Abnahme bei latent infizierten Katzen im Vergleich mit den Vergleichsgruppen errechnet werden.

4.4.3.7.3.2. Niere und harnableitende Wege

Verkalkungen der Tubuli waren nur bei latent infizierten Katzen zu finden. Insgesamt waren sechs Tiere davon betroffen. Gegenüber der Vergleichsgruppe „Fortlaufend“ ergab das einen signifikanten Unterschied ($p= 0,0344$). Nur bei einer Katze konnte gleichzeitig eine Urämie festgestellt werden. Von vier dieser Tiere war das Alter bekannt. Sie waren im Durchschnitt 40 Monate (Median: 24 Monate) alt. Ein weiteres signifikantes Ergebnis wurde beim Vorliegen einer nichteitrigen interstitiellen Nephritis im Vergleich mit den „reinen Traumakatten“ erkennbar. 22 von 33 (67 %) Tieren mit dieser Diagnose waren latent FeLV-infiziert ($p= 0,01452$). Im Vergleich mit der fortlaufenden Population war das Ergebnis nicht signifikant ($p= 0,1536$). Der Altersdurchschnitt von 27 Tieren betrug 95 Monate (Median. 96 Monate) (siehe auch Tabelle 4.10).

Weitere signifikante Ergebnisse ergaben sich in diesem Organsystem nicht. Das galt sowohl für das Vorliegen von multiplen Nierenzysten (drei von sechs Tieren U3-positiv) als auch für Schrumpfnieren (neun von 16 Tieren U3-positiv). Von elf Glomerulosklerosen waren sechs (55 %), von sechs Tubulonephrosen waren drei U3-positiv. Bei drei Katzen mit Niereninfarkten konnten keine exogenen U3-Sequenzen nachgewiesen werden.

4.4.3.7.3.3. Lunge

Bei allen drei Tieren mit diffus atelektatischem Lungenparenchym waren exogene U3-Sequenzen nachweisbar. Eine Hyperplasie glatter Muskelzellen der Bronchien und Bronchiolen trat bei zwei Tieren auf, wovon eines exogene U3-Sequenzen aufwies. Ein Tier mit einer Sklerosierung des Lungeninterstitiums (Gerüstsklerose) war ebenso wie eines von zwei Tieren mit einer interstitiellen Pneumonie U3-positiv. Es ergaben sich bei diesen Diagnosen keine signifikanten Assoziationen.

4.4.3.7.3.4. Nervensystem

Die Diagnosen in dieser Kategorie sind bis auf vier nichteitrige Enzephalitiden, Meningitiden bzw. Myelitiden in übergeordneten Kategorien vertreten. Dazu zählten drei Meningiome, zwei traumabedingte Läsionen, 17 im Rahmen einer FIP auftretende Veränderungen, ein Hydrocephalus internus, eine leukotische Infiltration und vier eitrig-eitrige Meningitiden. Von den nichteitrigen Entzündungen des Nervensystems waren drei bei latent FeLV-infizierten Tieren anzutreffen (75 %), was allerdings keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen ausmachte.

4.4.3.7.3.5. Magen-Darm-Trakt

Zwei Tiere, bei denen deutliche Zahnsteinbildung aufgefallen war, waren auch U3-positiv. Obstruktionen des Magen-Darmtraktes kamen bei sechs Tieren vor, zwei davon waren latent FeLV-infiziert. Ein an einer Koprostase leidendes Tier war auch latent infiziert.

Bei ulzerativen Schleimhautveränderungen des Verdauungstraktes wurden die mit einer Urämie einhergehenden von den nicht mit einer Urämie vergesellschafteten unterschieden. Erstere traten neunmal auf, sechsmal bei U3-positiven Tieren (67 %), letztere traten siebenmal auf, nur einmal bei einer U3-positiven Katze (14 %), was einen gerade noch statistisch signifikant geringeren Prozentsatz im Vergleich zur fortlaufenden Vergleichsgruppe darstellte ($p=0,04805$). Im Vergleich zu den „reinen Traumakatten“ war dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant ($p=0,62878$).

Nahm man 23 Parvovirusenteritiden, die bereits in einer anderen Kategorie (Kapitel 4.4.3.7.1.6) berücksichtigt waren, aus, so blieben 20 Enteritiden übrig, von denen 13 bei Katzen mit latenter FeLV-Infektion auftraten (65 %). Dies ergab einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Vergleichsgruppe „reines Trauma“ ($p=0,03688$). Neben dreizehn akuten diffusen Enteritiden waren auch drei zum Teil (diphtheroid)-nekrotisierende, eine mukoide und zwei chronische Enteritiden anzutreffen. Bei 18 Tieren mit Enteritis war das Alter bekannt. Der Altersdurchschnitt betrug 45 Monate (Median: 8 Monate, siehe auch Tabelle 4.10). Von elf Tieren war die Herkunft bekannt. Acht stammten aus Tierschutzeinrichtungen, davon waren fünf latent infiziert. Drei latent infizierte Tiere stammten aus Mehrkatzenhaushalten.

4.4.3.7.3.6. Geschlechtsorgane

Es wurde an den Geschlechtsorganen nur bei einem Tier eine Diagnose gestellt. Es handelte sich um eine eitrige Entzündung der Kastrationsstümpfe bei einer Kätzin, die in den übergeordneten „eitrigem Entzündungen“ mit berücksichtigt ist. Bei diesem Tier konnte auch eine latente FeLV-Infektion festgestellt werden.

4.4.3.7.3.7. Augen

Am Auge wurden insgesamt zehn Diagnosen gestellt. Sieben FIP-assoziierte Läsionen sind schon in der organübergreifenden Diagnosegruppe „FIP“ (Kapitel 4.4.3.7.1.5.) mit erfasst. Ein Tier mit einer Iriszyste war U3-negativ. Drei eitrige, z.T. auch ulzerative Entzündungen (Panophthalmitis/Keratitis), von denen zwei U3-positiv waren, wurden ebenfalls bereits in die organübergreifende Diagnosegruppe „eitrigem Entzündungen“ einbezogen.

4.4.3.7.3.8. Ohren

Außer vier Otitiden konnten keine weiteren Befunde erhoben werden. Zwei der Otitiden waren auf die äußeren Gehörgänge beschränkt, während die zwei anderen auch das Mittel- und Innenohr betrafen. Bei Tieren mit Otitiden konnte in allen Fällen eine latente FeLV-Infektion nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war im Vergleich zu den „reinen Traumakatten“ statistisch signifikant ($p=0,02372$). Zwei Tiere waren im Mittel 108 Monate alt.

4.4.3.7.3.9. Haut/Unterhaut

In der Haut waren neun eitrige Dermatitiden und Phlegmonen nachzuweisen, von denen sechs U3-positiv waren (67 %). Gemeinsam mit dem Vorliegen einer Hyperkeratose waren auch exogene U3-Sequenzen bei einer Katze nachzuweisen. Desweiteren waren 19 traumabedingte Läsionen, zwei Plattenepithelkarzinome und zwei Fibrosarkome in der Haut oder der Unterhaut festzustellen, die alle auch in übergeordneten Diagnosegruppen einbezogen wurden. Bei den hier genannten Einzeldiagnosen ergaben sich keine statistisch signifikanten Assoziationen.

4.4.3.7.3.10. Pankreas

Eine Katze mit einer Inselatrophie war U3-positiv. Ebenso konnten bei einer Katze mit einer chronischen Pankreatitis exogene U3-Sequenzen festgestellt werden. Von zwei Katzen mit Pankreasnekrosen war keine in der U3-PCR positiv. Das galt auch für eine knotige Hyperplasie. Die drei epithelialen Tumoren des Pankreas, ein tubulopapilläres Karzinom sowie zwei multipel auftretende Adenome, waren alle U3-positiv und sind in den Abschnitt über Neoplasien eingearbeitet.

4.4.3.7.3.11. Thymus

Zehn pathologische Veränderungen wurden am Thymus beobachtet. Bis auf den einzigen Fall einer immunhistologisch negativen Thymusleukose und einen Fall einer Katze mit Lymphozytendepletion waren die betroffenen Tiere latent FeLV-infiziert (80 %). Dies umfasste sowohl drei Fälle einer vorzeitigen Thymusinvolution und zwei mit Lymphozytendepletion als auch einen Fall einer verzögerten Thymusinvolution. Dazu kamen noch zwei Fälle, bei denen Parenchymlutungen festgestellt wurden, wobei zumindest eine vermutlich traumatisch bedingt war. Keine der Einzeldiagnosen erreichte statistische Signifikanz beim gleichzeitigen Auftreten mit latenten FeLV-Infektionen im Vergleich zu den beiden Gruppen „fortlaufend“ und „reine Traumakatten“.

4.4.3.7.3.12. Lymphknoten

Follikelarme Lymphknoten und Follikeldepletion konnten bei 22 Katzen festgestellt werden. Vierzehn dieser Katzen waren latent infiziert (64 %). Dieses Ergebnis war im Vergleich zu der reinen Traumagruppe statistisch signifikant ($p=0,04058$). Das Alter von 15 Tieren war angegeben. Der Altersdurchschnitt betrug 29 Monate (Median: 9 Monate). Sogenannte Follikelnarben, follikelfreie Areale im Lymphknoten waren bei zwei von drei Tieren mit einer latenten FeLV-Infektion vergesellschaftet.

Ein deutlicheres statistisch signifikantes Ergebnis zeigte sich auch in Fällen von follikulärer lymphatischer Hyperplasie. Zwölf von 17 Tieren mit dieser Diagnose waren latent FeLV-infiziert (71 %), was einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur reinen Traumagruppe darstellte ($p=0,01944$). 12 Tiere, von denen das Alter bekannt war, waren im

Durchschnitt 45 Monate alt (Median: 12 Monate). Weitere Diagnosen waren sechs Fälle mit eitriger, granulomatöser oder nekrotisierender Lymphadenitis, 50 % davon U3-positiv. Von drei Lymphosarkomen mit Lymphknotenbeteiligung war nur eines U3-positiv. Im Einzelfall einer Katze mit Sinushistiozytose und Erythrophagie waren keine exogenen U3-Sequenzen nachweisbar, jedoch im einzigen Fall mit einer Hämosiderose des Lymphknotens.

4.4.3.7.3.13. Milz

35 Katzen zeigten eine Follikeldepletion, Apoptosen oder Nekrosen der Milzfollikel. Bei 60 % (21) der Katzen konnten exogene U3-Sequenzen in der PCR nachgewiesen werden. Die Häufigkeit der latenten FeLV-Infektion bei diesen Diagnosen variierte statistisch signifikant zur reinen Traumagruppe ($p=0,04607$). 29 Tiere mit Follikeldepletion in der Milz wiesen ein Durchschnittsalter von 66 Monaten auf (Median: 42 Monate). Eine Milzfollikelhyperplasie war dagegen bei 17 Tieren nachweisbar, von denen acht latent infiziert waren (47 %). Drei von fünf Katzen mit pulpösen Hyperplasien waren ebenfalls latent FeLV-infiziert (60 %). Hämosiderose in der Milz trat bei zwei Tieren auf, beide U3-negativ.

4.4.3.7.3.14. Körperhöhlen

Bei einem Tier, das gleichzeitig an einer Inselatrophie im Pankreas und einer diffusen Leberverfettung litt und das latent FeLV-infiziert war, waren Fettgewebnekrosen in der Bauchhöhle festzustellen. Blutungen in die Körperhöhlen, in das Gekröse sowie ins retroperitoneale Gewebe lagen bei 14 Tieren vor, wobei bis auf einen Hämangiosarkom, der infolge eines Hämangiosarkoms entstanden war, alle traumatischen Ursprung hatten. Das Tier mit dem Hämangiosarkom war nicht latent FeLV-infiziert.

Fünf von sieben Tieren mit serösen Ergüssen und beide Tiere mit einem Chylothorax wiesen exogene U3-Sequenzen auf (78 %). Das ergab einen statistisch signifikanten Unterschied in der Häufigkeit der latenten Infektion im Vergleich zur Vergleichsgruppe „reines Trauma“ mit einem p-Wert von 0,04182. Das Alter war von vier der latent infizierten Katzen zu ermitteln. Der Durchschnitt betrug dabei 42 Monate (Median: 15 Monate). Von fünf an Streptotrichose erkrankten Tieren waren vier latent FeLV-infiziert (80 %).

4.4.3.7.3.15. Herz

Kardiomyopathien konnten bei 16 Katzen festgestellt werden. Am häufigsten war mit acht Fällen die Hypertrophe Kardiomyopathie, bei der sich fünf erkrankte Tiere latent FeLV-infiziert zeigten (63 %). Die Dilatative Kardiomyopathie war sechsmal nachzuweisen, fünfmal waren die betroffenen Katzen latent FeLV-infiziert (83 %). Von zwei nicht näher klassifizierten Kardiomyopathien trat eine bei einer latent infizierten Katze auf. Von insgesamt 16 erkrankten Katzen waren somit elf U3 positiv. Das ergab einen Prozentsatz von 69 %, der damit im Vergleich zur Vergleichsgruppe „reines Trauma“ signifikant erhöht war ($p=0,02839$). Im Vergleich zur fortlaufenden Population erwies sich dieser Unterschied als nicht statistisch signifikant ($p=0,25712$). Elfmal konnte ein Alter ermittelt werden. Das Durchschnittsalter betrug 49 Monate (Median: 24 Monate, siehe auch Tabelle 4.10)).

Eine Lipomatosis cordis konnte bei einem latent FeLV-infizierten Tier festgestellt werden.

Desweiteren waren bei fünf Tieren, von denen nur eines latent infiziert war, Endo- oder Myocarditiden zu verzeichnen, von denen vier (zwei Myo- und zwei Endocarditiden) bereits in der Gruppe der eitrigen Entzündungen aufgeführt sind. Eine Katze mit nichteitriger Myocarditis war in der U3-PCR negativ.

4.4.3.7.3.16. Gefäße

Zwei Tiere mit Verkalkungen in Gefäßwänden waren U3-positiv. Bei fünf Tieren, von denen drei latent infiziert waren, konnten Aortenthrombosen nachgewiesen werden (60 %). Zwei Hypertrophien der Gefäßwand konnten zu 50 % als latent FeLV infiziert gewertet werden. Keine der Diagnosen ergab eine statistisch signifikante Assoziation.

4.4.3.7.3.17. Thyreoidea

Insgesamt wurden hier acht Diagnosen gestellt. Siebenmal verlief der U3-Nachweis positiv (88 %). Ein U3-positives Adenom wurde schon bei den Neoplasien aufgeführt. Daneben gab es in dieser Kategorie noch zwei U3-positiv Katzen mit parenchymatöser Struma, eine U3-positiv Katze mit chronischer Thyreoiditis sowie drei U3-positiv und eine U3-negativ Katzen mit Epithelkörperchenhyperplasie. Diese Diagnosen erlangten keine statistische Signifikanz.

4.4.3.7.3.18. Bewegungsapparat

Traumatische Läsionen, wie Frakturen sowie Muskel- und Sehnenrupturen fanden sich bei 18 Katzen, von denen 50 % U3-positiv waren. Entzündungen des Bewegungsapparates, zu denen Arthritiden, Myositiden und Osteomyelitiden gerechnet wurden, gab es in fünf Fällen. Vier Fälle wiesen auch eine latente FeLV-Infektion auf. Im einzigen Fall einer degenerativen Gelenkerkrankung (Coxarthrose) war auch eine latente FeLV-Infektion nachzuweisen. Dies galt auch für einen von zwei Fällen von Katzen mit Muskelatrophie

4.4.3.8. Übersichtstabellen

Tabelle 4.7: Übersicht über die Diagnosen mit statistisch signifikanter Assoziation ($p < 0,05$) zur latenten FeLV Infektion im Vergleich zur Gruppe „fortlaufend“ oder „reines Trauma“.

Parameter/Diagnose	% U3-positiv	p-Werte ($\alpha = 0,05$)	
		„fortlaufend“	„reines Trauma“
Follikeldepletion (Milz) (n=35)	60	nicht signifikant	0,04607
Kardiomyopathien (n=16)	69	nicht signifikant	0,02839
Hydrothorax, -perikard, Aszites, Chylothorax (n=7)	78	nicht signifikant	0,04182
Follikuläre Hyperplasie (Lymphknoten) (n=17)	71	nicht signifikant	0,01944
Follikeldepletion, Follikelschwund (Lymphknoten) (n=22)	64	nicht signifikant	0,04058
Otitiden (n=4)	100	nicht signifikant	0,02372
Gastrointestinale Ulzera (ohne Urämie) (n=7)	14	0,04805	nicht signifikant
Parvovirusinfektion (n=23)	65	nicht signifikant	0,03
Reines Trauma (n=19)	32	0,03289	nicht signifikant
Eitrige Entzündung (n=50), davon multipel (n=12)	58	nicht signifikant	0,04989
	75	nicht signifikant	0,02901
Nichtvirale Infektionen (n=47)	70	0,02197	nicht signifikant
Epitheliale Tumoren (n=17)	77	nicht signifikant	0,00707
Nichteitrige interstitielle Nephritis (n=33)	67	nicht signifikant	0,01452
Nierentubulusverkalkungen (n=6)	100	nicht signifikant	0,0344
Anämien (ohne Trauma, FIP, Panleukopenie, Leukose) (n=27)	70	nicht signifikant	0,0093
Wurmbefall (n=8)	88	nicht signifikant	0,01275
Enteritiden (ohne Panleukopenie) (n=20)	65	nicht signifikant	0,03688
Bakterielle Infektionen (n=37)	65	nicht signifikant	0,01804

Tabelle 4.8: Diagnosen mit signifikant positiver Assoziation zur latenten FeLV-Infektion im Vergleich zur Vergleichsgruppe „fortlaufend“ oder zur Gruppe der „reinen Traumakatzen“ und ihre unterschiedliche Prävalenz bei latent FeLV-infizierten und FeLV-negativen Tieren unter Angabe des Relativen Risikos

Parameter/ Diagnosen	Prävalenz der Diagnose		Relatives Risiko
	latent FeLV-infiziert (%)	FeLV-negativ (%)	
Follikeldepletion (Milz)	14,5	12,1	1,2
Kardiomyopathien	7,2	4,1	1,76
Hydrothorax, -perikard, Aszites, Chylothorax	3,3	1,6	2,06
Follikuläre Hyperplasie (Lymphknoten)	7,9	4,0	1,98
Follikeldepletion, Follikelschwund (Lymphknoten)	9,2	6,5	1,42
Otitiden	2,6	0	
Wurmbefall	4,6	0,8	5,75
Verkalkte Nierentubuli	3,9	0	
Enteritiden (ohne Panleukopenie)	8,6	5,6	1,54
Eitrige Entzündung (multipel)	25,0 (5,9)	16,9 (2,4)	1,48 (2,46)
Parvovirusinfektion	9,9	6,5	1,52
Nichteitrige interstitielle Nephritis	14,5	8,9	1,63
Bakterielle Infektionen	15,8	10,5	1,50
Nichtvirale Infektionen	21,7	11,3	1,92
Anämie (unklarer Ätiologie)	12,5	6,5	1,92
Epitheliale Tumoren	8,6	3,2	2,69

Tabelle 4.9: Diagnosen mit signifikant negativer Assoziation zur latenten FeLV-Infektion im Vergleich zur fortlaufenden Population und ihre unterschiedliche Prävalenz bei latent FeLV-infizierten und FeLV-negativen Tieren unter Angabe des reziproken Relativen Risikos

Parameter/ Diagnosen	Prävalenz der Diagnose		Reziprokes Relatives Risiko
	latent FeLV-infiziert (%)	FeLV-negativ (%)	
Reines Trauma	3,9	10,5	2,69
Schleimhautulzera im Magen-Darm-Trakt ohne Nachweis einer Urämie	0,7	4,8	6,86

Tabelle 4.10: Alter latent FeLV-infizierter und FeLV-negativer Tiere in den jeweiligen Diagnosegruppen

Diagnose(gruppe)	n	Arithmetischer Mittelwert (Monate)		Median (Monate)	
		latent FeLV-infiziert	FeLV-negativ	latent FeLV-infiziert	FeLV-negativ
Follikeldepletion (Milz)	29	77	49	63	24
Follikeldepletion, (Lymphknoten)	15	25	39	9	9
Follikuläre Hyperplasie (Lymphknoten)	12	53	23	12	12
Eitrige Entzündung	39	80	27	60	12
Eitrige Entzündung, multipel	14	104	35 (n=2)	114	35 (n=2)
Reines Trauma	12	42	13	48	12
Parvovirusinfektion	20	24	6	4	3
Gastrointestinale Ulzera (ohne Urämie)	5	3 (n=1)	19	3 (n=1)	13
Otitiden	2	108	-	108	-
Nichtvirale Infektionen	51	52	9	18	6
Epitheliale Tumoren	15	141	155	144	160
Hydrothorax, -perikard, Aszites, Chylothorax	4	42	-	15	-
Nichteitrige interstitielle Nephritis	27	99	82	102	90
Nierentubulusverkalkungen	4	40	-	24	-
Anämien (ohne Trauma, FIP, Panleukopenie, Leukose)	23	71	29	45	12
Wurmbefall	6	38	36 (n=1)	24	36 (n=1)
Enteritiden (ohne Panleukopenie)	18	50	37	24	3
Kardiomyopathien	11	51	45	30	8
Bakterielle Infektionen	30	58	7	18	6

5. Diskussion

5.1 Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz der latenten FeLV-Infektion in der geschilderten Stichprobe von 302 Sektionskatzen zu ermitteln. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die Ergebnisse zweier Methoden gegenübergestellt und verglichen, die beide dem FeLV-Nachweis dienen. In der vorliegenden Arbeit waren das zum einen die auf den Prinzipien der Proteinbiochemie beruhende Immunhistologie sowie die Polymerasekettenreaktion, die den Nachweis spezifischer Nukleinsäureabfolgen einer bestimmten Länge erbringt. Man muss sich klarmachen, dass beide hier verwendeten Methoden nur kleine Bereiche des Erregers nachweisen. Aus dem Nachweis dieser Bereiche wird auf das Vorhandensein des Erregers geschlossen. Während bei der hier verwendeten Immunhistologie je ein Epitop zweier verschiedener viraler Proteine als Nachweis der produktiven Infektion galt, standen bei der PCR der Nachweis von Banden einer Größe von 185 bp oder 110 bp stellvertretend für das Vorhandensein von Virus-DNS. Aus dieser Tatsache ergab es sich, dass der hier als latente FeLV-Infektion definierte Zustand bedeutete, dass die zwei FeLV-spezifischen Epitope in den untersuchten Organen mit der Immunhistologie nicht nachweisbar waren, dafür aber ein 185 bp oder 110 bp langer Abschnitt einer FeLV-spezifischen DNS-Sequenz im Knochenmark einer Katze. Aufgrund der Spezifität der verwendeten Primer für das exogene Feline Leukämievirus wird daraus auf das Vorliegen einer nichtproduktiven Infektion dieser Katze geschlossen. Über die Vermehrungsfähigkeit des Erregers konnte dabei im Gegensatz zu frühen Untersuchungen zur latenten FeLV-Infektion, in denen die Virusvermehrung aus Gewebe reaktiviert wurde, keine Aussage getroffen werden. Neben integrierter proviraler DNS treten im Verlauf der FeLV-Infektion auch episomale FeLV-spezifische DNS-Moleküle auf (Cattori et al., 2006; Goff, 2001). Mit der angewandten PCR-Methodik konnten diese unterschiedlichen DNS-Spezies nicht unterschieden werden.

Prinzipiell stellt die Polymerasekettenreaktion eine wertvolle Hilfe zur Detektion von Retroviren dar, insbesondere auch bei latenten Infektionen, bei denen die Methoden zum Proteinnachweis nicht anwendbar sind (Sninsky, 1990).

Analytische Sensitivität und Spezifität hängen von verschiedensten Faktoren ab. Dazu gehören die verschiedenen Mastermixkomponenten, ihre Konzentration und Zusammensetzung, Temperaturen, Temperaturverläufe und das Probenmaterial (Rolfs et al.,

1992; Saiki, 1989). Diese Faktoren lassen sich nur bis zu einem bestimmten Grad standardisieren. Von Bedeutung ist auch die Tatsache, dass die Suche nach exogenen Virussequenzen vor einem Hintergrund großer Mengen an zellulärer DNS stattfindet. Entscheidend für Sensitivität und Spezifität sind daher die verwendeten Primersequenzen. Um Sensitivität und Spezifität der PCR-Reaktion zu erhöhen, wurde die PCR als seminested PCR unter Verwendung eines dritten Primers in einem zweiten PCR-Zyklus durchgeführt. Die Analyse der Primersequenzen ergab eine hohe Spezifität für das exogene FeLV. Ebenso war das sequenzierte Amplifikat nach den Ergebnissen der BLAST(megablast)-Analyse hochspezifisch für exogenes FeLV. Manche U3-positive Tiere zeigten einzelne oder mehrere zusätzliche Banden knapp oberhalb des spezifischen Amplifikates. Diese Doppel- und Mehrfachbanden waren vermutlich auf Dupli- oder Multiplikationen von Primerbindungsstellen zurückzuführen. Innerhalb einer FeLV-LTR-Sequenz wurden beim Screening des Forward Primers der 1. Reaktion gleich vier Bindungsstellen innerhalb einer U3-Region gefunden (Accession number: AB 159693, Titel: Molecular analysis of LTR of Feline Leukemia Virus derived from feline myelodysplastic syndromes and analysis of disease potential of the virus, unpublished). Sequenzvervielfachung von LTR-Enhancer-Regionen im U3-Bereich von FeLV wurden bereits in mehreren Publikationen beschrieben und Doppel- oder Mehrfachbanden waren daher bei manchen FeLV-positiven Tieren sogar zu erwarten (Fulton et al., 1990; Matsumoto et al., 1992; Nishigaki et al., 2002; Nishigaki et al., 1997).

Eine hohe Sensitivität einer PCR-Reaktion beeinträchtigt die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses (Kwok und Sninsky, 1989). Beispielhaft kann man sich den Fall vor Augen führen, dass in einer Probe von 100 µl einer DNS-Probe nur ein Molekül der Zielsequenz enthalten ist. Führt man 20 PCR Reaktionen mit einer Menge von je fünf µl dieser Probe durch, so kann nur eine davon (5 %) positiv werden. Führt man nur eine PCR-Reaktion durch, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Probe falsch negativ deklariert wird 95 %. Aus diesen Überlegungen heraus wurde die gesamte PCR-Prozedur im negativen Fall einmal komplett wiederholt. So erklärte sich auch das Auftreten positiver Proben in der 2. PCR (Wiederholungs-PCR) nach negativer 1. PCR und die Tatsache, dass in der 2. PCR Probenaliquots in der 1. Reaktion positiv wurden, die in der 1. PCR erst bei der 2. Reaktion (seminested) positiv waren. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass im Falle von weiteren Versuchswiederholungen zusätzliche Proben positiv geworden wären. Im Falle der hier verwendeten diagnostischen PCR wurde eine hohe Sensitivität, die sich in einer

Größenordnung von 10^0 bis 10^3 nachweisbaren Zielsequenzen bewegte, gezeigt. Allerdings sollte darauf hingewiesen werden, dass bei dieser Sensitivitätsbestimmung als Probe eine Plasmid-DNS eingesetzt wurde. Es war dabei außerdem kein Hintergrund an genomischer DNS vorhanden. Das bedeutete, dass die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf die Versuchssituation in der diagnostischen PCR übertragbar waren (Rolfs et al., 1992). Dennoch kann von einer sehr hohen Sensitivität ausgegangen werden. Die experimentell infizierten Sektionskatzen wurden mit der hier verwendeten PCR-Methode alle U3-positiv getestet, was mit den Ergebnissen der Schweizer Dissertation, aus der diese Tiere stammten, übereinstimmte (Ruckstuhl, 2000). Damit konnte gezeigt werden, dass mit dieser PCR-Methode sowohl produktive als auch latente FeLV-Infektionen nachgewiesen werden konnten. Dass bei latenten Infektionen insgesamt nur wenige Provirussequenzen in der untersuchten DNS vorhanden waren, darauf deutete die Tatsache hin, dass 93 immunhistologisch negative Tiere nur in der seminested Reaktion U3-positiv waren. Die FeLV-Antigen-negativen, aber Provirus-positiven (latent infizierten) Tiere in einer Schweizer Untersuchung hatten einen durchschnittlich 300fach niedrigeren Provirusgehalt als Antigen-positive Tiere (Hofmann-Lehmann et al., 2001). In zwei experimentell infizierten Katzen, die sich in einem latenten Infektionsstadium befanden, konnte die Anzahl von Proviruskopien mit nur 2-166 Kopien/ 10^4 Zellen bestimmt werden (Gomes-Keller et al., 2006).

Negative Ergebnisse trotz latenter Infektion (falsch negativ) könnten auch darin begründet liegen, dass exogene U3-Sequenzen nicht im Knochenmark, sondern nur in anderen, in dieser Untersuchung nicht untersuchten Geweben vorhanden waren. In diesem Kontext sei auch auf die Möglichkeit lokaler latenter Infektionen hingewiesen (Hayes et al., 1992; Hayes et al., 1989). Es wäre durchaus denkbar, dass Proviren auch in anderen Organen, die während der Virämiephasen befallen wurden oder im oronasopharyngealen lymphatischen oder epithelialen Gewebe der initialen Virusvermehrung nach Eindämmung der Virusreplikation verblieben (Pacitti et al., 1986). Eine lokale latente FeLV-Infektion wäre dann die Folge und müsste von einer systemischen latenten Infektion abgegrenzt werden.

Neben der Möglichkeit von falsch negativen Ergebnissen bestand wie bei allen diagnostischen Tests auch die Möglichkeit von falsch positiven Ergebnissen.

So könnten latente Infektionen z.B. dadurch vorgetäuscht worden sein, dass eine Produktion von Viruspartikeln in anderen als den immunhistologisch untersuchten Organen stattfand. In Wahrheit läge in einem solchen Fall eine atypische lokale, produktive FeLV-Infektion vor,

wie sie mehrfach in der Literatur beschrieben wurden (Hayes et al., 1992; Hayes et al., 1989). Insgesamt sind solche Infektionen allerdings selten (Hayes et al., 1992). Auch denkbar ist, dass Virusproteinproduktion in den immunhistologisch untersuchten Organen stattfand, aber unterhalb des Detektionslimits lag.

Mit der erhöhten Sensitivität und Spezifität, die man durch die seminested PCR Technik gewann, stieg natürlich auch die Gefahr von Kontaminationsartefakten, also die Gefahr falsch positiver Ergebnisse infolge einer Kontamination mit Zielsequenzen. Sauberkeit, vorsichtiges Pipettieren und räumliche Trennung der verschiedenen Arbeitsschritte bei der Probenaufbereitung und der PCR dienten der Vermeidung dieser Gefahr. Nullkontrollen, die durch die 1. und 2. Reaktion hindurch verwendet und dabei wie eine Probe behandelt wurden, dienten einer Verlaufskontrolle im Sinne einer prä- bzw. in-Prozess-Kontrolle und PCR-Reaktionen wurden natürlich nur ausgewertet, wenn Null- und Negativkontrollen negativ blieben. Es ist darüber hinaus zu erwähnen, dass die Reaktionsgefäße der Nullkontrollen während der Pipettiervorgänge aller Proben offen standen und bis nach Abschluss aller Pipettiervorgänge nicht verschlossen wurden, um auch Kontamination über Aerosolbildung anzuzeigen. Trotz dieses hohen Aufwandes sind sporadische Kontaminationen und damit falsch positive Ergebnisse in einigen Fällen nicht 100 %ig auszuschließen (Rolfs et al., 1992). Falsch negative Ergebnisse aufgrund von PCR-Inhibitoren in der eingesetzten DNS-Probe oder vollständig degradierter DNS waren nicht zu erwarten, denn alle Proben von immunhistologisch negativen Tieren waren in der als dafür vorgesehenen Kontroll-PCR (gp70-PCR) positiv. Weiterhin zeigte die Gelkontrolle einiger DNS-Proben, dass bei allen Erhaltungszuständen noch hochmolekulare DNS zu extrahieren war.

Das Ergebnis aus der gp70-PCR ließ nur in 16 Fällen auf eine exogene FeLV-Infektion schließen, denn nur bei diesen war eine zusätzliche, zweite Bande bei 305 bp zu erkennen. Nur diese ist beweisend für eine FeLV-Infektion mit dem Subtyp A und/oder C, da die 341 bp lange Sequenz auch als endogene FeLV-verwandte Sequenz vorliegt. Sie konnte mit der verwendeten Methodik nicht von bekannten exogenen FeLV B-Sequenzen unterschieden werden (Schwartz et al., 2001). Dass nicht alle immunhistologisch FeLV-positiven Katzen zwei Banden in der gp70-PCR aufwiesen, war vermutlich auf die geringe Menge an exogenen Sequenzabschnitten im Vergleich zu den konkurrierenden und in jeder Zelle multipel vorhandenen endogenen Sequenzen zurückzuführen. Bei natürlichen Infektionen sind bisher keine reinen FeLV-B-Infektionen nachgewiesen worden (Jarrett et al., 1978; Stewart et al., 1986). Daher war ein Fehlen der FeLV A-spezifischen Bande bei diesen natürlichen exogenen

Infektionen nicht zu vermuten. Insgesamt machte das die gp70-PCR für eine Infektionsdiagnostik zum Nachweis exogener FeLV-DNS unbrauchbar.

Hinsichtlich der erzielten Ergebnisse ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass sowohl für den Antigennachweis als auch für den molekularbiologischen Genomnachweis keine als Goldstandard anerkannte Methode zur Verfügung steht, die als Vergleich herangezogen werden kann. Für die indirekte Immunperoxidase-Technik zum FeLV-Nachweis ist gezeigt worden, dass weder Tiefgefrieren noch Autolyse und Fäulnis das Ergebnis stark beeinflussten (Kovacevic et al., 1997; Wittmer, 1993). Allein mit der Untersuchung von Milz und Knochenmark waren 99,9 % aller FeLV-positiven Fälle zu diagnostizieren (Wittmer, 1993).

Das erhobene Datenmaterial war im Hinblick auf diverse Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rasse und Herkunft nicht vollständig. Bei Alter, Geschlecht und Rasse war davon auszugehen, dass es vermutlich zufallsbedingt war und keine systematischen Fehler ergab. Anders verhielt es sich unter Umständen bei der Herkunft der Tiere, denn es ist davon auszugehen, dass bei Katzen aus Tierschutzeinrichtungen und Zuchten von Seiten der Auftraggeber Angaben im Vorbericht gemacht wurden. Vermutlich waren Katzen, von denen die Herkunft nicht angegeben worden war, viel seltener aus Tierschutzeinrichtungen als aus Privathaltungen, die keine Zuchten waren. Verzerrungen waren in diesem Fall nicht zu vermeiden. Wenn diese Annahme korrekt ist, so kann davon ausgegangen werden, dass der statistische Zusammenhang für eine höhere latente FeLV-Infektionsrate und der Herkunft aus Tierschutzeinrichtungen noch stärker geworden wäre, hätten von mehr Tieren Informationen über ihren Ursprung vorgelegen. Darauf weist die deutlich geringere Prävalenz der latenten FeLV-Infektion in der Gruppe ohne Herkunftsangaben hin, die sogar eine statistische Signifikanz ergab.

Bei den Erkrankungen, die im Zusammenhang mit der latenten FeLV-Infektion beobachtet wurden, wurden mittels statistischer Verfahren signifikante negative oder positive Assoziationen aufgedeckt. Bevor im Weiteren näher auf diese Ergebnisse eingegangen wird, bleibt vorab darauf hinzuweisen, dass ein statistischer Zusammenhang niemals einen kausalen Zusammenhang beweisen kann. Vielmehr sollten die gefundenen statistisch signifikanten Zusammenhänge dazu genutzt werden, in zukünftigen Studien gezielt nach möglichen kausalen Beziehungen zwischen latenter FeLV-Infektion und Erkrankungen zu fahnden. In diesem Sinne ist die vorliegende Arbeit als explorative Studie zu sehen, auf deren Basis

statistisch beleg- und damit begründbare Hypothesen formuliert werden können, die in konfirmatorischen Folgeexperimenten erörtert werden müssen. Aufgrund des explorativen Charakters der Untersuchung wurde daher bei den statistischen Analysen bewusst auf eine Adjustierung für multiples Testen und Einhaltung eines globalen Signifikanzniveaus verzichtet (Bender et al., 2002). Weiterhin sei auch umgekehrt darauf hingewiesen, dass auch ohne Vorliegen eines statistischen Zusammenhangs ein ursächlicher Zusammenhang gegeben sein kann. Auf das Zustandekommen einer statistisch signifikanten Assoziation oder das Fehlen einer Assoziation können verschiedene zusätzliche Faktoren wie z. B. das Alter und das Geschlecht der Tiere Einfluss genommen haben, die ihrerseits eine Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion aufwiesen. Um solche gegenseitigen Abhängigkeiten auszuschließen, war die untersuchte Stichprobe zu inhomogen.

Hinsichtlich der angewendeten Signifikanztests muss darauf hingewiesen werden, dass mit ihrer Hilfe ein Ergebnis nicht abgesichert werden kann, was einer hundertprozentigen Sicherheit gleichkäme (Lange und Bender, 2001). Das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % und bedeutet, dass von 100 signifikanten Testergebnissen fünf zufällig auftreten (Bender und Lange, 2001).

Es wurde bestimmt, ob die Rate der latenten FeLV-Infektion von Katzen mit bestimmten Erkrankungen im Vergleich zu zwei Vergleichsgruppen signifikant abwich. Eine Vergleichsgruppe war die gesamte untersuchte Stichprobenpopulation exklusive der immunhistologisch FeLV-positiven Tiere. Als zweite Vergleichsgruppe wurden die Katzen herangezogen, die infolge eines Traumas verstorben waren und keine zusätzlichen Diagnosen außer traumabedingten aufwiesen. Diese „reinen Traumakatten“ wurden stellvertretend für eine „normale“ Nichtpatienten-Katzenpopulation angesehen, da davon auszugehen war, dass ein Trauma sicher nicht ursächlich mit einer latenten FeLV-Infektion verknüpft war. Es ist allerdings darauf zu verweisen, dass dieses Vorgehen nur eine Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse sein kann, wie schon Wittmer (1993) bemerkte (Wittmer, 1993). Z. B. waren die „reinen Traumakatten“ Katzen mit Freigang und repräsentieren dadurch z. B. keine reinen Wohnungskatzen. Bei Vergleich mit den „reinen Traumakatten“ konnte ein statistisch signifikantes Testergebnis aufgrund der statistischen Konfiguration bei positiver Assoziation für $n=4$ und 100 % „latent FeLV-infiziert“, erreicht werden. Für eine negative Assoziation, die allerdings nicht gezeigt werden konnte, wäre eine Konfiguration von $n=14$ und 100 % „FeLV-negativ“ notwendig gewesen. Der Zusammenhang des Ergebnisses eines Signifikanztests mit Auftretenshäufigkeit einer Diagnose und Prävalenz der latenten FeLV-

Infektion in den Vergleichsgruppen sowie der Stichprobengröße wurde durch ein Ergebnis in der Studie von Reinacher und Theilen (1987) ebenfalls verdeutlicht. Hier konnte ein statistisch signifikantes Testergebnis ($p < 0,05$) bereits bei einer statistischen Konfiguration von $n = 1$, 100 % FeLV-positiv und einer Prävalenz der produktiven FeLV-Infektion von 3,2 % in der Vergleichsgruppe aus Traumakatten erzielt werden (Reinacher und Theilen, 1987). Insgesamt umfasste die hier untersuchte Stichprobe mit insgesamt 302 Sektionskatten nur wenige Tiere. Dadurch traten viele Organdiagnosen nur als Einzelfälle oder in geringer Fallzahl auf. Auch die Vergleichsgruppe „reines Trauma“ bestand nur aus 19 Tieren. Da es sich aber nicht um eine retrospektive Studie handelt war dieses Problem ohne deutliche zeitliche Ausdehnung des Projektes nicht zu umgehen.

5.2 Auswertung

Im Gegensatz zu einer Untersuchung, die die produktive FeLV-Infektion bei Sektionskatten aus dem Institut für Veterinär-Pathologie im Zeitraum von 1979-1991 zum Inhalt hatte (Wittmer, 1993), war diese Verlaufsform der FeLV-Infektion im nun aktuell untersuchten Zeitraum nur noch die dritthäufigste letale Infektionskrankheit. Die Prävalenz von 9 % lag deutlich unter den damals festgestellten 16,9 % und führte zum Abrutschen auf Rang drei. Damit lag sie auch unter der in einer klinischen Studie aus Deutschland 1994 festgestellten Prävalenz von 13,4 % (Fuchs et al., 1994). In einer Untersuchung aus dem Jahr 1987, die am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurde, lag die mittels Immunhistologie ermittelte FeLV-Prävalenz bei 16,2 % (Reinacher und Theilen, 1987). Die häufigste letale Infektionskrankheit in der jetzt untersuchten Stichprobe von 302 Sektionskatten war die Feline Infektiöse Peritonitis mit 12 %, gefolgt von der Felinen Infektiösen Panleukopenie mit 9 %, die im Vergleich zur Untersuchung von Wittmer beide auch leicht um ca. 2 % in ihrer Auftretenshäufigkeit abgenommen hatten.

Für dieses Ergebnis kommen mehrere Ursachen in Betracht. Denkbar ist die tatsächliche Abnahme der Prävalenz in der Population, zum Beispiel durch die mittlerweile weit verbreitete Impfpraxis. Impfungen bieten einen guten Schutz vor der produktiven, wenn auch nicht vor der latenten Infektion (Hofmann-Lehmann et al., 2006). Weiterhin sind veränderte Lebensverhältnisse mit weniger Kontakt zu Artgenossen diskutierbar. Eine unterschiedliche Stichprobenzusammensetzung könnte ebenfalls eine Abnahme der Prävalenz vortäuschen. Es ist zum Beispiel denkbar, dass aufgrund der weiten Verbreitung der „in practice“-ELISA-

Tests FeLV-positive Tiere im Gegensatz zu früheren Untersuchungen bereits auf klinischer Ebene erkannt und nicht mehr zur Ermittlung der Erkrankungs- und Todesursache in das Institut für Veterinär-Pathologie eingesandt wurden.

Die Hälfte der untersuchten 302 Tiere wiesen in der vorliegenden Untersuchung eine latente FeLV-Infektion auf. Dieser Wert lag damit deutlich über dem in einer Schweizer Studie ermittelten Wert von 10 % in einer freilebenden, überwiegend gesunden Katzenpopulation und anderen Studien, die allerdings deutlich weniger und klinisch erkrankte Tiere mit einer PCR-Methode auf provirale Sequenzen untersuchten (Herring et al., 2001a; Hofmann-Lehmann et al., 2001; Jackson et al., 1996). Um 10 % lag auch die Prävalenz latent infizierter Katzen in zwei aktuellen Untersuchungen mittels PCR (Arjona et al., 2006; Pinches et al., 2006). In einer Studie mit neun FeLV-negativen Katzen, die z. T. klassische FeLV-assoziierte Erkrankungen aufwiesen, waren alle Tiere auf Basis des Provirus-Nachweises mittels PCR latent infiziert. In dieser Untersuchung diente die in der vorliegenden Arbeit als 2. Reaktion durchgeführte PCR mit Reamplifikation des 1. PCR-Ansatzes als Nachweismethode (Schwartz et al., 2001). Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind vor allem in den verwendeten Materialien, wie z. B. DNS-Isolierung aus Blut oder Knochenmark, und Methoden, z. B. klassische oder seminested PCR zu suchen. So wurde in den oben genannten Studien jeweils ein anderes PCR-System verwendet. Nur eine andere Untersuchung wurde an Sektionskatzen durchgeführt (Schwartz et al., 2001). Die jetzt untersuchte Sektionskatzenpopulation stellt sicherlich keinen repräsentativen Querschnitt durch die deutsche oder europäische Katzenpopulation dar. Rückschlüsse hierauf sind sicherlich nur bedingt zulässig. Nur 19 Tiere der untersuchten Stichprobe waren an einem Trauma gestorben, ohne eine andere Erkrankung aufzuweisen. Wie Bandecchi et al. (2006) in einer Übersichtstabelle darstellten, schwankten selbst serologische Ergebnisse zum FeLV-Antigennachweis innerhalb Europas zwischen 2,7 % und 30,4 % positiver Tiere, wobei meist auch deutliche Unterschiede in der Prävalenz zwischen gesunden und kranken Katzen zu finden waren (Bandecchi et al., 2006). In der Arbeit von Wittmer (1993) ergab sich mit 16,9 % eine FeLV-Prävalenz, die vergleichbar mit Prävalenzen bei Populationen aus kranken Tieren war. Dennoch wies diese Autorin darauf hin, dass Sektionskatzen nicht gleichzusetzen waren mit kranken Katzen. Dies galt auch für die jetzt untersuchte Sektionskatzenpopulation, in der z. B. Tiere aus Tierschutzeinrichtungen deutlich überrepräsentiert erschienen und, wie oben bereits erwähnt, auch Tiere ohne Erkrankungen außer einem Trauma untersucht wurden.

Diese Tiere würden in einer klinischen Studie über kranke Katzen nicht aufgenommen werden. Vergleichende demographische Studien zur Zusammensetzung von unterschiedlichen Katzenpopulationen fehlen.

Aus 1994 stammte eine Studie aus Deutschland, bei der in 13,4 % aller Katzen FeLV-Antigen nachgewiesen werden konnte. Bei überwiegend im Freien gehaltenen Tieren lag das Ergebnis bei über 20 % (Fuchs et al., 1994). Freigängerkatzen wiesen auch in der vorliegenden Untersuchung eine etwas höhere Prävalenz der produktiven FeLV-Infektion auf. Die Prävalenz der latenten Infektion lag bei Katzen mit Freigang dagegen geringgradig unter dem Durchschnitt.

Das Ergebnis einer älteren Studie aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen ergab eine Antikörperprävalenz für Anti-FOCMA- und virusneutralisierende Antikörper von insgesamt etwa 40 % bei Antigen-negativen Katzen aus dem Raum Augsburg und Gießen (Schniewind et al., 1983). In dieser Studie war bei 11 % der untersuchten Katzen FeLV-Antigen nachweisbar. Frühere Untersuchungen, die Anti-FOCMA-Antikörper nachgewiesen haben, ergaben zwischen 30 % und 74 % Seropositivität (Cotter et al., 1975; Essex et al., 1975a; Grant et al., 1980; Rogerson et al., 1975). 1990 konnten in den USA in einer Population bei 33 % aller gesunden FeLV seronegativen Katzen und bei 57 % aller kranken älteren Katzen Anti-FOCMA-Antikörper festgestellt werden, was als Hinweis gewertet wurde, dass die Tiere FeLV-Kontakt gehabt hatten (Swenson et al., 1990). In dieser Untersuchung hatten jüngere Katzen seltener Anti-FOCMA-Antikörper, also Hinweis auf FeLV-Kontakt, als ältere Katzen. Von manchen Autoren wurde der Anti-FOCMA-Antikörpernachweis bei serologisch FeLV-negativen Katzen auf persistierende „low level“- oder latente FeLV-Infektionen des Knochenmarks zurückgeführt (Rice und Olsen, 1981; Rojko et al., 1982). Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Pinches et al. (2006), die bei 13 von 16 latent infizierten Tieren Anti-FOCMA-Antikörper ermittelten. Darüber hinaus stellten sie bei drei von sechs latent infizierten Tieren virusneutralisierende Antikörper fest.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Seroprävalenz von Anti-FOCMA-Antikörpern liegen von der Größenordnung her im Bereich der in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Prävalenz für die latente FeLV-Infektion und könnten daher gemeinsam als Argument für die Hypothese dienen, dass FeLV-Infektionen vom Tier oft nicht vollständig eliminiert werden können und dass latente Proviren oder Provirusreste aus rezenten Infektionen resultieren und so in der Katzenpopulation akkumulieren. Für diese Theorie spricht auch die Tatsache, dass die Häufigkeit der latenten Infektion mit dem Alter signifikant

zunahm. Die Häufigkeit einer produktiven, mit einer Virämie einhergehenden Infektion nahm mit dem Alter ab. Es scheint also mit zunehmenden Lebensalter immer noch zu Infektionen mit dem Virus zu kommen, wobei aber persistent virämische (produktive) Verläufe seltener werden, was z. B. auf eine effektivere Immunabwehr zurückgeführt werden könnte. Mit anderen Worten ausgedrückt bedeutete das nach den vorliegenden Ergebnissen also, dass die Empfänglichkeit gegenüber der FeLV-Infektion erhalten bleibt, die Empfindlichkeit gegenüber der produktiven Infektion aber abnimmt. Dies entspricht der Erkenntnis aus einer Analyse zum FeLV-Impfschutz aus dem Jahr 2006. Impfungen führten in der Regel nicht zu einer vollständigen erregerspezifischen sterilen Immunität - latente Infektionen waren bei geimpften Tieren nachweisbar - sondern verhinderten lediglich mit der floriden FeLV-Infektion assoziierte Erkrankungen (Hofmann-Lehmann et al., 2006). Die hohe Prävalenz latenter FeLV-Infektionen scheint also nur auf den ersten Blick mit der Tatsache zu kollidieren, dass sich der breite Einsatz von Impfstoffen in den letzten Jahren durchgesetzt und deren Zuverlässigkeit zugenommen hat (Sparkes, 2003). Ein hoher Prozentsatz latenter Infektionen bei gleichzeitiger Abnahme der produktiven Infektionen könnte also durchaus das Ergebnis der derzeitigen anti-FeLV-Impfpraxis darstellen. Leider waren die anamnestischen Angaben zu Impfungen so spärlich, dass sie nicht sinnvoll in diese Untersuchung aufgenommen werden konnten.

Ein wichtiger Unterschied zu vielen anderen Studien, die die latente Infektion und deren Auswirkungen als Inhalt hatten, war auch die Auswahl des Ausgangsmaterials für eine PCR. Nur in zwei anderen Untersuchungen wurde auch postmortal Knochenmark entnommen (Kipar et al., 2001; Schwartz et al., 2001). In den meisten Fällen wurde als Material für die DNS-Extraktion Blut angegeben (Arjona et al., 2006; Herring et al., 2001a; Hofmann-Lehmann et al., 2001; Jackson et al., 1996; Miyazawa und Jarrett, 1997; Pinches et al., 2006). In einem Fall diente aspiriertes Knochenmark als Ausgangsmaterial und in mehreren Fällen wurde nur verändertes Gewebe untersucht (Cullen et al., 2002; Cullen et al., 1998; Ellis et al., 1996; Gabor et al., 2001; Herring et al., 2001a; Herring et al., 2001b; Jackson et al., 1993; Stiles et al., 1999; Tobey et al., 1994; Uthmann et al., 1996). Da das Knochenmark als Zielorgan im Verlauf der FeLV-Infektion eine zentrale Rolle spielt und da es lebenslang Stammzellen, potentielle Zielzellen einer systemischen latenten Infektion enthält, ist es ideal für diese Untersuchung geeignet. Virusisolation bei latenten Infektionen nach in vitro-Reaktivierung erfolgte aus myelomonocytären Knochenmarkzellen und Lymphozyten aus

Lymphknoten (Madewell und Jarrett, 1983; Pacitti und Jarrett, 1985; Pedersen, 1984; Rojko et al., 1982; Swenson et al., 1987). Ein Vorteil der direkten Entnahme von Knochenmark aus der eröffneten Markhöhle zur Knochenmarkaspiration am lebenden Tier könnte sein, dass in diesem Fall unter Umständen auch viel Blut aspiriert wird und nur wenig hämatopoetisches Gewebe in die DNS-Extraktion Eingang findet. Weiterhin gelangen bei der Aspiration in der Regel nur wenig Anteile des bindegewebigen Grundgerüsts in das Aspirat (Tyler et al., 1999). Die Knochenmarkfibroblasten waren ebenfalls als mögliche Zielzellen latenter Infektionen identifiziert und als mögliches Reservoir bei latenten Infektionen erkannt worden (Linenberger und Abkowitz, 1992).

Eine Untersuchung hat gezeigt, dass endogene FeLV-verwandte Sequenzen anders als ursprünglich angenommen nicht nur durch Integrationsprozesse vor der phylogenetischen Abspaltung der Hauskatze aus gemeinsamen Vorfahren entstanden sind, sondern auch das Ergebnis rezenter Integrationen sein können (Roca et al., 2004)

Tiere, die aus Tierschutzeinrichtungen stammten, waren in dieser Untersuchung wesentlich jünger und signifikant häufiger latent FeLV-infiziert als andere Tiere. Latent infizierte Tiere waren dabei im Durchschnitt 19 Monate älter als nichtinfizierte. Das könnte bedeuten, dass sich in Tierschutzeinrichtungen Katzen früher als unter anderen Haltungsbedingungen latent infizierten. Die höhere Prävalenz der latenten FeLV-Infektion bei Katzen aus Tierschutzeinrichtungen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine örtliche Kumulation von Virusausscheidern im Sinne eines Crowding-Effektes und damit auf ein erhöhtes Expositionsrisiko zurückzuführen. Interessant ist hierbei, dass der Anteil produktiver Infektionen mit 6 % unter der für die 302 Sektionskatzen ermittelten produktiven FeLV-Prävalenz von 9 % lag. Katzen aus Mehrkatzenhaushalten wiesen die mit Abstand höchste Prävalenz an produktiven Infektionen auf. Der Anteil latenter Infektionen war mit 59 % in der Gruppe dieser Katzen am zweithöchsten. Warum der Anteil produktiver Infektionen im Vergleich zu den Tierheimtieren trotz ähnlich hohem Expositionsrisiko deutlich höher war, könnte man vielleicht dadurch erklären, dass Tierheimkatzen hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes besser kontrolliert sind als in Privathaushalten lebende Katzen und somit ELISA-positiv getestete Tiere im günstigsten Fall in Quarantäne gehalten werden und im Anschluß an Erkrankung und Tod aufgrund des Wissens um ihre FeLV-Infektion als Krankheitsursache seltener seziert werden. Auch ist eine frühe Euthanasie bei positivem FeLV-Befund möglich. In Mehrkatzenhaushalten, in denen eine produktive FeLV-Infektion

unerkannt bleibt, kann es zu wiederholter Exposition nichtinfizierter oder teilimmuner Tiere und dadurch zu einem hohen Anteil produktiver Infektionen kommen.

Zwischen den Katzenrassen war kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich einer latenten Infektion zu ermitteln. Eine Rassedisposition im Hinblick auf eine erhöhte Empfänglichkeit scheint also nicht zu bestehen, obwohl der Anteil latenter Infektionen unter den EKH-Katzen mit 58 % am höchsten lag, was damit im Zusammenhang stehen könnte, dass Tiere dieser Rasse am häufigsten aus Tierschutzeinrichtungen stammten.

Zwischen dem Geschlecht der Tiere und der Häufigkeit latenter Infektionen bestand in dieser Untersuchung ein statistisch signifikanter Zusammenhang. Männliche Tiere waren häufiger infiziert als weibliche. Unterteilte man weiter in unkastrierte und kastrierte Tiere ergab sich keine statistische Signifikanz mehr. Die Angaben zu produktiven FeLV-Infektionen und der Geschlechterverteilung sind uneinheitlich. Manche Untersuchungen ergaben eine Geschlechtsdisposition und manche erkannten keine (Reinacher und Theilen, 1987). Kausal kommt ein höheres Expositionsrisiko für Kater aufgrund ihres Sozialverhaltens in Betracht. Ein Blick auf die Altersverteilung innerhalb der Geschlechter zeigt auch, dass Kater in dieser Studie deutlich älter waren als die weiblichen Tiere. Die Altersgruppe 1 war bei den weiblichen Tieren mit 58 % über-, bei den männlichen Tieren mit 42 % unterrepräsentiert, wenn man mit der Altersverteilung in der gesamten Stichprobe vergleicht. Der gefundene statistische Zusammenhang könnte daher durch die unterschiedliche Alterszusammensetzung der Geschlechtergruppen erklärt werden. Innerhalb der beiden Gruppen waren die latent infizierten Tiere deutlich älter als die nicht infizierten Tiere.

Interessant ist auch das Ergebnis, das bei der Auswertung der Erhaltungszustände der Tierkörper erlangt wurde. Eine Beeinflussung des U3-Nachweises war anhand der gelektrophoretischen Auswertung der DNS-Qualität nicht zu erwarten. Es zeigte nur eine Probe aus der Gruppe der fortgeschritten autolytischen und faulen Tierkörper eine schlechtere DNS-Qualität. Dennoch war bei dieser Probe ersichtlich, dass der Hauptanteil der DNS-Moleküle mit ca. 10 kb noch deutlich größer war als für den Nachweis der kleinen U3-Fragmente erforderlich. Die anderen untersuchten Proben von fortgeschritten autolytisch und faulen Tieren wiesen keine nachweisbare Degradation im Vergleich zur Gruppe der frischen und nicht mehr frischen Tiere auf, die sich ihrerseits nicht unterschieden. Bei den gefrorenen

Tierkörpern zeigte die DNS auf dem Gel einen etwas deutlicheren Schmier, was auf eine geringgradige Degradation wahrscheinlich aufgrund des Einfrier- und Auftauvorganges zurückzuführen ist. Weiterhin ergab auch die gp70-PCR keine Anhaltspunkte darauf, dass eine stark fragmentierte DNS Einfluss auf das PCR-Ergebnis haben könnte. Die amplifizierte gp70-Sequenz war mit 340 bp länger als die amplifizierten U3-Abschnitte.

Analysierte man bei der statistischen Auswertung die vier Gruppen getrennt, so ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen U3-Befund und Zustand der Kadaver. Die Zusammenfassung zu nur zwei Gruppen („frisch/gefroren“ und „nicht mehr frisch/fortgeschritten autolytisch und faul“) lieferte ein statistisch signifikantes Testergebnis. Mathematisch gesehen besteht bei der Zusammenfassung zu nur zwei Gruppen der Vorteil einer kleineren Zahl von Freiheitsgraden bei der Berechnung mittels Chi-Quadrat-Test, was ein signifikantes Ergebnis eher ermöglicht. Beim Überprüfen der Alterszusammensetzung der Gruppen fiel auf, dass die Tiere der Kategorie frisch/gefroren deutlich älter waren als die Tiere der anderen Kategorie (siehe Ergebnisse). Der gefundene statistische Zusammenhang ließe sich demnach eventuell nicht auf eine unterschiedliche DNS-Struktur, sondern unter Umständen auf diese unterschiedliche Alterszusammensetzung der Gruppen zurückführen.

Zusammenfassend läßt sich schlussfolgern, dass bei den nachgewiesenen Sequenzen, sie waren mit 185 und 110 bp sehr kurz, durch die unterschiedlichen Degradationszustände zumindest keine starke Beeinflussung der PCR-Ergebnisse bei diesen Fragmentlängen zu bestehen scheint. Darauf weist auch die über ca. 10 % höhere U3-positiv Rate bei „fortgeschritten autolytischen und faulen“ Tieren im Vergleich zu den Tierkörpern hin, die nicht mehr frisch waren, was nicht über den DNS-Degradationszustand erklärbar ist.

Bei den Tieren mit florider FeLV-Infektion traten überwiegend klassische FeLV-assoziierte Befunde auf. Wie in der Studie von Wittmer et al. (1993) waren mehrheitlich männliche Tiere betroffen. Darunter waren Lymphosarkome gefolgt von Anämien die häufigsten Diagnosen. Eitrige Entzündungen waren bei zwei Tieren nachzuweisen. 15 % der produktiv FeLV-infizierten Tiere waren an einer Felinen Infektiösen Peritonitis erkrankt. Ein Zusammenhang von FeLV-Infektion und FIP-Erkrankung ist in einigen Studien gezeigt worden, andere hingegen ergaben keinen Zusammenhang (Hardy et al., 1976; Reinacher, 1989; Reinacher und Theilen, 1987; Soma und Ishii, 2004; Wittmer, 1993). Ein Meningiom konnte bei einem FeLV-positiven Tier festgestellt werden. Eine statistisch signifikante positive Assoziation zu mesenchymalen Tumoren wurde vielfach, aber nicht in allen Untersuchungen beschrieben.

Weitere Tumoren, die auftraten, waren ein Plattenepithelkarzinom, ein Mammakarzinom und ein Adenom der Bronchialdrüsen. In einer Untersuchung konnte ein signifikant positiver Zusammenhang von FeLV-Infektion und dem Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms gefunden werden (Reinacher und Theilen, 1987). Allerdings diente hierbei als Datenbasis nur ein einziger Tumor. Eine andere Untersuchung fand eine statistisch signifikante Negativassoziation der FeLV-Infektion zu epithelialen Tumoren und keine Assoziation zu Plattenepithelkarzinomen (Wittmer, 1993). In einer Untersuchung aus dem Jahr 1974 konnten in 21 % der untersuchten Mammakarzinome FeLV nachgewiesen werden (Weijer et al., 1974). Bei vier Katzen trat in der vorliegenden Untersuchung eine Atelektase der Lunge auf. In der Untersuchung von Wittmer (1993) war der Anteil von Lungenatelektasen bei FeLV-infizierten Tieren gegenüber Traumatkatzen signifikant erhöht. Kausal wurden hier Kompressionsatelektasen durch Tumoren und Flüssigkeitsergüsse genannt, die ebenfalls eine signifikante Häufung bei FeLV-infizierten Katzen aufwiesen (Wittmer, 1993). Degenerative Lebererkrankungen, zu denen die diffuse Leberverfettung, die bei fünf Katzen diagnostiziert wurde, zu rechnen ist, traten ebenfalls bei FeLV-infizierten Tieren signifikant häufiger auf (Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993). Lymphozytendepletion wurde im Zusammenhang mit der FeLV-Infektion ebenfalls beschrieben (Anderson et al., 1971).

Die in einigen Untersuchungen postulierte Verknüpfung von Glomerulonephritiden und FeLV-Infektion konnte in der Untersuchung von Wittmer (1993) beim Vergleich mit Traumatkatzen aber nicht von Reinacher und Theilen (1987) und Reinacher und Frese (1991) nachvollzogen werden (Reinacher und Frese, 1991; Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993). In der vorliegenden Untersuchung war ein immunhistologisch FeLV-positives Tier mit einer chronischen Glomerulonephritis behaftet. In der Untersuchung von Wittmer (1993) traten auch interstitielle Nephritiden, Urämie, Schrumpfnieren und folliculäre Hyperplasie signifikant gehäuft bei FeLV-positiven Katzen auf (Wittmer, 1993). In Verbindung mit der FeLV-Infektion wurde bislang nicht von einer Assoziation mit extramedullärer Hämatopoese in der Milz, Gefäßverkalkungen, Phthisis bulbi und Regeneratknoten im Pankreas berichtet, wie sie hier in Einzelfällen aufgetreten waren. Aus diesen Einzelfällen allerdings eine Assoziation abzuleiten, war nicht möglich.

Stellt man die Frage nach möglichen biologischen Zusammenhängen und pathogenetischen Grundlagen der latenten FeLV-Infektion, so muß man sich klar machen, dass man mit der verwendeten U3-PCR keine Aussage über Vollständigkeit und Funktionszustand des Provirus erhalten hat. Daher sollten erst ein paar grundsätzliche Überlegungen angestellt werden,

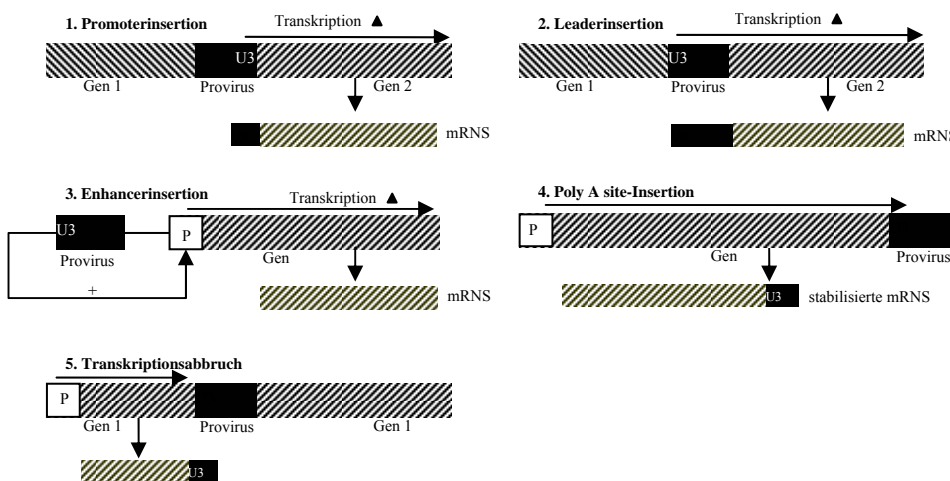
welche verschiedenen Zustände vorliegen könnten, wenn das Ergebnis der Immunhistologie negativ ausfiel und U3 in der PCR nachgewiesen wurde. Z. B. könnte das komplette Provirus oder nur die U3-Region ohne jegliche Transkription und Translation vorliegen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Provirus ohne nachweisbare Translation (gp70 und/oder p27) vorlag. Im letzteren Fall könnte entweder Transkription von mRNA vorliegen oder nicht. Darüber hinaus war der Fall denkbar, dass nur andere Virusproteine als gp70 und p27 exprimiert wurden. Zusammenfassend bedeutete dies, dass sowohl vom neu erworbenen genomischen Element Provirus, als auch von ihm abgeleiteter mRNA oder von unter der Detektionsgrenze exprimierten oder von nicht nachgewiesenen Virusproteinen krankmachende Effekte ausgehen könnten.

Eine Integration proviraler Sequenzen stellt eine Insertion im Sinne einer infektiösen Mutation dar. Für das FeL-Provirus sind bisher keine bevorzugten Integrationsdomänen gezeigt worden. Mögliche Folgen dabei sind aber Genaktivierung oder Geninaktivierung, z.T. auch unabhängig vom Integrationsort. Verschiedene Folgen retroviraler Insertion ins Genom sind in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt und erläutert. Insertionen in Protoonkogensequenzen sind beschrieben worden (Levy et al., 1997). Zumindest erscheint es auch denkbar, dass für eine tumorpromovierende Eigenschaft durch ein replikationsdefektes FeL-Provirus über transduzierte zelluläre Oncogene, wie z.B. dem *myc*-Gen, kein replikationskompetentes Helfervirus nötig ist, da diese nur für die Virusvermehrung nötig sind. Die Integration eines LTR-Abschnittes in ein Intron reichte aus, um das Splicen einer *mdr-3*-mRNA bei Mäusen mit Ivermectin-Überempfindlichkeit zu stören (Jun et al., 2000). In zwei Untersuchungen wird die Beeinflussung der Genexpression indirekt durch eine provirale LTR-spezifische RNA ohne gleichzeitige Virusexpression über die Aktivierung einer AP-1-Aktivität sowie der NFkappaB-Signalkaskade beschrieben (Abujamra et al., 2006; Ghosh und Faller, 1999). NFkappaB spielt eine bedeutende Rolle in grundlegenden immunologischen und allgemeinen „stress response“-Prozessen und hat darüber hinaus antiapoptotische und wachstumsfördernde Effekte (Li und Stark, 2002). Die direkte Beeinflussung der monocyte chemotactic protein 1- und der Kollagenase IV-Expression über AP-1 wurde ebenfalls gezeigt (Ghosh und Faller, 1999).

Die genannten Mechanismen erfordern keine Virusproteinsynthese. Sie scheinen also rein genomische Effekte zu sein. Andere Mechanismen sind zwar vorstellbar, aber es existieren bisher keine Hinweise darauf. Ein Teil der krankmachenden Eigenschaften des FeLV, vor allem die Immunsuppression, wurden z. B. dem Membranprotein p15E zugeschrieben (Lafrado

et al., 1987). Es wäre möglich, dass p15E ohne Koexpression von p27 oder bei Expression von gp70 und p27 unterhalb der Detektionsgrenze der Immunhistologie exprimiert wurde. Somit könnten latente Infektionen vorgetäuscht worden sein und das Protein trotzdem seine immunsuppressiven Eigenschaften entfalten. Eine Depression der spezifischen und unspezifischen zellulären Immunabwehr ist bei latenten FeLV-Infektion nachgewiesen worden (Lafrado et al., 1989; Lafrado und Olsen, 1986; Olsen et al., 1987; Rojko und Olsen, 1984).

Abbildung 5. 1: Unterschiedliche Insertionsstellen und mögliche Auswirkungen auf die Genexpression (nach Goff 2001).



P: endogener Promoter; U3: U3-Abschnitt am 5'- oder 3'-Ende des Provirus

1. **Promoterinsertion;** ein zelluläres Gen gerät unter Einfluss des proviralen Promoters am 3'-Ende des Provirus; Erhöhung der Transkriptionsrate.
2. **Leaderinsertion;** ein zelluläres Gen gerät unter Einfluss des proviralen Promoters am 5'-Ende; Erhöhung der Transkriptionsrate.
3. **Enhancerinsertion;** ein endogener Promoter gerät unter Einfluss eines proviralen Enhancers; Erhöhung der Transkriptionsrate.
4. **Poly A site-Insertion;** Integration im Poly A Bereich; durch Einbau proviraler Sequenzen wird mRNA stabilisiert; Erhöhung des zellulären mRNA Level.
5. **Transkriptionsabbruch;** Insertion innerhalb eines Gen führt zum Abbruch der Transkription und zu inaktivem Genprodukt

Eine negativ signifikante Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion im Vergleich zur Vergleichsgruppe „fortlaufend“ lag bei den Tieren vor, die infolge eines Traumas verstorben waren und sonst keine Erkrankungen aufwiesen. Dieses Ergebnis bedeutete, dass die latente FeLV-Infektion bei gesunden, verunfallten Tieren signifikant seltener vorkam als bei kranken.

Im Umkehrschluß hieß dies, dass Tiere, die nicht nur infolge eines Unfalls verstorben waren, signifikant häufiger latent FeLV infiziert waren. Eine erhöhte Krankheitsinzidenz bei FeLV-seronegativen Katzen mit Anti-FOCMA-Antikörpern wurde bereits in einer anderen Untersuchung gezeigt (Swenson et al., 1990). McClelland (1980) stellte eine erhöhte Mortalitätsrate bei einer Gruppe von FeLV seronegativen Katzen mit Kontakt zu serologisch FeLV-positiven Katzen fest (McClelland et al., 1980). Es war auch festzustellen, dass die „reinen Traumakatten“, von denen Angaben zur Herkunft und Alter vorhanden waren, seltener aus Tierschutzeinrichtungen stammten und im Durchschnitt jünger als die Stichprobenpopulation waren. Für eine zeitabhängige Akkumulation von Proviren und damit für eine lebenslange Infektionsempfänglichkeit sprach - wie in der gesamten Stichprobe - das innerhalb der „reinen Traumakatten“ deutlich höhere Durchschnittsalter der infizierten Tiere. Interessant war auch die Tatsache, dass die „Traumakatten“ insgesamt ein höheres Durchschnittsalter und eine höhere Infektionsrate aufwiesen als die „reinen Traumakatten“. Das Durchschnittsalter der „Traumakatten“ war dabei stark von drei über 10 Jahre alten Katzen bestimmt, von denen zwei latente Infektionen aufwiesen. Mit dem Alter stieg also sowohl die Zahl latenter FeLV-Infektionen als auch die Erkrankungsrate in dieser Gruppe an. Das gleiche Phänomen konnte auch zwischen den „reinen Traumakatten“ und der gesamten Stichprobe festgestellt werden. Dabei bleibt festzuhalten, dass Tiere über zehn Jahren in der gesamten Stichprobe nur zu 15 % vertreten waren. Das Durchschnittsalter dieser Stichprobe von 276 Tieren lag bei 52 Monaten, was bei Katzen noch ein junges Erwachsensein bedeutet. Das wiederum spricht gegen einen Anstieg der Erkrankungsrate durch echte Altersdiagnosen, wie sie z. B. Regeneratknotenbildung darstellt. Diese müssen unterschieden werden von einer sogenannten Altersdisposition bei der eine grundsätzliche Bereitschaft zu einer Erkrankung gegeben ist, aber erst ein weiterer Faktor zum Ausbruch führt. Trotz der Prävalenz der latenten FeLV-Infektion von knapp über 30 % waren bei den „reinen Traumakatten“ außer Traumafolgen keine Erkrankungen festzustellen. Geht man von einem kausalen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit und der latenten FeLV-Infektion aus, so könnte man das Fehlen von Erkrankungen bei den „reinen Traumakatten“ damit erklären, dass es bei diesen Tieren noch nicht zur Ausbildung von Erkrankungen gekommen war, bevor sie ein Trauma erlitten, da die verstrichene Lebenszeit dafür zu kurz war.

Eine aus der vorliegenden Untersuchung abgeleitete Hypothese lautet folglich, dass es sich bei der latenten Infektion um einen erworbenen disponierenden Faktor handelt, der die

Konstitution der Tiere negativ beeinflusste, und der altersabhängig war. Andererseits könnte man behaupten, dass die latente Infektion mit dem Alter zunahm, aber selbst keine Auswirkungen auf die Gesundheit hatte und dass die signifikanten Ergebnisse nicht kausal durch sie bedingt waren, sondern andere Faktoren dabei eine Rolle spielten. Für einen allgemein krankheitsfördernden Einfluss sprach, dass latent infizierte Katzen aus Tierschutzeinrichtungen durchschnittlich 29 Monate jünger waren als die latent Infizierten insgesamt und gleichzeitig seltener als andere Katzen nur infolge eines reinen Traumas zur Sektion kamen, also seltener gesund waren. Das konnte aber auch an einem aufgrund der Lebensumstände höheren Erkrankungsrisiko beruhen. Einen eindeutigen Hinweis, dass das Phänomen nicht nur über das Alter der Tiere erklärt werden kann, liefert die signifikante Assoziation mit der Parvovirusinfektion. Diese Erkrankung betrifft durchweg junge Tiere.

Epitheliale Tumoren wiesen in dieser Untersuchung eine signifikante Assoziation mit der latenten FeLV Infektion auf. Es ist darauf hinzuweisen, dass Tiere mit epithelialen Tumoren im Durchschnitt 93 Monate älter waren als der Durchschnitt der nicht produktiv infizierten Tiere. Frese et al. (1989) und Trimborn (1990) wiesen bereits darauf hin, dass epitheliale Tumoren überwiegend Erkrankungen des alten Tieres sind (Frese et al., 1989; Trimborn, 1990). Allerdings war innerhalb der Gruppe der Katzen mit epithelialen Tumoren kein Trend hin zu einem höheren Alter latent infizierter Katzen gegenüber den nicht latent Infizierten zu erkennen. Latent infizierte, tumortragende Katzen waren durchschnittlich sogar 11 Monate jünger als nicht Infizierte. Dieser Trend entsprach dem Ergebnis aus der Untersuchung von Wittmer (1993), dass Tiere mit Antigen-positiver FeLV-Infektion und Tumorerkrankungen jünger waren als Antigen-negative Tiere mit Tumoren. Diese Studie lieferte allerdings keine signifikante Assoziation der produktiven FeLV-Infektion zu epithelialen Tumoren (Wittmer, 1993). Als Erklärungsansatz könnte dienen, dass das latente FeL-Provirus als Insertionsmutagen ein Glied in der Kette eines Mehrstufen-Kanzerogenitätsmodell darstellte und somit in Abhängigkeit vom Integrationslokus das Auftreten von Tumoren beschleunigte (siehe auch Abbildung 5.1) (Hahn und Weinberg, 2002; Rohn et al., 1996). Ein Plattenepithelkarzinom wies in einer Untersuchung von Reinacher und Theilen (1987) eine positiv signifikante Assoziation mit der produktiven FeLV-Infektion im Vergleich zu Traumakatzen auf. Es handelte sich allerdings um einen Einzelfall, bei dem aufgrund der statistischen Konfiguration ($n=1$, 100 % FeLV-positiv) ein signifikantes Ergebnis erzielt wurde (Reinacher und Theilen, 1987). In einer anderen Untersuchung konnte bei einem Tier

mit Adenokarzinom einer apokrinen Drüse der Haut eine latente FeLV-Infektion festgestellt werden (Schwartz et al., 2001).

Eine signifikante Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion und dem immunhistologischen oder virologischen Nachweis von Parvovirus konnte gefunden werden. Bei Parvovirus-positivem Befund lag in allen Fällen auch eine Panleukopenie vor. Eine signifikante Assoziation zu der rein morphologisch gestellten Diagnose Panleukopenie ohne Virusnachweis war nicht vorhanden. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle Panleukopenie-ähnlichen Erkrankungen durch Parvovirus verursacht waren. Tiere, die an einer Parvovirusinfektion erkrankt waren, waren mit 19 Monaten deutlich jünger als der Durchschnitt der Stichprobe. Dabei waren latent infizierte Katzen im Durchschnitt 18 Monate älter als die nicht latent Infizierten, wobei dieser große Unterschied durch einen Ausreißerwert von 198 Monaten in der latent infizierten Gruppe stark beeinflusst war. Das niedrige Alter bei positiver Assoziation bei der Parvovirusinfektion spricht dagegen, dass die latente FeLV-Infektion ein reines Altersphänomen ist. Die Angabe des Unterschiedes im Medianwert gibt mehr Aufschluss über die tatsächliche Altersverteilung. Latent Infizierte waren dabei nur einen Monat älter als FeLV-negative. 15 Parvovirus-infizierte Katzen stammten aus Tierschutzeinrichtungen und drei aus Mehrkatzenhaushalten. Das könnte als weiterer Hinweis gewertet werden, dass sich Tierheimtiere sehr viel früher latent mit FeLV infizierten als der Stichprobendurchschnitt. Das feline Parvovirus, das für seine Vermehrung auf teilende Zellen angewiesen ist, diese befällt und zerstört, könnte gerade durch diese Eigenschaft eine produktive FeLV-Infektion indirekt verhindern, denn für seine Vermehrung benötigt das FeLV ebenfalls Zellen in Teilung. Reinacher und Theilen (1987) sowie Wittmer (1993) kamen zum Ergebnis, dass die produktive FeLV-Infektion negativ mit Panleukopenie assoziiert ist. Eine produktive FeLV-Infektion konnte signifikant seltener bei Parvovirus-positiven Tieren festgestellt werden. In einer anderen Studie konnte bei einem Einzeltier mit der Diagnose Panleukopenie eine latente FeLV-Infektion festgestellt werden (Schwartz et al., 2001). Eine Untersuchung aus der Schweiz aus dem Jahre 1995 postulierte ein „Panleukopenie-ähnliches“ Syndrom nach experimenteller FeLV-Infektion in Verbindung mit einer Parvovirusinfektion, wobei Erkrankungen nur bei produktiver FeLV-Infektion aufgetreten waren. Eine Immunsuppression durch FeLV wurde dabei vermutet (Lutz et al., 1995).

Die persistent virämische FeLV-Infektion wird häufig als immunsupprimierender Faktor angesehen, der Infektionen generell begünstigt (Cotter et al., 1975; Hardy, 1982; Ogilvie et al., 1988; Olsen et al., 1987; Perryman et al., 1972; Wernicke et al., 1986). Auch für eine Immunsuppression durch latente FeLV-Infektionen gibt es in der Literatur Hinweise (Dezutti et al., 1989; Jackson et al., 1996; Lafrado et al., 1989; Lafrado und Olsen, 1986; Swenson et al., 1987).

Bakterielle, mykotische und parasitäre Infektionen wurden zusammengefasst zu den nichtviralen Infektionen. Es konnte dabei das einzige statistisch signifikante Ergebnis mit positiver Assoziation zur latenten FeLV Infektion im Vergleich zur Vergleichsgruppe „fortlaufend“ gezeigt werden. Die Tiere mit nichtviralen Infektionen waren im Durchschnitt 15 Monate jünger als der Stichprobendurchschnitt. Der Trend, dass latente Infektionen mit dem Alter zunahm lag auch in dieser Gruppe vor. Mit durchschnittlich 52 Monaten waren die latent infizierten Katzen in dieser Gruppe deutlich älter als die nichtlatent infizierten Tiere dieser Gruppe, aber auch deutlich jünger als der Altersdurchschnitt aller latent FeLV-infizierter Tiere. 39 % der Tiere mit nichtviralen Infektionen, von denen die Herkunft festgestellt worden war, stammten aus Tierschutzeinrichtungen. Das sind im Verhältnis zur gesamten Stichprobe mit 36 % nur geringfügig mehr. Von diesen 13 Tieren waren aber nur neun (69 %) latent FeLV-infiziert. 33 % stammten aus Mehrkatzenhaushalten. Neben der geschilderten Immunsuppression bei wirklich latenten Infektionen wäre ein kausaler Zusammenhang auch über eine immunsuppressive Wirkung von p15E erklärbar, wenn eine selektive Proteinexpression oder eine Virusproteinexpression unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Immunhistologie erfolgt sein sollte. Denkbar ist auch eine Einflussnahme über die Aktivierung der NFkappaB- oder AP-1-Signalkaskade, die unabhängig vom Integrationslokus erfolgte. Sicherlich wäre auch eine direkte Wirkung über die Schädigung durch Integration proviraler Sequenzen in ein an den vielfältigen Vorgängen der Infektionsabwehr beteiligtes Gen denkbar, was abhängig vom Integrationsort unterschiedliche Auswirkungen haben könnte (siehe Abb. 5.1).

Wenn man die Gruppe nichtvirale Infektionen aufspaltete in die einzelnen Erregergruppen, so fand sich jeweils eine statistische Signifikanz im Vergleich zur reinen Traumagruppe für bakterielle Infektionen und Wurmbefall.

Eine bakterielle Untersuchung wurde nur auf einen pathologisch begründeten Verdacht hin durchgeführt. Die bakteriellen Infektionen stellten mit 37 Fällen die weitaus größte Gruppe unter den nichtviralen Infektionen dar. Darunter waren auch vierzehn Sepsis-Fälle, die für

sich alleine keine statistische Signifikanz aufwiesen, denn es war nur jedes zweite Tier latent FeLV-infiziert. Das Alter und die Altersverteilung unter Berücksichtigung der latenten FeLV-Infektion entsprachen, wie zu erwarten gewesen war, den Ergebnissen bei den nichtviralen Infektionen. Bei Wittmer (1993) sowie Reinacher und Theilen (1987) konnte ein signifikant höherer Anteil an produktiven FeLV-Infektionen im Vergleich zu einer Trauma population nur selektiv bei Infektionen mit beta-hämolysierenden Streptokokken, Pasteurellen, *Staphylococcus aureus* und bei Septikämien gezeigt werden (Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993).

Bei FeLV-Antigen-negativen Katzen mit Anti-FOCMA-Antikörpern wurden bei 18 % bakterielle Infektionen nachgewiesen (Swenson et al., 1990).

Die latent infizierten Katzen mit Wurmbefall waren im Mittel 38 Monate alt und es stammte nur eine aus einer Tierschutzeinrichtung, so dass eine starke Beeinflussung des U3-Ergebnisses über das Alter oder die Herkunft nicht gegeben sein konnte. Eine signifikante Assoziation konnte auch zur produktiven FeLV-Infektion gezeigt werden (Wittmer, 1993). Tiere mit Würmern waren zweimal auch Opfer eines Unfalls, je einmal litten sie zusätzlich an einer Parvovirusinfektion, einer eitrigen Otitis und einer bakteriellen Infektion, bei drei Tieren war die Todesursache unklar. Das einzige FeLV-negative Tier mit Wurmbefall war infolge eines Unfalles verstorben und 36 Monate alt. Wurmbefall mit latenter FeLV-Infektion trat also sowohl bei Katzen mit schweren Allgemeinerkrankungen als auch bei ansonsten gesunden Katzen auf.

Virusinfektionen, außer der Parvovirusinfektion und der FeLV-Infektion selbst, waren nicht signifikant mit einer latenten FeLV-Infektion assoziiert, obwohl latente FeLV-Infektionen häufig (83 %) in Verbindung mit Calicivirusinfektionen auftraten. Dies könnte durch die zu niedrige Fallzahl bedingt sein. Reinacher und Theilen (1987) konnten allerdings auch keine Verbindung zwischen der produktiven FeLV-Infektion und anderen Virusinfektionen nachweisen. Wittmer (1993) stellte sogar eine negative Assoziation von produktiver FeLV-Infektion mit Virusinfektionen heraus. In einer Studie wurde eine Induktion von antiviral wirksamem, atypischem α -Interferon durch die FeLV-Infektion gezeigt (Yamamoto et al., 1986). Andererseits führte inaktiviertes FeLV zu einer Verminderung der Interferon γ -Produktion (Engelman et al., 1985).

Bisher nicht mit der FeLV-Infektion in Verbindung gebracht worden sind Kardiomyopathien der Katze. In den hier untersuchten Fällen lagen primäre Kardiomyopathien vor. Zumindest für die hypertrophe Kardiomyopathie bei der Maine Coon Katze wurde ein Gendefekt beschrieben, der für diese Herzerkrankung verantwortlich gemacht wird. Dabei wurde ein einzelner Basenaustausch als Gendefekt identifiziert (Meurs et al., 2005). Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) wurde bei der Katze häufig mit einem Taurinmangel erklärt (Novotny et al., 1994). Bei Katzen und Hunden gibt es auch Hinweise auf eine genetische Komponente dieser Erkrankung (Broschk und Distl, 2005; Lawler et al., 1993). Es konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, dass integrierte Proviren als Insertionsmutagen in Herzmuskelzellen wirken könnten, allerdings sind Herzmuskelzellen bisher nicht als Zielzellen der FeLV-Infektion identifiziert worden. Eine vertikale Übertragung über infizierte Keimzellen könnte ein möglicher Weg sein, wie Provirus auch in Herzmuskelzellen gelangt. Integration von einem provirusähnlichen Konstrukt in Herzmuskelzellen war bei Mäusen gezeigt worden (Conti et al., 1995). Die Katzen mit Kardiomyopathien waren insgesamt geringfügig jünger als der Stichprobendurchschnitt. Latent infizierte Katzen mit einer Kardiomyopathie bestätigten wiederum den Trend, dass innerhalb einer Diagnosegruppe latent infizierte Tiere älter waren. Allerdings war das Datenmaterial mit drei nicht latent infizierten Katzen, von denen das Alter bekannt war, sehr beschränkt. Der Unterschied im Median von 22 Monaten war deutlicher, denn der arithmetische Mittelwert wurde bei den drei Katzen stark von einem 120 Monate alten Tier beeinflusst. Die Prävalenz FeLV-positiver Tiere mit Kardiomyopathien war in der Untersuchung von Wittmer (1993) zur produktiven FeLV-Infektion signifikant geringer als die Prävalenz FeLV-negativer Tiere mit Kardiomyopathien.

Die latente Infektion trat in der vorliegenden Untersuchung statistisch signifikant häufiger bei Katzen mit serösen Ergüsse und Chylothorax im Vergleich zu den „reinen Traumakatten“ auf. Gegenüber der Gruppe „fortlaufend“ war der Unterschied nicht signifikant. Kardiomyopathien konnten bei vier Tieren mit serösen Ergüssen als ursächlich angesehen werden. Vier davon waren latent FeLV-infiziert. Es konnten nur von vier Tieren das Alter ermittelt werden. Diese waren im Mittel 42 Monate alt, also im Vergleich zum Durchschnitt der Katzen mit latenter FeLV-Infektion deutlich jünger. Der Median betrug 15 Monate. Eines dieser Tiere wich mit 138 Monaten deutlich von den anderen ab.

Nicht mit Urämie vergesellschaftete Schleimhautulzerationen am Magen-Darm-Trakt waren statistisch signifikant mit einer latenten FeLV-Infektion assoziiert. Sie traten im Vergleich zur fortlaufenden Vergleichsgruppe seltener in Verbindung mit der latenten FeLV-Infektion auf. Das Relative Risiko lag deutlich unter 1. Dies scheint für einen „schützenden“ Effekt durch die latente FeLV-Infektion zu sprechen. Dass hier tatsächlich ein kausaler Zusammenhang besteht, ist aber eher fraglich und wäre pathogenetisch derzeit nicht erklärbar. Vermutlich ist der statistisch negativ signifikante Zusammenhang über das geringe Alter der Tiere und der damit verbundenen geringen Prävalenz zu erklären. Das durchschnittliche Alter von sechs der sieben Tiere betrug nämlich nur 16 Monate, das einzig latent infizierte Tier war drei Monate alt und stammte aus einem Mehrkatzenhaushalt. Über die Ursache der Ulzerationen konnte keine genauere Aussage getroffen werden. Ein häufiger Grund für Ulzerationen, insbesondere Magenulzera, ist Streß (Weiss, 1999). In den vorliegenden Fällen traten die Ulzera bei kranken Tieren auf und somit sind streßbedingte Ulzera möglich. Ein Tier stammte aus einem Tierheim. Dort sind Stresssituationen kaum zu vermeiden. Je zweimal traf man Ulzerationen in Zusammenhang mit einer FIP und mit einer Panleukopenie an.

Ein weiterer statistisch signifikanter Zusammenhang war bei Lymphknotenveränderungen und auch bei der Follikeldepletion in der Milz zu finden. In den Lymphknoten waren sowohl lymphatische Hyperplasie als auch lymphatische Depletion signifikant im Vergleich zur reinen Traumagruppe mit der latenten FeLV Infektion verknüpft. Follikeldepletion in der Milz zeigte eine Signifikanz ebenfalls nur bei einem Vergleich mit der reinen Traumapopulation. Die Diagnosen Follikeldepletion in Milz und Lymphknoten wiesen dabei gerade noch signifikante p-Werte in der Nähe von 0,05 auf, während das Ergebnis des Signifikanztests für die follikuläre Hyperplasie in Lymphknoten deutlich unter 0,05 lag. Interessant war festzustellen, dass bei den Diagnosen lymphatische Hyperplasie im Lymphknoten und Follikeldepletion in der Milz latent infizierte dem allgemeinen Trend folgten und durchschnittlich älter als die nichtinfizierten Tiere mit der gleichen Diagnose waren, dass aber bei der Diagnose Follikeldepletion im Lymphknoten der umgekehrte Verlauf festzustellen war. Tiere mit Follikeldepletion in der Milz waren dabei die im Vergleich zu den Lymphknotenveränderungen durchschnittlich ältesten Tiere. Weiterhin ist zu erwähnen, dass Follikelnarben im Lymphknoten bei drei Tieren auftraten, von denen zwei latent infiziert waren. Sie stellen vermutlich auch Endstadien einer Lymphozytendepletion dar, wurden allerdings nicht bei der Signifikanzberechnung berücksichtigt. Im Thymus kamen

lymphatische Depletion und vorzeitige Thymusinvolution, die in einem ähnlichen Kontext zu sehen sind, insgesamt sechsmal vor, davon fünfmal bei latent infizierten Katzen. Eine statistische Signifikanz ergab sich allerdings hieraus gerade noch nicht. Eine folliculäre Hyperplasie im Lymphknoten trat einmal gemeinsam mit einer Follikeldepletion und viermal gemeinsam mit einer folliculären Hyperplasie in der Milz auf. Follikeldepletion im Lymphknoten zeigten auch 13 Tiere, die Follikeldepletion in der Milz aufwiesen.

In Verbindung mit der Follikeldepletion der Milz konnten als Erkrankungsursache sechs Parvovirusinfektionen, drei weitere Virusinfektionen, sechs bakterielle Infektionen und zwei Wurminfektionen sowie dreimal ein Trauma festgestellt werden, zum Teil also Erkrankungen, die ihrerseits ebenfalls eine Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion aufwiesen. Das galt auch für die folliculäre Hyperplasie und die Lymphozytendepletion in Lymphknoten.

Mit der Depletion in Lymphknoten traten auch fünf Parvovirusinfektionen, vier bakterielle Infektionen, drei FIP-Fälle, zwei Wurminfektionen und ein Trauma auf.

Folliculäre Hyperplasien im Lymphknoten waren verknüpft mit vier bakteriellen Infektionen, einer FIP-Virus- und zwei Parvovirusinfektionen sowie zwei Traumen. Es stellte sich wie bei allen Diagnosen mit Assoziation zur latenten FeLV-Infektion die Frage, ob FeLV dabei auch kausal eine Rolle spielte. Lymphozytendepletion ist im Zusammenhang mit einer allgemeinen Immunsuppression zu diskutieren und wurde sowohl in der Milz und den Lymphknoten als auch im Thymus bei produktiven FeLV-Infektionen gefunden (Anderson et al., 1971; Hardy, 1981, 1982; Hoover et al., 1973). Ein schweres akutes Immunsuppressionssyndrom wurde durch ein heterogenes FeLV-Isolat, FeLV-FAIDS, verursacht (Mullins et al., 1989). Für folliculäre Hyperplasien wurde ein Zusammenhang mit der produktiven FeLV-Infektion mehrfach beschrieben, z. T. auch mit statistischen Methoden untermauert (Hardy, 1982; Reinacher und Theilen, 1987). Bei Wittmer (1993) waren 30,8 % der Sektionskatzen mit lymphatischen Hyperplasien immunhistologisch FeLV-positiv. Während Lymphadenopathien in einer Studie mit der initialen Virämie in Verbindung gebracht wurde, traten lymphatische Hyperplasien von Lymphknoten manchmal bei produktiv FeLV-infizierten Tieren mit Sekundärinfektionen auf (Hardy, 1982; Pedersen et al., 1977).

Bei Enteritiden (ohne Panleukopenie-assoziierte Enteritiden) war in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls eine signifikant positive Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion vorhanden. Mit durchschnittlich 50 Monaten waren die latent infizierten Katzen mit Enteritis deutlich älter als die FeLV-negativen, aber auch deutlich jünger als der Durchschnitt der

latent infizierten Katzen insgesamt. Mit 45 Monaten war das Durchschnittsalter der an Enteritis erkrankten Katzen etwas geringer als im Stichprobendurchschnitt. Die Mediane wichen deutlicher voneinander ab. Acht Tiere wiesen bakterielle Infektionen auf, ein Tier zusätzlich auch noch Wurmbefall. Bei einem Tier konnte Felines Coronavirus nachgewiesen werden, bei einem Tieren Caliciviren, bei einem anderen Calici- und Herpesviren. Bei der produktiven FeLV-Infektion konnte von Wittmer (1993) eine negative Assoziation mit Enteritiden (ohne Panleukopenie) festgestellt werden. Andere Studien stellten bei FeLV-infizierten Tieren gehäuft Enteritiden fest (Cotter et al., 1975; Hardy et al., 1976). Eine FeLV-assoziierte Enteritis, bei der Panleukopenie-ähnliche Veränderungen am Darm auftraten, und das Panleukopenie-ähnliche Syndrom sind Erkrankungen, die durch eine produktive FeLV-Infektion verursacht werden können (Lutz et al., 1995; Reinacher, 1987). Bei Katzen mit nicht FeLV-assoziiertes Enteritis konnten in einer Untersuchung keine latenten Infektionen festgestellt werden (Kipar et al., 2001). Bei zwei Untersuchungen an Katzenpopulationen lagen Enteritiden bzw. Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts bei Katzen vor, die Anti-FOCMA-Titer hatten bzw. eine FeLV-Virämie überwunden hatten (Pedersen, 1984; Swenson et al., 1990)

Anämie war eine der häufigsten Diagnosen bei den untersuchten Katzen. Bei den statistischen Berechnungen wurden z. T. verschiedene Anämiengruppen, z. B. die traumabedingten Anämien und in einem weiteren Schritt mit diversen anderen Infektionskrankheiten und Leukosen einhergehende Anämien ausgenommen. Eine sehr starke Bereinigung erfolgte durch die Beschränkung auf Anämie als Hauptdiagnose. Sowohl im letztgenannten Fall als auch bei den anderen Beschränkungen konnten statistisch signifikante Testergebnisse im Vergleich zur reinen Traumagruppe erzielt werden, wobei der niedrigste p-Wert mit 0,0093 bei der Beschränkung auf unklare Anämiefälle erzielt wurde. Wenn man alle Anämiefälle für die Berechnung zugrunde legte, ergab sich ein gerade noch nicht signifikantes Ergebnis mit 0,05852. Die signifikanten Werte ergaben sich allerdings alle nur im Vergleich mit der reinen Traumagruppe. Anämien in Verbindung mit einer produktiven FeLV-Infektion sind sehr häufig beschrieben worden (Mackey et al., 1975). Von unterschiedlichen Autoren wurde eine signifikante Assoziation von Anämie und FeLV-Infektion bei Sektionskatzen dargestellt (Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993). Vor allem der Subtyp FeLV C wurde mit dem Auftreten schwerer Anämien in Verbindung gebracht (Mackey et al., 1975; Riedel et al., 1988; Riedel et al., 1986). Mit Hilfe der hier verwendeten PCR war allerdings keine

Subtypenunterscheidung möglich. Die Prävalenz der produktiven FeLV-Infektion bei Anämien betrug 12,5 %. Sie war geringer als in vielen anderen Studien, in denen Werte zwischen 22 % und 85 % angegeben wurden (Cotter et al., 1975; Essex et al., 1975b; Hoover et al., 1974; Wittmer, 1993). Der mit 22 % niedrigste Wert wurde ebenfalls in Gießen bei einer Sektionskatzenpopulation ermittelt (Wittmer, 1993). In einer Untersuchung wurde mittels einer PCR eine latente FeLV-Infektion bei einer anämischen Katze festgestellt (Schwartz et al., 2001). Die jetzt ermittelte Prävalenz für latente FeLV-Infektionen und auch der immunhistologisch FeLV-positiven Anämiefälle ergab eine Gesamtprävalenz von 63 % FeLV-positiver Anämiefälle und ist im oberen Bereich der oben angegebenen Spanne für FeLV-positive Anämien angesiedelt. Die Katzen mit Anämien als Hauptdiagnose waren im Mittel 54 Monate alt, also nur geringfügig älter als der Stichprobendurchschnitt. Die latent Infizierten darunter waren mit durchschnittlich 67 Monaten fünf Monate älter als die latent Infizierten insgesamt. Das Geschlechterverhältnis in der Gruppe der Anämie als Hauptdiagnose war ausgeglichen. Von vier latent infizierten Katzen aus dieser Gruppe war die Herkunft bekannt. Zwei waren aus Tierheimen, eine aus einer reinen Wohnungshaltung und eine aus einer Zucht.

Das Auftreten eitriger Entzündungen in verschiedenen Organen war gerade noch signifikant mit einer latenten FeLV-Infektion im Vergleich zu den „reinen Traumakatten“ verknüpft. Am deutlichsten war die Assoziation bei den eitrigem Otitiden, die als alleinige Gruppe ebenfalls eine statistisch positiv signifikante Assoziation mit der latenten FeLV-Infektion im Vergleich zu den „reinen Traumakatten“ aufwiesen. Allerdings war die Fallzahl (n= 4) die geringst mögliche für die bei vorhandener Konstellation eine statistische Signifikanz errechnet werden konnte. Auffällig war dabei, dass das Alter der latent infizierten Katzen mit eitrigem Entzündungen mit 80 Monaten deutlich über dem Altersdurchschnitt für alle latent infizierte Katzen lag. Bei den Tieren, die multiple eitrigem Entzündungen aufwiesen, für die eine deutlichere statistische Signifikanz vorlag, war dieser Altersunterschied noch deutlicher. Die Tiere waren fast zwei Jahre älter als der Durchschnitt aller latent FeLV-Infizierten. Dass die Assoziation mit eitrigem Entzündungen auf der Altersverteilung beruhte, ist daher nicht auszuschließen. Es ist *in vitro* gezeigt worden, dass sowohl produktive als auch latente Infektionen zur Depression der spezifischen und unspezifischen zellulären Abwehr führten, was zu vermehrtem Auftreten eitrigem Entzündungen beitragen könnte (Lafrado et al., 1989; Lafrado und Olsen, 1986). Von einer zyklischen Neutropenie in Verbindung mit einer

latenten FeLV-Infektion wurde 1987 berichtet (Swenson et al., 1987). 1996 fanden Jackson et al. eine chronische Neutropenie bei einer Katze, bei der U3-Sequenzen mit einer PCR in Blutzellen nachgewiesen wurden. Ein Antigen-ELISA verlief bei dieser Katze negativ (Jackson et al., 1996). Pacitti und Jarrett (1985) diagnostizierten eine Pyometra bei einem latent FeLV-infizierten Tier (Pacitti und Jarrett, 1985). Zwei von 15 Tieren mit chronischen Gingivitiden waren in einer österreichischen Studie U3-positiv und Antigen-negativ (Uthmann et al., 1996). Pedersen et al. (1984) und Swenson et al. (1990) fanden mehrere entzündliche Veränderungen, wie z. B. Abszesse, Entzündungen des oberen Respirationstraktes oder Otitiden bei Katzen, die Hinweise auf das Vorliegen eines latenten FeLV-Infektionsstatus hatten oder bei denen eine latente Infektion nachgewiesen wurde (Pedersen, 1984; Swenson et al., 1990; Swenson et al., 1987). In der Untersuchung von Swenson et al. (1990) hatten jüngere Katzen seltener Anti-FOCMA-Antikörper, also Hinweise auf FeLV-Kontakt, als ältere Katzen.

Als statistisch signifikant erwiesen sich auch Assoziationen von latenter FeLV-Infektion mit interstieller Nephritis und mit Nierentubulusverkalkungen im Vergleich zur reinen Traumagruppe. Nur die interstitielle Nephritis war bislang in einer wissenschaftlichen Studie mit einer allerdings floriden FeLV-Infektion in Verbindung gebracht worden, in der eine Signifikanz gegenüber Traumakatten ermittelt werden konnte (Wittmer, 1993). Dabei ist zu bemerken, dass das Erkennen beider Veränderungen einer pathologischen Untersuchung vorbehalten ist, da sie klinisch im Allgemeinen nicht zu diagnostizieren sind. In Hinblick auf das Alter der Tiere mit interstitieller Nephritis ist festzuhalten, dass sie deutlich älter waren als der Stichprobendurchschnitt. Zwischen latent infizierten und FeLV-negativen Tieren bestand ein deutlicher Unterschied im Durchschnittsalter. Sowohl latent infizierte Katzen als auch FeLV-negative Katzen mit nichteitriger interstitieller Nephritis waren im Durchschnitt aber jeweils deutlich älter als der jeweilige Durchschnitt aller Tiere. Bei zwölf der 33 Tiere mit nichteitriger interstitieller Nephritis lagen weitere Nierenveränderungen vor: Viermal Glomerulonephrosen und –sklerosen, dreimal Zysten, zweimal Tubulonephrosen, einmal Niereninfarkte, einmal Karzinometastasen und einmal eine eitrig Nephritis. Die Tiere mit mehreren Nierenbefunden waren nur zu 50 % latent infiziert. Von 16 Tieren war die Herkunft bekannt. Dabei stammten fünf aus Tierschutzeinrichtungen, sieben aus Mehrkatzenhaushalten, zwei waren Freigänger, eine Katze war aus reiner Wohnungshaltung, eine aus einer Zucht. Bei virämisch verlaufenden FeLV-Infektionen wurden als

Nephropathien bisher lediglich Glomerulonephritiden beschrieben (Mackey, 1975). Bei Francis et al. (1980) traten auch gehäuft Glomerulonephritiden bei Kontakttieren zu serologisch FeLV-positiven Katzen auf. In umfangreichen pathologischen Studien an Sektionskatzen konnte allerdings keine Assoziation mit Glomerulonephritis gezeigt werden (Reinacher und Frese, 1991; Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993). Das konnte in dieser Untersuchung in Hinblick auf die latente Infektion bestätigt werden.

Die sechs latent infizierten Tiere mit Nierentubulusverkalkungen waren mit durchschnittlich 40 Monaten deutlich jünger als der Durchschnitt der latent infizierten Tiere. Eine Beeinflussung des signifikanten Ergebnisses über die Alterszusammensetzung ist daher auszuschließen, obwohl nur von vier Tieren das Alter bekannt war. Eine Katze mit Tubulusverkalkungen litt an einer PKD mit Urämie. Die anderen Tiere hatten keine weiteren Befunde an den Nieren. Zwei Tiere litten an einer Sepsis, ein Tier war auch an einer pyogranulomatösen Dermatomyositis erkrankt, ein Tier an einem Ileus und ein Erkrankungsbild blieb unklar. Nur beim Tier mit PKD war eine Urämie festzustellen. Eine Beeinflussung über das Geschlecht war nicht vorhanden, denn männliche und weibliche Tiere waren zu gleichen Teilen vertreten. Zwei Tiere stammten aus einem Tierheim. Eine Katze mit Freigang und eine Katze aus einem Mehrkatzenhaushalt waren ebenfalls vertreten. Im Zusammenhang mit den Tubulusverkalkungen ist erwähnenswert, dass die zwei Tiere, die Gefäßverkalkungen aufwiesen, ebenfalls beide latent infiziert waren.

In der vorliegenden Untersuchung konnte keine signifikante Assoziation zu einigen klassischen FeLV-assoziierten Krankheiten oder Diagnosen festgestellt werden. Das stellt nicht unbedingt einen Widerspruch dar. Allgemein ist dazu vorab folgende Überlegung anzustellen: Signifikante Assoziationen von bestimmten Diagnosen mit einer produktiven Infektion konnten in zurückliegenden Untersuchungen, unter der Voraussetzung, dass damals eine ähnlich hohe Prävalenz latenter FeLV-Infektion vorlag, teilweise nur zustande kommen, weil die latente Infektion keinen starken Einfluß auf diese Diagnosen hatte. Ansonsten wäre die Prävalenz der jeweiligen Diagnose in der nichtproduktiv infizierten Population unter Umständen zu hoch gewesen, um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu erhalten.

Als Beispiel hierfür wären lymphatische Leukosen zu nennen, die in der gesamten Stichproben von 302 Sektionskatzen 22 mal auftraten, davon 18 mal in Verbindung mit einer FeLV-Infektion (82 %). Acht davon waren immunhistologisch negativ. Von diesen hatten vier Provirussequenzen im Genom. Trotz fehlender statistisch signifikanter Assoziation mit

der latenten FeLV-Infektion, sollte man bei dieser Konstellation einen biologischen Zusammenhang nicht ausschließen. Provirus konnte in einer Studie, die als Ausgangsmaterial paraffineingebettete, immunhistologisch FeLV-negative Lymphosarkome verwendete, in ähnlicher Größenordnung wie hier (ca. 50 %) gefunden werden (Jackson et al., 1993). Eine ähnliche Untersuchung aus Australien lieferte bei 19 von 84 (22,6 %) Lymphosarkomen latente FeLV-Infektionen (Gabor et al., 2001). In einer anderen Studie wurden bei allen sechs Katzen mit Leukoseerkrankungen latente Infektionen festgestellt (Schwartz et al., 2001). Rojko et al. (1982) konnten FeLV aus einer Knochenmarkkultur von zwei Lymphosarkomen bei serologisch FeLV-negativen Katzen isolieren, was in einer anderen Studie bei zwei anderen Lymphosarkomen misslang (Madewell und Jarrett, 1983; Rojko et al., 1982). Bei Pedersen et al. (1984) war bei einem Tier nach Beendigung einer FeLV-Virämie eine Thymusleukose aufgetreten. Epidemiologische Daten aus mehreren Untersuchungen deuteten auf eine Assoziation FeLV-Antigen-negativer Leukosen mit einer latenten FeLV-Infektion hin (Francis et al., 1979; Francis et al., 1981; Francis et al., 1980; Hardy et al., 1980). In einer Untersuchung aus dem Jahr 1981 konnten bei sechs Antigen-negativen Lymphosarkomen allerdings keine exogenen U3-Sequenzen nachgewiesen werden (Casey et al., 1981).

Insgesamt waren die Katzen mit Antigen-negativen Lymphosarkomen 45 Monate älter als der Durchschnitt aller FeLV-Antigen-negativen Katzen, wiesen allerdings mit 50 % eine geringere Prävalenz der latenten FeLV-Infektion als diese Gruppe (55 %) auf. Latent infizierte Lymphosarkomträger waren im Durchschnitt 67 Monate älter als die nicht latent infizierten Antigen-negativen, wobei die jüngste latent infizierte Katze dabei 24 Monate alt war. Sie bestätigten den allgemeinen Trend, dass latent FeLV-infizierte Tiere älter waren als völlig FeLV-negative. Immunhistologisch FeLV-positive Katzen mit einer Leukoseerkrankung waren durchschnittlich 54 Monate alt und damit geringfügig älter als der Durchschnitt der Stichprobenpopulation aber deutlich jünger als die Antigen-negativen leukosekranken Tiere. Dieses Ergebnis bestätigte andere Studien, die ebenfalls festgestellt hatten, dass FeLV-Antigen-positive Tiere mit Lymphosarkomen jünger waren als FeLV-Antigen-negative (Wittmer, 1993).

Es konnte entgegen Erkenntnissen bei produktiven FeLV-Infektionen kein statistischer Zusammenhang zwischen latenter FeLV-Infektion und dem Auftreten mesenchymaler Tumoren gezeigt werden. Von den fünf mesenchymalen Tumoren fanden sich nur zwei bei latent infizierten Katzen. Wie bei den epithelialen Tumoren traten auch die Sarkome überwiegend bei älteren Katzen auf. Von 100 Antigen-negativen Fibrosarkomen wies in einer

Untersuchung aus dem Jahr 1996 keines exogene U3-Sequenzen auf (Ellis et al., 1996). Das gleiche galt für okuläre Sarkome und diffuse Irismelanome (Cullen et al., 2002; Cullen et al., 1998). Bei Pedersen et al. (1984) waren bei zwei Tieren nach Beendigung einer FeLV-Virämie Fibrosarkome aufgetreten.

In mehreren Studien konnte ein häufiges Auftreten von Feliner Infektiöser Peritonitis in Verbindung mit einer produktiven FeLV-Infektion gezeigt werden (Cotter et al., 1975; Essex et al., 1975b; Hardy, 1981; Hardy et al., 1976; Reinacher und Theilen, 1987). Für die latente Infektion konnte in der vorliegenden Untersuchung kein solcher Zusammenhang nachgewiesen werden. Eine latente FeLV-Infektion schien das Auftreten der FIP also nicht zu begünstigen, obwohl in einer epidemiologischen Studie, die in FeLV-positiven Haushalten durchgeführt wurde, Antigen-negative Tiere auch an FIP starben (Francis et al., 1980). Wenn man das Alter der FIP-erkrankten Tiere betrachtet, erkennt man, dass sie sehr deutlich jünger als der Durchschnitt der Stichprobenpopulation waren. Latent infizierte FIP-Katzen waren acht Monate älter als die FeLV-negativen.

Abschließend bleibt darauf hinzuweisen, dass in dieser Untersuchung eine hohe Prävalenz latenter FeLV-Infektionen bei Sektionskatzen festgestellt werden konnte. Mittels statistischer Verfahren konnte darüber hinaus in einigen Fällen eine statistisch signifikante Assoziation von bestimmten Erkrankungen mit der latenten FeLV-Infektion gefunden werden. In den meisten Fällen war eine Signifikanz nur im Vergleich zur Gruppe der „reinen Traumakatten“ vorhanden.

Ein kausaler Zusammenhang kann damit nicht gezeigt werden. Die vorliegende Studie sollte daher, auch aufgrund der mit 276 Katzen nur kleinen Stichprobe immunhistologisch FeLV-negativer Katzen, als explorative, sondierende Studie betrachtet werden, die aufzuzeigen vermag, bei welchen Diagnosen am sinnvollsten pathogenetische Studien zur Auswirkung einer latenten FeLV-Infektion vorgenommen werden können.

6. Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

1. Der Literaturteil dieser Dissertation gibt den aktuellen Stand der Forschung über die Infektion mit dem Felinen Leukämievirus in Hinblick auf Klassifikation, Replikationszyklus, Epidemiologie, Prävalenz, Pathogenesemechanismen, Erkrankungen, Nachweismethoden und Unterschiede zu endogenen Retroviren wieder. Spezielles Augenmerk gilt dabei den Erkenntnissen zur latenten FeLV-Infektion.

2. Die eigenen Untersuchungen erstreckten sich auf 302 Sektionskatzen, die an das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen der Routinediagnostik eingesandt wurden. Die Tiere wurden kontinuierlich und ohne Selektion in die Untersuchung einbezogen.

3. Eine seminested PCR zum Nachweis einer exogenen U3-Sequenz wurde unter modifizierter Verwendung von in der Literatur angegebenen Primern etabliert und anschließend ebenso wie eine immunhistologische Untersuchung zum Nachweis einer FeLV-Infektion durchgeführt. Neben den Ergebnissen dieser beiden Untersuchungen zum FeLV-Status gingen anamnestische Angaben, pathologische Befunde, diagnostizierte Erkrankungen und Angaben über den Frischegrad der Tierkörper zum Zeitpunkt der Sektion in die Datenerfassung ein.

4. Die Daten wurden mittels verschiedener statistischer Verfahren unter Berücksichtigung des Signifikanzniveaus des jeweiligen Einzeltest (lokales Niveau) von $p = 0,05$ analysiert. Für die statistischen Berechnungen wurde die Stichprobenpopulation von den immunhistologisch FeLV-positiven Tieren bereinigt.

5. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung handelt es sich bei der latenten Verlaufsform mit 50 % Anteil an der gesamten Stichprobe um die häufigste Form der FeLV-Infektion.

6. Nichtvirale Infektionen traten signifikant häufiger bei latent infizierten Tieren im Vergleich mit der Stichprobenpopulation auf.

7. Signifikant seltener im Vergleich mit der Stichprobenpopulation traten bei latent infizierten Tieren traumatisch bedingte Todesfälle bei ansonsten gesunden Tieren und gastrointestinale Ulzerationen ohne gleichzeitiges Vorliegen einer Urämie auf.

8. Im Vergleich zur reinen Traumapopulation bestanden bei folgenden Erkrankungen oder Diagnosen signifikante Assoziationen mit der latenten FeLV-Infektion:

Follikeldepletion (Milz), Follikeldepletion (Lymphknoten), follikuläre Hyperplasie (Lymphknoten), Kardiomyopathien, nichtentzündliche Körperhöhlenergüsse, Otitiden, Wurmbefall, bakterielle Infektionen, Parvovirusinfektion, epitheliale Tumoren, Anämie, nichteitrige interstitielle Nephritis, eitrige Entzündung(en), Enteritiden (ohne feline infektiöse Panleukopenie), Nierentubulusverkalkungen.

9. Ältere Katzen waren signifikant häufiger latent FeLV-infiziert.

10. Männliche Tiere waren im Vergleich zu weiblichen Tieren signifikant häufiger latent FeLV-infiziert.

11. Diese Untersuchung ist als explorative Studie zu werten. Aus den statistisch signifikanten Assoziationen der latenten FeLV-Infektion mit bestimmten Erkrankungen kann nicht direkt auf einen ursächlichen Zusammenhang geschlossen werden.

6.2 Summary

1. The review of the literature in this doctoral thesis displays the current knowledge of feline leukaemia virus research according to virus classification, life cycle, epidemiology, prevalence, associated diseases, pathogenesis, detection methods and differences to endogenous retroviral sequences. It emphasizes the knowledge about latent FeLV infection.
2. This study includes 302 necropsied cats that were sent for routine diagnostic purposes to the Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Samples were taken continuously without preselection.
3. A seminested PCR for detection of an exogenous U3 sequence was established and performed by modified use of previously published primers. In addition, immunohistology was performed for exclusion of productive FeLV infection. Case histories, signalement, pathological findings and diseases as well as degree of deterioration were included in this study for statistical analysis.
4. Data were analyzed statistically with different methods. A $p = 0,05$ as niveau of significance was determined for the individual test. For statistical analysis the immunohistologically FeLV-positive cats were removed from the population.
5. The results of this study suggest that latency is the most frequent outcome of FeLV infection with a prevalence of 50 % in the population.
6. Non-viral infections occurred significantly more often in cats with latent FeLV infection when compared to the population.
7. Trauma and gastrointestinal ulcerations of non-uremic origin were significantly less frequent in cats with latent FeLV infection when compared to the population.
8. Compared to the trauma population, other diseases or diagnoses showed a significant association with latent FeLV infection: lymphoid depletion (spleen), lymphoid depletion (lymph nodes), follicular hyperplasia (lymph nodes), cardiomyopathies, fluids in body

cavities (non-inflammatory), otitis, worm infestation, bacterial infection, parvovirus infection, epithelial tumors, anemia, interstitial nephritis, (multifocal) suppurative inflammation, enteritis (without feline infectious panleukopenia) and calcification of renal tubules.

9. Old cats showed significantly more often latent FeLV infections than young cats.

10. Male cats were significantly more often latently FeLV infected than female cats.

11. This study is an explorative investigation. The statistically significant associations are not to be interpreted directly as a causative linkage between the respective diagnosis and latent FeLV infection.

7. Literaturverzeichnis

- 1992, Panel report on the colloquium on feline leukemia virus/feline immunodeficiency virus: tests and vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1273-1277.
- Abujamra, A.L., Faller, D.V., Ghosh, S.K., 2003, Mutations that abrogate transactivational activity of the feline leukemia virus long terminal repeat do not affect virus replication. *Virology* 309, 294-305.
- Abujamra, A.L., Spanjaard, R.A., Akinsheye, I., Zhao, X., Faller, D.V., Ghosh, S.K., 2006, Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology* 345, 390-403.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990, Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anderson, L.J., Jarrett, W.F.H., Jarrett, O., Laird, H.M., 1971, Feline leukemia-virus infection of kittens: mortality associated with atrophy of the thymus and lymphoid depletion. *J. Natl. Cancer Inst.* 47, 807-813.
- Anderson, M.M., Luring, A.S., Burns, C.C., Overbaugh, J., 2000, Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science* 287, 1828-1830.
- Anderson, M.M., Luring, A.S., Robertson, S., Dirks, C., Overbaugh, J., 2001, Feline Pit2 functions as a receptor for subgroup B feline leukemia viruses. *J. Virol.* 75, 10563-10572.
- Arjona, A., Escolar, E., Soto, I., Barquero, N., Martin, D., Gomez-Lucia, E., 2000, Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3448-3449.

- Arjona, A., Barquero, N., Domenech, A., Tejerizo, G., Collado, V.M., Tournal, C., Martin, D., Gomez-Lucia, E., 2006, Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *J. Feline Med. Surg.* Epub ahead of print.
- Bandecchi, P., Matteucci, D., Baldinotti, F., Guidi, G., Abramo, F., Tozzini, F., Bendinelli, M., 1992, Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31, 337-345.
- Bandecchi, P., Dell'Omodarme, M., Magi, M., Palamidessi, A., Prati, M.C., 2006, Feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. *Vet. Rec.* 188, 555-557.
- Bechtel, M.K., Hayes, K.A., Mathes, L.E., Pandey, R., Stromberg, P.C., Roy-Burman, P., 1999, Recombinant feline leukemia virus (FeLV) variants establish a limited infection with altered cell tropism in specific-pathogen-free cats in the absence of FeLV subgroup A helper virus. *Vet. Pathol.* 36, 91-99.
- Bender, R., Lange, S., 2001a, Die Vierfeldertafel. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 126, T36-T38.
- Bender, R., Lange, S., 2001b, Was ist der p-Wert? *Dtsch. Med. Wochenschr.* 126, T39-T40.
- Bender, R., Lange, S., Ziegler, A., 2002, Multiples Testen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 127, T4-T7.
- Benveniste, R.E., Todaro, G.J., 1974, Evolution of C-type viral genes: inheritance of exogenously acquired viral genes. *Nature* 252, 456-459.
- Benveniste, R.E., Sherr, C.J., Todaro, G.J., 1975, Evolution of type C viral genes: origin of feline leukemia virus. *Science* 190, 886-888.

- Berry, B.T., Ghosh, A.K., Kumar, D.V., Spodick, D.A., Roy- Burman, P., 1988, Structure and function of endogenous feline leukemia virus long terminal repeats and adjoining regions. *J. Virol.* 62, 3631-3641.
- Besmer, P., 1983, Acute transforming feline retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 107, 1-27.
- Blue, J.T., 1988, Myelofibrosis in cats with myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Vet. Pathol.* 25, 154-160.
- Bolognesi, D.P., Montelaro, R.C., Frank, H., Schäfer, W., 1978, Assembly of type c oncornaviruses: a model. *Science* 1999.
- Bonner, T.I., Todaro, G.J., 1979, Carnivores have sequences in their cellular DNA distantly related to the primate endogenous virus, MAC-1. *Virology* 94, 224-227.
- Brooks, D.G., Zack, J.A., 2002, Effect of latent human immunodeficiency virus infection on cell surface phenotype. *J. Virol.* 76, 1673-1681.
- Broschk, C., Distl, O., 2005, Dilated cardiomyopathy (DCM) in dogs - pathological, clinical, diagnosis and genetic aspects. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 112, 380-385.
- Busch, M.P., Devi, B.G., Soe, L.H., Perbal, B., Baluda, M.A., Roy-Burman, P., 1983, Characterization of the expression of cellular retrovirus genes and oncogenes in feline cells. *Hematol. Oncol.* 1, 61-75.
- Büttner, A., 2004, Vergleichende Untersuchungen über Translation und Transkription von Strukturproteinen des Felinen Leukämievirus nach experimenteller Infektion. *Vet. Med. Diss., Giessen.*
- Carmichael, K.P., Bienzle, D., McDonnell, J.J., 2002, Feline leukemia virus-associated myelopathy in cats. *Vet. Pathol.* 39, 536-545.

- Casey J.W., Roach, A., Mullins, J.I., Burck, K.B., Nicolson, M.O., Gardner, M.B., Davidson N., 1981, The U3 portion of feline leukemia virus identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7778-7782.
- Cattori, V., Tandon, R., Pepin, A., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2006, Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA. *Mol. Cell Probes* 20, 172-181.
- Cereseto, A., Giacca, M., 2004, Integration site selection by retroviruses. *AIDS Rev.* 6, 13-21.
- Charreyre, C., Pedersen, N.C., 1991, Study of feline leukemia virus immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1316-1324.
- Chen, H., Bechtel, M.K., Shi, Y., Phipps, A., Mathes, L.E., Hayes, K.A., Roy-Burman, P., 1998, Pathogenicity induced by feline leukemia virus, Rickard strain, subgroup A plasmid DNA (pFRA). *J. Virol.* 72, 7048-7056.
- Cheng, H.H., Anderson, M.M., Hankenson, F.C., Johnston, L., Kotwaliwale, C.V., Overbaugh, J., 2006, Envelope determinants for dual-receptor specificity in feline leukemia virus subgroup A and T variants. *J. Virol.* 80, 1619-1628.
- Cockerell, G.L., Hoover, E.A., Krakowka, S., Olsen, R.G., Yohn, D.S., 1976, Lymphocyte mitogen reactivity and enumeration of circulating B- and T-cells during feline leukemia virus infection in the cat. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1095-1099.
- Coffin, J.M., 1979, Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* 42, 1-26.
- Comazzi, S., Paltrinieri, S., Caniatti, M., De Dominici, S., 2000, Erythremic myelosis (AML6er) in a cat. *J. Feline Med. Surg.* 2, 213-215.
- Conti, F.G., Powell, R., Pozzi, L., Zezze, G., Faraggiana, T., Gannon, F., Fabbrini, A., 1995, A novel line of transgenic mice (RSV/LTR-bGH) expressing growth hormone in cardiac and striated muscle. *Growth Regul.* 5, 101-108.

- Cotter, S.M., Hardy, W.D., Jr., Essex, M., 1975, Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166, 449-454.
- Cotter, S.M., 1998, Feline viral neoplasia, In: Greene, C. (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat.* W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 71-84.
- Cullen, C.L., Haines, D.M., Jackson, M.L., Peiffer, R.L., Grahn, B.H., 1998, The use of immunohistochemistry and the polymerase chain reaction for detection of feline leukemia virus and feline sarcoma virus in six cases of feline ocular sarcoma. *Vet. Ophthalmol.* 1, 189-193.
- Cullen, C.L., Haines, D.M., Jackson, M.L., Grahn, B.H., 2002, Lack of detection of feline leukemia and feline sarcoma viruses in diffuse iris melanomas of cats by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 340-343.
- De Noronha, F., Schäfer, W., Essex, M., Bolognesi, D.P., 1978, Influence of antisera to oncornavirus glycoprotein (gp71) on infections of cats with feline leukemia virus. *Virology* 85, 617-621.
- Dezutti, C.S., Wright, K.A., Lewis, M.G., Lafrado, L.J., Olsen, R.G., 1989, FeLV-induced immunosuppression through alterations in signal transduction: Down regulation of protein kinase C. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21, 55-67.
- Donahue, P.R., Quackenbush, S.L., Gallo, M.V., De Noronha, C.M.C., Overbaugh, J., Hoover, E.A., Mullins, J.I., 1991, Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *J. Virol.* 65, 4461-4469.
- Dorny, P., Speybroeck, N., Verstraete, S., Backe, M., De Becker, A., Berkvens, D., Vercruyse, J., 2002, Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *Vet. Rec.* 151, 626-629.

- Elder, J.H., Mullins, J.I., 1983, Nucleotide sequence of the envelope gene of Gardner-Arnstein feline leukemia virus B reveals unique sequence homologies with a murine mink cell focus-forming virus. *J. Virol.* 46, 871-880.
- Ellis, J.A., Jackson, M.L., Bartsch, R.C., McGill, L.G., Martin, K.M., Trask, B.R., Haines, D.M., 1996, Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209.
- Engelman, R.W., Fulton, R.W., Good, R.A., Day, N.K., 1985, Suppression of gamma interferon production by inactivated feline leukemia virus. *Science* 227, 1368-1370.
- Essex, M., Klein, G., Snyder, S.P., Harrold, J.B., 1971a, Antibody to feline oncornavirus-associated cell membrane antigen in neonatal cats. *Int. J. Cancer* 8, 384-390.
- Essex, M., Klein, G., Snyder, S.P., Harrold, J.B., 1971b, Correlation between humoral antibody and regression of tumours induced by feline sarcoma virus. *Nature* 233, 195-196.
- Essex, M., Cotter, S.M., Carpenter, J.L., Hardy, W.D., Jr., Hess, P., Jarrett, W., Schaller, J., Yohn, D.S., 1975a, Feline oncornavirus associated cell membrane antigen. II. antibody titers in healthy cats from households and laboratory colony environments. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 631-635.
- Essex, M., Cotter, S.M., Hardy, W.D., Jr., Hess, P., Jarrett, W., Jarrett, O., Mackey, L., Laird, H., Perryman, R., Olsen, G., Yohn, D.S., 1975b, Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. IV. Antibody titers in cats with naturally occurring leukemia, lymphoma, and other diseases. *J. Natl. Cancer. Inst.* 55, 463-467.
- Essex, M., Cotter, S.M., Sliski, A.H., Jakowsky, R.M., Hardy, W.D., Jr., 1975c, Immunosurveillance of naturally occurring feline leukemia. *Science* 190, 790-792.

- Essex, M., Hardy, W.D., Jr., Cotter, S.M., Jakowski, R.M., Slisky, A.H., 1975d, Naturally occurring persistent feline oncornavirus infections in the absence of disease. *Infect. Immun.* 11, 470-475.
- Essex, M., Slisky, A.H., Hardy, W.D., Jr., Cotter, S.M., 1976, Immune response to leukemia virus and tumor-associated antigens in cats. *Cancer Res.* 36, 640-645.
- Essex, M., Cotter, S.M., Sliski, A.H., Hardy, W.D., Jr., Stephenson, J.R., Aaronson, S.A., Jarrett, O., 1977, Horizontal transmission of feline leukemia virus under natural conditions in a feline leukemia cluster household. *Int. J. Cancer* 19, 90-96.
- Essex, M., Cotter, S.M., Sliski, A.H., Hardy, W.D., Jr., deNoronha, F., Cotter, S.M., 1978, Feline oncornavirus associated cell membrane antigen: A tumor specific cell surface marker, In: Bentveltzen, P. (Ed.) *Advances in comparative leukemia research.* 1978 Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 337-340.
- Fassati, A., Goff, S.P., 1999, Characterization of intracellular reverse transcription complexes of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 73, 8919-8925.
- Favrot, C., Wilhelm, S., Grest, P., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Kipar, A., 2005, Two cases of FeLV-associated dermatoses. *Vet. Dermatol.* 16, 407-412.
- Fink, M.A., Sibal, C.R., Plata, E.J., 1971, Serological detection of feline leukemia virus antigens or antibodies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 158, 1070-1075.
- Flynn, N.J., Hanlon, L., Jarrett, O., 2000, Feline leukemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 101, 120-125.
- Flynn, N.J., Dunham, S., Watson, V., Jarrett, O., 2002, Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: Correlation with recovery from infection. *J. Virol.* 76, 2306-2315.
- Francis, D.P., Essex, M., 1977, Excretion of feline leukemia virus by naturally infected pet cats. *Nature* 269, 252-254.

- Francis, D.P., Cotter, S.M., Hardy, W.D., Jr., Essex, M., 1979a, Comparison of virus-positive and virus-negative cases of feline leukemia and lymphoma. *Cancer Res.* 39, 3866-3870.
- Francis, D.P., Essex, M., Gayzagian, D., 1979b, Feline leukemia virus: survival under home and laboratory conditions. *J. Clin. Microbiol.* 9, 154-156.
- Francis, D.P., Essex, M., Jakowski, R.M., Cotter, S.M., Lerer, T.J., Hardy, W.D., Jr., 1980, Increased risk for lymphoma and glomerulonephritis in a closed population of cats exposed to feline leukemia virus. *Am. J. Epidemiol.* 111, 337-346.
- Francis, D.P., Essex, M., Cotter, S.M., Gutensohn, N., Jakowski, R., Hardy, W.D., Jr., 1981, Epidemiologic association between virus-negative feline leukemia and the horizontally transmitted feline leukemia virus. *Cancer Lett.* 12, 37-42.
- Frankel, A.E., Gilbert, J.H., Porzig, K.J., Scolnick, E.M., Aaronson, S.A., 1979, Nature and distribution of feline sarcoma virus nucleotide sequences. *J. Virol.* 30, 821-827.
- Frese, K., Durchfeld, B., Eskens, U., 1989, Klassifikation und biologisches Verhalten der Haut- und Mammatumoren von Hund und Katze. *Prakt. Tierarzt* 9, 69-84.
- Fuchs, A., Binzel, L., Lonsdorfer, M., 1994, Epidemiologie der FeLV- und FIV-Infektion in der Bundesrepublik Deutschland. *Tierärztl. Prax.* 22, 273-277.
- Fujino, Y., Satoh, H., Hisasue, M., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2003, Detection of the integrated feline leukemia viruses in a cat lymphoid tumor cell line by fluorescence in situ hybridization. *J. Hered.* 94, 251-255.
- Fujino, Y., Ma, Z., Satoh, H., Mizuno, T., Hisasue, M., Baba, K., Masuda, K., Ohno, K., Onishi, T., Tsujimoto, H., 2004, Characterization of a newly established nonproducer lymphoma cell line for feline leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 429-439.

- Fulton, R., Plumb, M., Shield, L., Neil, J.C., 1990, Structural diversity and nuclear protein binding sites in the long terminal repeats of feline leukemia virus. *J. Virol.* 64, 1675-1682.
- Gabor, L.J., Jackson, M.L., Trask, B., Malik, R., Canfield, P.J., 2001, Feline leukaemia virus status of australian cats with lymphosarcoma. *Aust. Vet. J.* 79, 476-481.
- Gardner, M.B., Rasheed, S., Rongey, R.W., Charman, H.P., Alena, B., Gilden, R.V., Huebner, R.J., 1974, Natural expression of feline type-C virus genomes, prevalence of detectable felv and RD-114 GS antigen, type-C particles and infectious virus in postnatal and fetal cats. *Int. J. Cancer* 14, 97-105.
- Ghosh, A.K., Bachmann, M.H., Hoover, E.A., Mullins, J.I., 1992, Identification of a putative receptor for subgroup A feline leukemia virus on feline T cells. *J. Virol.* 66, 3707-3714.
- Ghosh, A.K., Faller, D.V., 1999, Feline leukemia virus long terminal repeat activates collagenase IV gene expression through AP-1. *J. Virol.* 73, 4931-4940.
- Ghosh, S.K., Roy-Burman, P., Faller, D.V., 2000, Long terminal repeat regions from exogenous but not endogenous feline leukemia virus transactivate cellular gene expression. *J. Virol.* 74, 9742-9748.
- Glick, A.D., Horn, R.G., Holscher, M., 1978, Characterization of feline glomerulonephritis associated with viral-induced hematopoietic neoplasms. *Am. J. Pathol.* 92, 321-332.
- Goff, S.P., 2001, Retroviridae. The Retroviruses and their Replication, In: Knipe, D., Howley PM (Ed.) *Fields` Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1871-1940.
- Gomes-Keller, M.A., Tandon, R., Gönczi, E., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., 2006, Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Vet. Microbiol.* 112, 11-21.

- Gorska-Flipot, I., Huang, M., Cantin, M., Rassart, E., Masse, G., Jolicoeur, P., 1992, U3 long terminal repeat-mediated induction of intracellular immunity by a murine retrovirus: a novel model of latency for retroviruses. *J. Virol.* 66, 7201-7210.
- Grant, C.K., DeBoer, D.J., Essex, M., Worley, M.B., Higgins, J., 1977, Antibodies from healthy cats exposed to feline leukemia virus lyse feline lymphoma cells slowly with cat complement. *J. Immunol.* 119, 401-406.
- Grant, C.K., Essex, M., Pedersen, N.C., Hardy, W.D., Jr., Stephenson, J.R., Cotter, S.M., Theilen, G.H., 1978, Lysis of feline lymphoma cells by complement-dependent antibodies in feline leukemia virus contact cats. Correlation of lysis and antibodies to feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 161-166.
- Grant, C.K., Essex, M., Gardner, M.B., Hardy, W.D., Jr., 1980a, Natural feline leukemia virus infection and the immune response of cats of different ages. *Cancer Res.* 40, 823-829.
- Grant, C.K., Harris, D., Essex, M.E., Pickard, D.K., Hardy, W.D., Jr., de Noronha, F., 1980b, Protection of cats against feline leukemia virus-positive and virus-negative tumors by complement-dependent antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 1527-1533.
- Grant, C.K., Ernisse, B.J., Jarrett, O., Jones, F.R., 1983, Feline leukemia virus envelope gp70 of subgroups B and C defined by monoclonal antibodies with cytotoxic and neutralizing functions. *J. Immunol.* 131, 3042-3048.
- Guilhot, S., Hampe, A., D'Auriol, L., Galibert, F., 1987, Nucleotide sequence analysis of the LTR's and env genes of SM-FeSV and GA-FeSV. *Virology* 161, 252-258.
- Hahn, W.C., Weinberg, R.A., 2002, Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Rev.* 2, 331-341.
- Haley, P.J., Hoover, E.A., Quackenbush, S.L., Gasper, P.W., Macy, D.W., 1985, Influence of antibody infusion on pathogenesis of experimental feline leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 74, 821-827.

- Hampe, A., Gobet, M., Even, J., Sherr, C.J., Galibert, F., 1983, Nucleotide sequences of feline sarcoma virus long terminal repeats and 5' leaders show extensive homology to those of other mammalian retroviruses. *J. Virol.* 45, 466- 472.
- Hanlon, L., Argyle, D., Bain, D., Nicolson, L., Dunham, S., Golder, M.C., McDonald, M., McGillivray, C., Jarrett, O., Neil, J.C., Onions, D.E., 2001, Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by coadministration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors. *J. Virol.* 75, 8424-8433.
- Hardy, W.D., Jr., Geering, G., Old, L.J., De Harven, E., Brodey, R.S., McDonough, S., 1969, Feline leukemia virus: occurrence of viral antigen in the tissues of cats with lymphosarcoma and other diseases. *Science* 166, 1019-1021.
- Hardy, W.D., Jr., 1971, Immunodiffusion studies of feline leukemia and sarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 158, 1060-1069.
- Hardy, W.D., Jr., Hirshaut, Y., Hess, P., 1973a, Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence, In: Dutcher, R., Chieco-Bianchi, L (Ed.) *Unifying concepts of leukemia*. S Karger, Basel, pp. 778-799.
- Hardy, W.D., Jr., Old, L.J., Hess, P.W., Essex, M., Cotter, S., 1973b, Horizontal transmission of feline leukaemia virus. *Nature* 244, 266-269.
- Hardy, W.D., Jr., Hess, P.W., MacEwen, E.G., McLelland, A.J., Zuckermann, E.E., Essex, M., Cotter, S.M., Jarrett, O., 1976, Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res.* 36, 582-588.
- Hardy, W.D., Jr., McClelland, A.J., Zuckerman, E.E., Snyder, H.W., Jr., MacEwen, E.G., Francis, D., Essex, M., 1980, Development of virus non-producer lymphosarcomas in pet cats exposed to FeLV. *Nature* 288, 90.
- Hardy, W.D., Jr., 1981, Hematopoietic tumors of cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17, 921-940.

- Hardy, W.D., Jr., 1982, Immunopathology induced by the feline leukemia virus. Springer Semin. Immunopathol. 5, 75-106.
- Hardy, W.D., Jr., Zuckerman, E.E., 1991a, Development of the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 1327-1335.
- Hardy, W.D., Jr., Zuckerman, B.S., 1991b, Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 1365-1373.
- Hawkins, E.C., 1991, Saliva and tear tests for feline leukemia virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 1382-1385.
- Hayes, K.A., Rojko, J.L., Tarr, M.J., Polas, P.J., Olsen, R.G., Mathes, L.E., 1989, Atypical localised viral expression in a cat with feline leukaemia. Vet. Rec. 124, 334-346.
- Hayes, K.A., Rojko, J.L., Mathes, L.E., 1992, Incidence of localized feline leukemia virus infection in cats. Am. J. Vet. Res. 53, 604-607.
- Hebebrand, L.C., Mathes, L.E., Olsen, R.G., 1977, Inhibition of concanavalin A stimulation of feline lymphocytes by inactivated feline leukemia virus. Cancer Res. 37, 4532-4533.
- Herring, E.S., Troy, G.C., Toth, T.E., Forrester, S.D., Weigt, L.A., Herring, I.P., 2001a, Detection of feline leukaemia virus in blood and bone marrow of cats with varying suspicion of latent infection. J. Feline Med. Surg. 3, 133-141.
- Herring, I.A., Troy, G.C., Toth, T.E., Champagne, E.S., Pickett, J.P., Haines, D.M., 2001b, Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. Vet. Ophthalmol. 4, 119-126.
- Hirschberger, J., 1987, Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphocyten des Huhnes. Vet. Med. Diss., Giessen.

- Hisasue, M., Okayama, H., Okayama, T., Suzuki, T., Mizuno, T., Fujino, Y., Naganobu, K., Hasegawa, A., Watari, T., Matsuki, N., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2001, Hematologic abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndromes. *J. Vet. Intern. Med.* 15, 471-477.
- Hofmann-Lehmann, R., Huder, J.B., Gruber, S., Boretti, F., Sigrist, B., Lutz, H., 2001, Feline leukemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J. Gen. Virol.* 82, 1589-1596.
- Hofmann-Lehmann, R., Tandon, R., Borretti, F.S., Meli, M.L., Willi, B., Cattori, V., Gomes-Keller, M.A., Ossent, P., Golder, M.C., Flynn, J.N., Lutz, H., 2006, Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine* 24, 1087-1094.
- Hoover, E.A., McCullough, C.B., Griesemer, R.A., 1972, Intranasal transmission of feline leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 973-983.
- Hoover, E.A., Perryman, L.E., Kociba, G.J., 1973, Early lesions in cats inoculated with feline leukemia virus. *Cancer Res.* 33, 145-152.
- Hoover, E.A., Kociba, G.J., 1974, Bone lesions in cats with anemia induced by feline leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 1277-1284.
- Hoover, E.A., Kociba, G.J., Hardy, W.D., Jr., Yohn, D.S., 1974, Erythroid hypoplasia in cats inoculated with feline leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 1271-1276.
- Hoover, E.A., Olsen, R.G., Hardy, W.D., Jr., Schaller, J.P., Mathes, L.E., 1976, Feline leukemia virus infection: Age-related variation in response of cats to experimental infection. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 365-369.
- Hoover, E.A., Olsen, R.G., Hardy, W.D., Jr., Schaller, J.P., 1977a, Horizontal transmission of feline leukemia virus under experimental conditions. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 443-445.

- Hoover, E.A., Olsen, R.G., Mathes, L.E., Schaller, J.P., 1977b, Relationship between feline leukemia virus antigen expression and viral infectivity in blood, bone marrow, and saliva of cats. *Cancer Res.* 37, 3707-3710.
- Hoover, E.A., Schaller, J.P., Mathes, L.E., Olsen, R.G., 1977c, Passive immunity to feline leukemia virus: Evaluation of immunity from dams naturally infected and experimentally vaccinated. *Infect. Immun.* 16, 54-59.
- Hoover, E.A., Mullins, E.A., 1991, Feline leukemia virus infection and diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1287-1297.
- Hoover, E.A., Mullins, E.A., 1995, FeLV/FAIDS immunodeficiency syndrome, In: Willett, B., Jarrett O (Ed.) *Feline Immunology and Immunodeficiency*. Oxford University Press, Oxford, pp. 318-350.
- Hosie, M., Robertson, C, Jarrett, O, 1989, Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 125, 293-297.
- Jackson, M.L., Haines, D.M., MERIC, S.M., Misra, V., 1993, Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can. J. Vet. Res.* 57, 269-276.
- Jackson, M.L., Haines, D.M., Taylor, S.M., Misra, V., 1996, Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 25-30.
- Jarrett, O., Laird, H.M., Hay, D., 1973, Determinants of the host range of feline leukemia viruses. *J. Gen. Virol.* 20, 169-175.
- Jarrett, O., Russell, P.H., Stewart, M.F., 1977, Protection of kittens from feline leukaemia virus infection by maternally-derived antibody. *Vet. Rec.* 101, 304-305.

- Jarrett, O., Hardy, W.D., Jr., Golder, M.C., Hay, D., 1978, The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. *Int. J. Cancer* 21, 334-337.
- Jarrett, O., 1991, Overview of feline leukemia virus research. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1279-1281.
- Jarrett, O., 1999, Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet. Microbiol.* 69, 99-107.
- Jarrett, W., Jarrett, O., Mackey, L., Laird, H., Hardy, W.D., Jr., Essex, M., 1973, Horizontal transmission of leukemia virus and leukemia in the cat. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 833-841.
- Jarrett, W.F., Martin, W.B., Crichton, G.W., Dalton, R.G., Stewart, M.F., 1964a, Transmission experiments with leukemia (lymphosarcoma). *Nature* 202, 566-567.
- Jarrett, W.F., Crawford, E.M., Martin, W.B., Davie, F., 1964b, A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature* 202, 567-569.
- Jordan, A., Bisgrove, D., Verdin, E., 2003, HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J.* 22, 1868-1877.
- Jun, K., Lee, S., Shin, H., 2000, Insertion of a retroviral solo long terminal repeat in *mdr-3* locus disrupts mRNA splicing in mice. *Mammalian Genome* 11, 843-848.
- Kahn, D.E., Mia, A.S., Tierney, M.M., 1980, Field evaluation of Leukassay*F, an FeLV detection test kit. *Feline Pract.* 10, 41-45.
- Kawakami, T.G., Theilen, G.H., Dungworth, D.L., Munn, R.J., Beall, S.G., 1967, "C"-type viral particles in plasma of cats with feline leukemia. *Science* 158, 1049-1050.
- Kipar, A., Kremendahl, J., Jackson, M.L., Reinacher, M., 2001, Comparative examination of cats with feline leukemia virus-associated enteritis and other relevant forms of feline enteritis. *Vet. Pathol.* 38, 359-371.

- Klenermann, P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1997, A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature* 390, 298-301.
- Knotek, Z., Hajkova, P., Svoboda, M., Toman, M., Raska, V., 1999, Epidemiology of feline leukaemia and feline immunodeficiency virus infections in the Czech Republic. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 46, 665-671.
- Kobilinsky, L., Hardy, W.D., Jr., Day, N.K., 1979, Hypocomplementemia associated with naturally occurring lymphosarcoma in pet cats. *J. Immunol.* 122, 2139-2142.
- Köhler, K., 2003, Untersuchung zur Klassifikation maligner Lymphome sowie zur differentiellen Expression von Virusproteinen bei FeLV- positiven malignen Lymphomen der Katze. *Vet. Med. Diss., Giessen.*
- Koshy, R., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Hardy, W., Essex, M., 1979, Distribution of feline leukemia virus DNA sequences in tissues of normal and leukemic domestic cats. *Virology* 99, 135-144.
- Koshy, R., Gallo, R.C., Wong-Staal, F., 1980, Characterization of the endogenous feline leukemia virus-related DNA sequences in cats and attempts to identify exogenous viral sequences in tissues of virus- negative leukemic animals. *Virology* 103, 434-445.
- Kovacevic, S., Kipar, A., Kremendahl, J., Teebken-Schuler, D., Grant, C.K., Reinacher, M., 1997, Immunohistochemical diagnosis of feline leukemia virus infection in formalin-fixed tissue. *Europ. J. Vet. Path.* 3, 13-19.
- Kraut, E.H., Rojko, J.L., Olsen, R.G., Tuomar, D.L., 1985, Effects of cobra venom factor treatment on latent feline leukemia virus infection. *J. Virol.* 54, 873-875.
- Kumar, V.D., Berry, B.T., Roy-Burman, P., 1989, Nucleotide sequence and distinctive characteristics of the env gene of endogenous feline leukemia provirus. *J. Virol.* 63, 2379-2384.

- Kwok, S., Sninsky, J.J., 1989, Application of PCR to the detection of human infectious diseases, In: Erlich, H.A. (Ed.) PCR Technology. Stockton Press, New York, pp. 235-244.
- Lafrado, L.J., Olsen, R.G., 1986, Demonstration of depressed polymorphonuclear leukocyte function in nonviremic FeLV-infected cats. *Cancer Invest.* 4, 297-300.
- Lafrado, L.J., Lewis, M.G., Mathes, L.E., Olsen, R.G., 1987, Suppression of in vitro neutrophil function by feline leukaemia virus (FeLV) and purified FeLV-p15E. *J. Gen. Virol.* 68, 507-513.
- Lafrado, L.J., Dezzutti, C.S., Lewis, M.G., Olsen, R.G., 1989, Immunodeficiency in latent feline leukemia virus infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21, 39-46.
- Laird, H.M., Jarrett, O., Crichton, G.W., Jarrett, W.F.H., 1968a, An electron microscopy study of virus particles in spontaneous leukemia in the cat. *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 867-878.
- Laird, H.M., Jarrett, O., Crichton, G.W., Jarrett, W.F.H., Hay, D., 1968b, Replication of leukemogenic-type virus in cat inoculated with feline lymphosarcoma extracts. *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 879-893.
- Lange, S., Bender, R., 2001, Was ist ein Signifikanztest? *Dtsch. Med. Wochenschr.* 126, T42-T44.
- Langweiler, M., Cockerell, G.L., deNoronha, F., 1983, Role of suppressor cells in feline leukemia virus-associated immunosuppression. *Cancer Res.* 43, 1957-1960.
- Lauring, A.S., Cheng, H.H., Eiden, M.V., Overbaugh, J., 2002, Genetic and biochemical analyses of receptor and cofactor determinants for T-cell-tropic feline leukemia virus infection. *J. Virol.* 76, 8069-8078.
- Lawler, D.F., Templeton, A.J., Monti, K.L., 1993, Evidence for genetic involvement in feline dilated cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 7, 383-387.

- Lee, I.T., Levy, J.K., Gorman, S.P., Crawford, P.C., Slater, M.R., 2002, Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 220, 620-622.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J.M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S.P., Oroszlan, S., Robinson, H., Skalka, A.M., Temin, H.M., Vogt, V., 1988, Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol* 62, 1808-1809.
- Levesque, K.S., Bonham, L., Levy, L.S., 1990, Flvi-1, a common integration domain of feline leukemia virus in naturally occurring lymphomas of a particular type. *J. Virol* 64, 3455-3462.
- Levin, R., Ruscetti, S.K., Parks, W.P., Scolnick, E.M., 1976, Expression of feline type-C virus in normal and tumor tissues of the domestic cat. *Int. J. Cancer* 18, 661-671.
- Levy, L.S., Gardner, M.B., Casey, J.W., 1984, Isolation of a feline leukaemia provirus containing the oncogene myc from a feline lymphosarcoma. *Nature* 308, 853-855.
- Levy, L.S., Lobelle-Rich, P.A., 1992, Insertional mutagenesis of flvi-2 in tumors induced by infection with LC-FelV, a myc-containing strain of feline leukemia virus. *J. Virol.* 66, 2885-2892.
- Levy, L.S., Lobelle-Rich, P.A., Overbaugh, J., 1993a, flvi-2, a target of retroviral insertional mutagenesis in feline thymic lymphosarcomas, encodes bmi-1. *Oncogene* 8, 1833-1838.
- Levy, L.S., Lobelle-Rich, P.A., Overbaugh, J., Abkowitz, J.L., Fulton, R., 1993b, Coincident involvement of flvi-2, c-myc and novel env genes in natural and experimental lymphosarcomas induced by feline leukemia virus. *Virology* 196, 892-895.
- Levy, L.S., Starkey, C.R., Prabhu, S., Lobelle-Rich, P.A., 1997, Cooperating events in lymphomagenesis mediated by feline leukemia virus. *Leukemia* 11, 239-241.

- Lewis, M.G., Duska, G.O., Stiff, M.I., Lafrado, L.J., Olsen, R.G., 1986, Polymorphonuclear leukocyte dysfunction associated with feline leukaemia virus infection. *J. Gen. Virol.* 67, 2113-2118.
- Lewis, P.F., Emerman, M., 1994, Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 68, 510-516.
- Li, X., Stark, G.R., 2002, NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp. Hematol.* 30, 285-296.
- Lin, J.A., Cheng, M.C., Inoshima, Y., Tomonaga, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Toh, K., Lu, Y.S., Mikami, T., 1995, Seroepidemiological survey of feline retrovirus infections in cats in Taiwan in 1993 and 1994. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 161-163.
- Linenberger, M.L., Abkowitz, J.L., 1992, In vivo infection of marrow stromal fibroblasts by feline leukemia virus. *Exp. Hematol.* 20, 1022-1027.
- Livingston, D.M., Todaro, G.J., 1973, Endogenous type C virus from a cat cell clone with properties distinct from previously described feline Type C virus. *Virology* 53, 142-151.
- Lutz, H., Pedersen, N., Higgins, J., Hubscher, U., Troy, F.A., Theilen, G.H., 1980a, Humoral immune reactivity to feline leukemia virus and associated antigens in cats naturally infected with feline leukemia virus. *Cancer Res.* 40, 3642-3651.
- Lutz, H., Pedersen, N.C., Higgins, J., Harris, C.W., Theilen, G.H., 1980b, Quantitation of p27 in the serum of cats during natural infection with feline leukemia virus, In: Hardy, W.J., Essex, M., McClelland, A. J. (Ed.) *Feline Leukemia Virus*. Elsevier North Holland Inc., pp. 497-505.
- Lutz, H., Pedersen, N.C., Durbin, R., Theilen, G.H., 1983, Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in enzyme-linked immunosorbent assay of p27. *J. Immunol. Methods* 56, 209-220.

Lutz, H., 1990, Feline retroviruses. *Vet. Microbiol.* 23, 131-146.

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

Lutz, H., 1992, Virusinfektionen, In: Schmidt, V., Horzinek, MC (Ed.) *Krankheiten der Katze*. G. Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, pp. 311-318.

Lutz, H., Castelli, I., Ehrensperger, F., Pospischil, A., Roskopf, M., Siegl, G., Grob, M., Martinod, S., 1995, Panleukopenia-like syndrome of FeLV caused by co-infection with FeLV and feline panleukopenia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46, 21-33.

Mackey, L., 1975, Feline leukemia virus and its clinical effects in cats. *Vet. Rec.* 96, 5-11.

Mackey, L., Jarrett, W., Jarrett, O., Laird, H., 1975, Anemia associated with feline leukemia virus infection in cats. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 209-217.

Madewell, B.R., Jarrett, O., 1983, Recovery of feline leukaemia virus from non-viraemic cats. *Vet. Rec.* 112, 339.

Malik, R., Kendall, K., Cridland, J., Coulston, S., Stuart, A.J., Snow, D., Love, D.N., 1997, Prevalences of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in cats in Sydney. *Aust. Vet. J.* 75, 323-327.

Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Xuan, X., Katsube, Y., Mikami, T., 2003, Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiol. Immunol.* 47, 147-153.

Mathes, L.E., Olsen, R.G., Hebebrand, L.C., Hoover, E.A., Schaller, J.P., 1978, Abrogation of lymphocyte blastogenesis by a feline leukaemia virus protein. *Nature* 274, 687-689.

- Mathes, L.E., Olsen, R.G., Hebebrand, L.C., Hoover, E.A., Schaller, J.P., Adams, P.W., Nichols, W.S., 1979, Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukemia virus. *Cancer Res.* 39, 950-955.
- Matsumoto, Y., Momoi, Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1992, Detection of enhancer repeats in the long terminal repeats of feline leukemia viruses from cats with spontaneous neoplastic and nonneoplastic diseases. *Virology* 189, 745-749.
- McClelland, A.J., Hardy, W.D., Jr., Zuckermann, E.E., 1980, Prognosis of healthy FeLV infected cats, In: Hardy, W.J., Essex, M., McClelland, A.J. (Eds.) *Feline Leukemia Virus*. Elsevier North Holland, New York, pp. 122-126.
- McDougall, A.S., Terry, A., Tzavaras, T., Cheney, C., Rojko, J., Neil, J.C., 1994, Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *J. Virol.* 68, 2151-2160.
- McMichael, J.C., Stiers, S., Coffin, S., 1986, Prevalence of feline leukemia virus infection among adult cats at an animal control center: association of viremia with phenotype and season. *Am. J. Vet. Res.* 47.
- Mendoza, R., Anderson, M.M., Overbaugh, J., 2006, A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *J. Virol.* 80, 3378-3385.
- Merezak, C., Pierreux, C., Adam, E., Lemaigre, F., Rousseau, C.G., Calomme, C., Van Lint, C., Christophe, D., Kerkhofs, P., Burny, A., Kettmann, R., Willems, L., 2001, Suboptimal enhancer sequences are required for efficient bovine leukemia virus propagation in vivo: implications for viral latency. *J. Virol.* 75, 6977-6988.
- Meurs, K.M., Sanchez, X., David, R.M., Bowles, N.E., Towbin, J.A., Reiser, P.J., Kittleson, J.A., Munro, M.J., Dryburgh, K., Macdonald, K.A., Kittleson, M.D., 2005, A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3587-3593.

- Miura, T., Shibuya, M., Tsujimoto, H., Fukusawa, M., Hayami, M., 1989, Molecular cloning of a feline leukemia provirus integrated adjacent to the c-myc gene in a feline T-cell leukemia cell line and the unique structure of its long terminal repeat. *Virology* 169, 458-461.
- Miyazawa, T., Jarrett, O., 1997, Feline leukemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic (discordant) cats. *Arch. Virol.* 142, 323-332.
- Moser, M., Burns, C.C., Boomer, S., Overbaugh, J., 1998, The host range and interference properties of two closely related feline leukemia variants suggest that they use distinct receptors. *Virology* 242, 366-377.
- Muirden, A., 2002, Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. *Vet. Rec.* 150, 621-625.
- Mullins, J.I., Casey, J.W., Nicolson, M.O., Davidson, N., 1980, Sequence organization of feline leukemia virus DNA in infected cells. *Nucl. Acid Res.* 8, 3287-3305.
- Mullins, J.I., Chen, C.S., Hoover, E.A., 1986, Disease-specific and tissue-specific production of unintegrated feline leukaemia virus variant DNA in feline AIDS. *Nature* 319, 333-336.
- Mullins, J.I., Hoover, E.A., Overbaugh, J., Quackenbush, S.L., Donahue, P.R., Poss, M.L., 1989, FeLV-FAIDS-induced immunodeficiency syndrome in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21, 25-37.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999, Retroviridae, In: Murphy, F., Gibbs, EPJ, Horzinek, MC, Studdert, MJ (Ed.) *Veterinary Virology*. Academic Press, San Diego, pp. 363-369.

- Neil, J.C., Hughes, D., McFarlane, R., Wilkie, N.M., 1984, Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. *Nature* 308, 814-820.
- Nermut, M.V., Fassati, A., 2003, Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *J. Virol.* 77, 8196-8206.
- Niman, H.L., Gardner, M.B., Stephenson, J.R., Roy- Burman, P., 1977a, Endogenous RD-114 virus genome expression in malignant tissues of domestic cats. *J. Virol.* 23, 578-596.
- Niman, H.L., Stephenson, J.R., Gardner, M.B., Roy- Burman, P., 1977b, RD-114 and feline leukemia virus genome expression in natural lymphomas of domestic cats. *Nature* 266, 357-360.
- Niman, H.L., Akhavi, M., Gardner, M.B., Stephenson, J.R., Roy- Burman, P., 1980, Differential expression of two distinct endogenous retrovirus genomes in developing tissues of the domestic cat. *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 587-594.
- Nishigaki, K., Okuda, M., Endo, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1997, Structure and function of the long terminal repeats of feline leukemia viruses derived from naturally occurring acute myeloid leukemias in cats. *J. Virol.* 71, 9823-9827.
- Nishigaki, K., Hanson, C., Thompson, D., Yugawa, T., Hisasue, M., Tsujimoto, H., Ruscetti, S., 2002, Analysis of the disease potential of a recombinant retrovirus containing Friend murine leukemia virus sequences and a unique long terminal repeat from feline leukemia virus. *J. Virol.* 76, 1527-1532.
- Nisole, S., Saib, A., 2004, Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 9.
- Noronha, F., Post, J.E., Norcross, N.L., Rickard, C.G., 1972, Induction of group-specific (interspecies) antibodies in a cat by immunization with disrupted feline leukemia virus. *Nature* 235, 14-15.

- Novotny, M.J., Hogan, P.M., Flannigan, G., 1994, Echocardiographic evidence for myocardial failure induced by taurine deficiency in domestic cats. *Can. J. Vet. Res.* 58, 6-12.
- Ogilvie, G.K., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 1988, Clinical and immunologic aspects of FeLV-induced immunosuppression. *Vet. Microbiol.* 17, 287-296.
- Okabe, H., Gilden R.V., Hatanaka, M., 1973, Extensive homology of RD114 virus DNA with RNA of feline cell origin. *Nature New Biol.* 244, 54-56.
- Okabe, H., DuBuy, J., Gilden R.V., M.B., G., 1978, A portion of the feline leukaemia virus genome is not endogenous in cat cells. *Int. J. Cancer* 22, 70-78.
- Olsen, R.G., Lewis, M.G., Lafrado, L.J., Mathes, L.E., Haffer, K., Sharpee, R., 1987, Feline leukemia virus: current status of the feline induced immune depression and immunoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 6, 243-260.
- Orosz, C.G., Zinn, N.E., Olsen, R.G., Mathes, L.E., 1985a, Retrovirus-mediated immunosuppression I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behavior by inducing hyporesponsiveness to lymphokines. *J. Immunol.* 134, 3396-3403.
- Orosz, C.G., Zinn, NE, Olsen, RG, Mathes, LE, 1985b, Retrovirus-mediated immunosuppression II. FeLV-UV alters in vitro murine T lymphocyte behavior by reversibly impairing lymphokine secretion. *J Immunol* 135, 583-590.
- Overbaugh, J.N., Riedel, N., Hoover, E.A., Mullins, J.I., 1988, Transduction of endogenous envelope genes by feline leukaemia virus in vitro. *Nature* 332, 731-734.
- Pacitti, A.M., Jarrett, O., 1985, Duration of the latent state in feline leukemia virus infections. *Vet. Rec.* 117, 472-474.
- Pacitti, A.M., Jarrett, O., Hay, D., 1986, Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. *Vet. Rec.* 118, 381-384.

- Pacitti, A.M., 1987, Latent feline leukaemia virus infection: a review. *J. Small Anim. Pract.* 28, 1153-1159.
- Pardi, D., Hoover, E.A., Quackenbush, S.L., Mullins, J.I., Callahan, G.N., 1991, Selective impairment of humoral immunity in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 183-200.
- Pedersen, N.C., Theilen, G., Keane, M.A., Fairbanks, L., Mason, T., Orser, B., Chen, C., Allison, C., 1977, Studies of naturally transmitted feline leukemia virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1523-1531.
- Pedersen, N.C., Meric, S.M., Ho, E., Johnson, L., Plucker, S., Theilen, G.H., 1984, The clinical significance of latent feline leukemia virus infection in cats. *Feline Pract.* 14, 32-48.
- Perryman, L.E., Hoover, E.A., Yohn, D.S., 1972, Immunologic reactivity of the cat: Immunosuppression in experimental feline leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 1357-1362.
- Persaud, D., Zhou, Y., Siliciano, J.M., Siliciano, R.F., 2003, Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *J. Virol.* 77, 1659-1665.
- Pinches, M.D., Helps, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Egan, K., Jarrett, O., Tasker, S., 2006, Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Feline Med. Surg.* Epub ahead of print.
- Post, J., Warren, L., 1980, Reactivation of latent feline leukemia virus, In: Hardy, W.J., Essex, M., McClelland, A.J. (Eds.) *Feline Leukemia Virus*. Elsevier North Holland, New York, pp. 151-155.
- Pringle, C.R., 1999, Virus taxonomy-1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch. Virol.* 144, 421-429.

- Quackenbush, S.L., Donahue, P.R., Dean, G.A., Myles, M.H., Ackley, C.D., Cooper, M.D., Mullins, J.I., Hoover, E.A., 1990, Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *J. Virol.* 64, 5465-5474.
- Quigley, J.G., Burns, C.C., Anderson, M.M., Lynch, E.D., Sabo, K.M., Overbaugh, J., Abkowitz, J.L., 2000, Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood* 95, 1093-1099.
- Rabson, A.B., Steele, P.E., Garon, C.F., Martin, M.A., 1983, mRNA transcripts related to full-length endogenous retroviral DNA in human cells. *Nature* 306, 604-607.
- Reinacher, M., 1987, Feline leukemia virus associated enteritis - a condition with features of feline panleukopenia. *Vet. Pathol.* 24, 1-4.
- Reinacher, M., Theilen, G., 1987, Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am. J. Vet. Res.* 48, 939-945.
- Reinacher, M., 1989, Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21, 85-95.
- Reinacher, M., Frese, K., 1991, Untersuchungen zur Glomerulonephritis bei Hund und Katze. *Tierärztl. Prax.* 19, 175-180.
- Reinacher, M., Wittmer, G., Koberstein, H., Failing, K., 1995, Untersuchung zur Bedeutung der FeLV-Infektion für Erkrankungen bei Sektionskatzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 108, 58-60.
- Rice, J.B., Olsen, R.G., 1981, Feline oncovirus-associated cell membrane antigen and feline leukemia virus group-specific antigen expression in bone marrow and serum. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 737-743.

- Riedel, N., Hoover, E.A., Gasper, P.W., Nicolson, M.O., Mullins, J.I., 1986, Molecular analysis and pathogenesis of the feline aplastic anemia retrovirus, feline leukemia virus C-Sarma. *J. Virol.* 60, 242-250.
- Riedel, N., Hoover, E.A., Dornsife, R.E., Mullins, J.I., 1988, Pathogenic and host range determinants of the feline aplastic anemia retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2758-2762.
- Robinson, H.L., Astrin, S.M., Senior, A.M., Salazar, F.H., 1981, Host susceptibility to endogenous viruses: defective, glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections. *J. Virol.* 40, 745-751.
- Roca, A.L., Pecon-Slatery, J., O'Brien, S.J., 2004, Genomically intact endogenous feline leukemia viruses of recent origin. *J. Virol.* 78, 4370-4375.
- Roca, A.L., Nash, W.G., Menninger, J.C., Murphy W.J., O'Brien, S.J., 2005, Insertional polymorphisms of endogenous feline leukemia viruses. *J. Virol.* 79, 3979-3986.
- Rodgers, S.J., Baldwin, C.A., 1990, A serologic survey of Oklahoma cats for antibodies to feline immunodeficiency virus, coronavirus, and *Toxoplasma gondii* and for antigen to feline leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 180-183.
- Rogerson, P., Jarrett, W., Mackey, L., 1975, Epidemiological studies on feline leukaemia virus infection. I. A serological survey in urban cats. *Int. J. Cancer* 15, 781-785.
- Rohn, J.L., Gwynn, S.R., Lauring, A.S., Linenberger, M.L., Overbaugh, J., 1996, Viral genetic variation, AIDS, and the multistep nature of carcinogenesis: the feline leukemia virus model. *Leukemia* 10, 1867-1869.
- Rohn, J.L., Moser M.S., Gwynn, S.R., Baldwin, D.N., Overbaugh, J., 1998, In vivo evolution of a novel, syncytium-inducing and cytopathic feline leukemia virus variant. *J. Virol.* 72, 2686-2696.

- Rojko, J.L., Hoover, E.A., Mathes, L.E., Hause, W.R., Schaller, J.P., Olsen, R.G., 1978, Detection of feline leukemia virus in tissues of cats by a paraffin embedding immunofluorescence procedure. *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 1315-1321.
- Rojko, J.L., Hoover, E.A., Mathes L.E., Olsen, R.G., Schaller, J.P., 1979, Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *J. Natl. Cancer Inst.* 63, 759-765.
- Rojko, J.L., Hoover, E.A., Quackenbush, S.L., Olsen, R.G., 1982, Reactivation of latent feline leukemia virus infection. *Nature* 298, 385-388.
- Rojko, J.L., Olsen, R.G., 1984, The immunobiology of the feline leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6, 107-165.
- Rojko, J.L., Essex, M., Trainin, Z., 1988, Feline leukemia/sarcoma viruses and immunodeficiency. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 31, 57-96.
- Rojko, J.L., Hardy, W.D., Jr., 1994, Feline leukemia virus and other retroviruses, In: Sherding, G. (Ed.) *The Cat: Diseases and clinical management.* Churchill Livingstone, New York.
- Rojko, J.L., Hartke, J.R., Cheney, C.M., Phipps, A.J., Neil, J.C., 1996, Cytopathic feline leukemia viruses cause apoptosis in hemolymphatic cells. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 16, 13-43.
- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., Weber-Rolfs, I., 1992, *PCR: clinical diagnostics and research.* Springer-Verlag, Berlin.
- Roy- Burman, P., 1995, Endogenous *env* elements: partners in generation of pathogenic feline leukemia viruses. *Virus Genes* 11, 147-161.
- Ruckstuhl, N., 2000, DNA-Vakzinierung gegen die FeLV-Infektion mit Interleukin-12 als Adjuvans. *Vet. Med. Diss., Zürich.*

- Ruscetti, S.K., Parks, W.P., 1976, Natural immunity in cats to feline leukemia viral antigens. *J. Immunol.* 117, 2029-2035.
- Russel, P.H., Jarrett, O., 1978, The specificity of neutralizing antibodies to feline leukaemia virus. *Int. J. Cancer* 21, 768-778.
- Sacco, M.A., Howes, K., Smith, L.P., Nair, V.K., 2004, Assessing the roles of endogenous retrovirus EAV-HP in avian leukosis virus subgroup J emergence and tolerance. *J. Virol.* 78, 10525-10535.
- Saiki, R., 1989, The design and optimization of the PCR, In: Erlich, H.A. (Ed.) *PCR Technology*. Stockton Press, New York, pp. 7-16.
- Sarma, P.S., Gilden, R.V., Huebner, R.J., 1971, Complement-fixation test for feline leukemia and sarcoma viruses. *Virology* 44, 137-145.
- Sarma, P.S., Log, T., 1973, Subgroup classification of Feline Leukemia and Sarcoma Viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology* 54, 160-169.
- Schaller, J.P., Olsen, R.G., 1975, Determination of subgroup-specific feline oncornavirus-neutralizing antibody. *Infect. Immun.* 12, 1405-1410.
- Schniewind, A., Reinacher, M., Theilen, G.H., Unger, H., Weiss, E., 1983, Vorkommen von Infektionen mit dem Feline Leukämie-Virus (FeLV) im Raum Gießen und Augsburg. *Kleintierpraxis* 28, 361-370.
- Schrenzel, M.D., Higgins, R.J., Hinrichs, S.H., 1990, Type C retroviral expression in spontaneous feline olfactory neuroblastomas. *Acta Neuropathol.* 80, 547-553.
- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., Bushman, F., 2002, HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-529.

- Schwartz, D., Kipar, A., Köhler, K., Jarrett, O., Reinacher, M., 2001. Demonstration of provirus, transcription and translation of exogenous FeLV sequences by PCR and immunohistology. In: 19th ESVP Meeting, Thessaloniki-Greece, p. 155.
- Sheets, L.S., Rakesh, P., Wen- Cheng, J., Roy- Burman, P., 1993, Recombinant feline leukemia virus genes detected in naturally occurring feline lymphosarcomas. *J. Virol.* 67, 3118-3125.
- Sherr, C.J., Sen, A., Todaro, G.J., Sliski, A., Essex, M., 1978a, Pseudotypes of feline sarcoma virus contain an 85,000-dalton protein with feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA) activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 1505-1509.
- Sherr, C.J., Todaro, G.J., Sliski, A., Essex, M., 1978b, Characterization of a feline sarcoma virus-encoded antigen (FOCMA-S) by radioimmunoassay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 4489-4493.
- Shih, C.C., Stoye, J.P., Coffin, J.M., 1988, Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell* 53, 531-537.
- Shimoda, T., Shiranaga, N., Mashita, T., Hasegawa, A., 2000, Chronic myelomonocytic leukemia in a cat. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 195-197.
- Sninsky, J.J., 1990, The polymerase chain reaction (PCR): a valuable method for retroviral detection. *Lymphology* 23, 92-97.
- Snyder, H.W., Jr., Singhal, M.C., Zuckermann, E.E., Jones, F.R., Hardy, W.D., Jr., 1983, The feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA) is related to, but distinguishable from, FeLV-C gp70. *Virology* 131, 315-327.
- Snyder S.P, Theilen,G.H, 1969, Transmissible feline fibrosarcoma. *Nature* 221, 1074-1075.
- Soe, L.H., Devi, B.G., Mullins, J.I., Roy-Burman, P., 1983, Molecular cloning and characterization of endogenous feline leukemia virus sequences from a cat genomic library. *J. Virol.* 46, 829-840.

- Soe, L.H., Shimizu, R.W., Landoph, J.R., Roy-Burman, P., 1985, Molecular analysis of several classes of endogenous feline leukemia virus elements. *J. Virol.* 56, 701-710.
- Soma, T., Ishii, H., 2004, Detection of feline coronavirus antibody, feline immunodeficiency virus antibody, and feline leukemia virus antigen in ascites from cats with effusive feline infectious peritonitis. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 89-90.
- Sommerfelt, M.A., Weiss, R.A., 1990, Receptor interference groups of 20 retroviruses plating on human cells. *Virology* 176, 58-69.
- Sparkes, A.H., 2003, Feline leukaemia virus and vaccination. *J. Feline Med. Surg.* 5, 97-100.
- Stewart, M.A., Forrest, D., McFarlane, R., Onions, D., Wilkie, N., Neil, J.C., 1986a, Conservation of the c-myc coding sequence in transduced feline v-myc genes. *Virology* 154, 121-134.
- Stewart, M.A., Warnock, M., Wheeler, A., Wilkie, N., Mullins, J.I., Onions, D.E., Neil, J.C., 1986b, Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J. Virol.* 56, 701-710.
- Stiff, M.I., Olsen, R.G., 1983, Effects of retrovirus protein on the feline one-way mixed leukocyte reaction. *J. Gen. Virol.* 64, 957-959.
- Stiles, J., Bienzle, D., Render, J.A., Buyukmihci, N.C., Johnson, E.C., 1999, Use of nested polymerase chain reaction (PCR) for detection of retroviruses from formalin-fixed, paraffin-embedded uveal melanomas in cats. *Vet. Ophthalmol.* 2.
- Sukura, A., Salminen, T., Lindberg, L.A., 1992, A survey of FIV antibodies and FeLV antigens in free-roaming cats in the capital area of Finland. *Acta Vet. Scand.* 33, 9-14.
- Suzuki, Y., Yang, H., Craigie, H., 2004, LAP2alpha and BAF collaborate to organize the Moloney murine leukemia virus preintegration complex. *EMBO J.* 23, 4670-4678.

- Svoboda, J., Popovic, M., Sainerova, H., Mach, O., Shoyab, M., Baluda, M.A., 1977, Incomplete viral genome in a non-virogenic mouse tumour cell line (RVP3) transformed by Prague strain of avian sarcoma virus. *Int. J. Cancer.* 19, 851-858.
- Svoboda, J., Hejnar, J., Geryk, J., Elleder, D., Vernerova, Z., 2000, Retroviruses in foreign species and the problem of provirus silencing. *Gene* 261, 181-188.
- Swain, A., Coffin, J.M., 1992, Mechanism of transduction by retroviruses. *Science* 255, 841-845.
- Swenson, C.L., Kociba, G.J., Mathes, L.E., Hand, P.J., Neer, C.A., Hayes, K.A., Olsen, R.G., 1990, Prevalence of disease in nonviremic cats previously exposed to feline leukemia virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 1049-1052.
- Swenson, C.L., Kociba, G.J., O'Keefe, D.A., Crisp, M.S., Jacobs, R.M., Rojko, J.L., 1987, Cyclic hematopoiesis associated with feline leukemia virus infection in two cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191, 93-96.
- Taylor, C.S., Willett, B.J., Kabat, D., 1999, A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J. Virol.* 73, 6500-6505.
- Takeuchi, Y., Vile, R.G., Simpson, G., O'Hara, B., Collins, M.K.L., Weiss, R.A., 1992, Feline Leukemia Virus subgroup B uses the same cell surface receptor as Gibbon Ape Leukemia Virus. *J. Virol.* 66, 1219-1222.
- Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, M.A., Meli, M.L., Golder, M.C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2005, Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 130, 124-136
- Theilen, G.H., Kawakami, T.G., Rush, J.D., Munn, R.J., 1969, Replication of cat leukaemia virus in cell suspension cultures. *Nature* 222, 589-590.

- Theilen, G.H., 1984, Klinische Aspekte der Infektion mit dem Felinen Leukosevirus bei der Katze. Tierärztl. Prax. 12, 511-522.
- Tobey, J.C., Houston, D.M., Breur, G.J., Jackson, M.L., Stubbington, D.A., 1994, Cutaneous T-cell lymphoma in a cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204, 606-609.
- Todaro, G.J., Benveniste, R.E., Sherwin, S.A., Sherr, C.J., 1978, MAC-1, a new genetically transmitted type C virus of primates: "low frequency" activation from stump-tail monkey cell cultures. Cell 13, 775-782.
- Tompkins, M.B., Ogilvie, G.K., Gast, A.M., Franklin, R., Weigel, R., Tompkins, W.A.F., 1989, Interleukin-2 suppression in cats naturally infected with feline leukemia virus. J. Biol. Response Mod. 8, 86-96.
- Tompkins, M.B., Nelson, P.D., English, R.V., Novotney, C., 1991, Early events in the immunopathogenesis of feline retrovirus infections. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 1311-1315.
- Tonelli, Q.J., 1991, Enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 1336-1339.
- Torres, A.N., Mathiason, C.K., Hoover, E.A., 2005, Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. Virology 332, 272-283.
- Toth, S.R., Onions, D.E., Jarrett, O., 1986, Histopathological and hematological findings in myeloid leukemia induced by a new feline leukemia virus isolate. Vet. Pathol. 23, 462-470.
- Trainin, Z., Wernicke, D., Ungar-Waron, H., Essex, M., 1983, Suppression of the humoral antibody response in natural retrovirus infections. Science 220, 858-859.
- Trimborn, A., 1990, Altersmultimorbidität der Katze - eine prospektive Studie. Vet. Med. Diss., Gießen.

- Tsatsanis, C., Fulton, R., Nishigaki, K., Tsujimoto, H., Levy, L., Terry, A., Spandidos, D., Onions, D., Neil, J.C., 1994, Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: Patterns of proviral insertion and gene rearrangement. *J. Virol.* 68, 8296-8303.
- Tsujimoto, H., Fulton, R., Nishigaki, K., Matsumoto, Y., Hasegawa, A., Tsujimoto, A., Cevario, S., O'Brien, S.J., Terry, A., Onions, D., Neil, J.C., 1993, A common proviral integration region, fit-1, in T-cell tumors induced by myc-containing feline leukemia viruses. *Virology* 196, 845-848.
- Tyler, R.D., Cowell, R.L., Meinkoth, J.H., 1999, Bone marrow, In: Cowell, R.L., Tyler, R.D., Meinkoth, J.H. (Eds.) *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*. Mosby, Inc., St. Louis, pp. 284-304.
- Ueland, K., Lutz, H., 1992, Prevalence of feline leukemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in Norway. *Zentralbl. Veterinarmed.* B 39, 53-58.
- Uthmann, A., Moestl, K., Zetner, K., Steurer, I., Tschachler, E., 1996, Detection of sequences of feline leukemia virus in chronically inflamed oral tissue of FeLV-non-viremic cats by using polymerase chain reaction. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 83, 195-198.
- Vail, D.M., Moore, D.S., Ogilvie, G.K., Volk, L.M., 1998, Feline lymphoma (145 cases): Proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 349-354.
- Van der Kuyl, A.C., Dekker, J.T., Goudsmit, J., 1999, Discovery of a new endogenous Type C retrovirus (FcEV) in cats: evidence for RD-114 being an FcEV(gag-pol)/Baboon endogenous virus BaEV(env) recombinant. *J. Virol.* 73, 7994-8002.

- Van Groningen, J.J., Van den Ouweland, A.M., Verbeek, J.S., Van der Kemp, A.W., Bloemers, H.P., Van de Ven, W.J., 1987, Structural analysis of a variant clone of Snyder-Theilen feline sarcoma virus. *Virus Res.* 8, 349-361.
- Vedbrat, S.S., Rasheed, S., Lutz, H., Gonda, M.A., Ruscetti, S., Gardner, M.B., Prenskey, W., 1983, Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: A viral and not a cellularly coded transformation-specific antigen of cat lymphomas. *Virology* 124, 445-461.
- Vobis, M., D'Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., 2003, Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitol. Res.* 91, 467-470.
- Weijer, K., Calafat, J., Daams, J.H., Hageman, P.C., Misdorp, W., 1974, Feline malignant mammary tumors. II. Immunologic and electron microscopic investigations into a possible viral etiology. *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 673-679.
- Weiss, E., 1999, Verdauungsorgane, In: Dahme, E., Weiss, E. (Ed.) *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 127-196.
- Wernicke, D., Trainin, Z., Ungar-Waron, H., Essex, M., 1986, Humoral immune response of asymptomatic cats naturally infected with feline leukemia virus. *J. Virol.* 60, 669-673.
- Wittmer, G., 1993, Statistische Untersuchungen zur Infektion mit dem Felinen Leukämievirus (FeLV) bei Sektionskatzen. *Vet. Med. Diss.*, Giessen.
- Wright, K.A., Dezutti, C.S., Lewis, M.G., Olsen, R.G., 1989, FeLV-induced immunosuppression through alterations in signal transduction: Changes in intracellular free calcium levels. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21, 47-53.
- Yamamoto, J.K., Ho, E., Pedersen, N.C., 1986, A feline retrovirus induced T-lymphoblastoid cell-line that produces an atypical alpha type of interferon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11, 1-19.

- Yilmaz, H., Ilgaz, A., Harbour, D.A., 2000, Prevalence of FIV and FeLV infections in cats in Istanbul. *J. Feline Med. Surg.* 2, 69-70.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D., Oroszlan, S., 1985, Translational readthrough of an amber termination codon during synthesis of feline leukemia virus protease. *J. Virol.* 55, 870-873.
- Youngren, S.D., Vukasin, A.P., de Noronha, F., 1984, Characterization of monoclonal antibodies directed against the envelope proteins of feline leukemia virus. *Cancer Res.* 44, 3512-3517.
- Yuan, B., Li, X., Goff, S.P., 1999, Mutations altering the Moloney murine leukemia virus p12 gag protein affect virion production and early events of the virus life cycle. *EMBO J.* 18, 4700-4710.
- Yueh, A., Goff, S.P., 2003, Phosphorylated serine residues and an arginine-rich domain of the Moloney murine leukemia virus p12 protein are required for early events of viral infection. *J. Virol.* 77, 1820-1829.

8. Anhang

8.1 Bezugsquellen für Chemikalien, Geräte, Einmalartikel und Kits

Amersham Biosciences, Freiburg

GeneQuant 2, Spektralphotometer

Percoll™

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Rotina 48 RC

Tischzentrifuge Universal 16

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Kühl-Thermostat Frigomix® 1496, Thermomix® 1480

BioRAD-Laboratories, USA

GS Gene Linker® UV-Chamber

Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf

1,5 ml Mikrozentrigugengefäße, RNase-frei, DNase-frei

Multicycler PTC 200

Plastik-Einmalpipettenspitzen SafeSeal-Tips®, RNase-frei, DNase-frei

bis 10 µl

20 µl

100 µl

200 µl

1000 µl

Reaktionsgefäße, ultradünn 0,2 ml, PCR SoftTubes Flachdeckel,

Cambrex Bio Science Rockland Inc., USA

SeaKem® LE Agarose

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Aluminiumfolie (30 μ , 500 mm, 100 m)

Ammoniak 25 %

Ampicillin (Natrium-Salz) > 99 %

Borsäure (> 99,8 %)

DNA-Marker pUC 19/MSP I

DNA-Marker Lambda Hind III

Eosin

Ethanol (Rotipuran®) > 99,8 % (Molekularbiologie)

Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml)

Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA, MW 372,24)

Formaldehyd 37 % (stabilisiert mit 10 % Methanol)

Methanol > 99,8 %

Microcentrifuge SD

Natriumchlorid (NaCl) > 99,5 %

Nitrilhandschuhe N-Dex®

2-Propanol (Isopropanol, Rotipuran®) > 99,7 % (Molekularbiologie)

Tryptone

Xylencyanol

Xylol

Xylol-Ersatz (Roti-Histol®)

Consort, Belgien

Microcomputer Electrophoresis Power Supply

Eastman Kodak Inc., USA

1D Image Analysis Software Windows Version 3.0

Electrophoresis Documentation and Analysis System 120

Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorfzentrifuge 5415 C

Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard/Bulk 0,1-10 µl

Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 100-5000 µl

Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 2,5 ml

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm

3,3' Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)

Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Imidazol

Isopentan (2-Methylbutan)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Gentra Systems Inc., Minneapolis, USA

Puregene® DNA Purification (from cells, tissue, body fluids and Gram-negative bacteria) Kit

RBC Lysis Solution

Gesellschaft für Labortechnik (GFL®), Großburgwedel

GFL-Paraffin-Streckbad 1052

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Gewebekulturschalen Cellstar® 35/10 mm und 60/15 mm, steril

Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kehlheim

Magnetrührer MR 3001 K

Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Begasungsbrutschrank Function line™, Typ B5060 EK CO₂

Labofuge 400

Sicherheitswerkbank LB 48 C (Heraeus Laminair®)

H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim

Varioklav Tischsterilisator Typ 25 T

Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe,

DH5α™ Subcloning Efficiency™ Chemically Competent E.coli

pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Cloning Kit

S.O.C. Medium

Iwaki/Braxel Scitech Div.Asahi Techno Glass, Japan

Zell-/Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit abgewinkelttem Halsstück und gasdurchlässigem Bakterien-/Viren-Filtereinsatz (vent cap), 75 cm².

Jake und Kunkel GmbH & Co KG

IKA Minishaker MS 1

Magnetrührer IKAMAG KMO 2+

Keutz, Reiskirchen

Flachgelelektrophoresekammer „Midi“, horizontal

Gießvorrichtung

Kreatech Diagnostics, Amsterdam, NL (Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg)

Target Unmasking Fluid® 3x (TUF®)

Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main

Coverplates™

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Nucleo Spin® Plasmid DNS Aufreinigungskit

MAGV GmbH, Rabenau-Londorf

Waage Ohaus C305

Menzel Gläser, Braunschweig

SuperFrost®/Plus-Objektträger

StarFrost®-Objektträger

Merck KGaA, Darmstadt

D-Glukose

HCl 1N (Titrisol® für 1000ml)

NaCl krist.

NaOH 1N (Titrisol® für 1000ml)

Papanicolaou-Lösung 1b

Wasserstoffperoxid 30 % (Perhydrol®)

Mettler-Toledo GmbH, CH

Präzisionswaage AE 100

Präzisionswaage PM 4600 Delta Range

Präzisionswaage Typ B 3001

Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf

Rotationsmikrotom HM 335 E

Millipore Corporation, USA

Milli®-Q UF Plus

NatuTec GmbH, Frankfurt

BioTherm™ DNA Polymerase

BioTherm™ 10x Puffer (15mM MgCl₂)

Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg

Umkehrmikroskop IX 70

PAA-Laboratories, Cölbe

Fetales Kälberserum (FKS)

Penicillin/Streptomycin (P/S)

RPMI 1640 1x

PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

peqGOLD dNTP-Set 4 x 100 µmol (je 100 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

Privileg, Quelle, Gießen

Mikrowellengerät 7020

Radiometer A/S, Dänemark

Elektrode GK2301 C

Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, NL

Tissue Tek® O. C. T. Compound

Sarstedt AG & CO

Pipettenspitzen 1000 µl, blau

Pipettenspitzen 200µl, gelb

Schott-Geräte GmbH, Hofheim a.Ts.

Digital-pH-Meter CG 820

Serva, Heidelberg

Hefenextrakt

Shimadzu Corporation, Japan

UV-1202® Spektralphotometer

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Agar für die Mikrobiologie

REDTaq® ReadyMix-PCR-Mix

Stockmeyer Chemie Dillenburg

Ethanol

Tecnomara AG, Zürich, CH

Fireboy

Pipetboy

Pipettenstopfgerät Modell Tecnoplug 80

TPP, Trasadingen, CH

Petrischalen 60,1 cm²

H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim

Varioklav Tischsterilisator Typ 25 T

Vilber Lourmat, Torcy FR

UV-Transilluminator 254 nm

Vogel GmbH & Co., Gießen

Paraffin (Granulat), Schmelzpunkt 56-58°C

Willi Memmert, Fabrik für Laboratoriumsgeräte, Schwabach

Memmert-Trockensterilisator

Wasserbad WB 10

8.2 Lösungen und Puffer

8.2.1 Gelelektrophoretische Detektion der PCR-Produkte

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, pH 8,0)

Stammlösung (10x TBE)

108,8 g Tris(hydroxy)methylaminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83)

40 ml 0,5 M EDTA-Na₂ (MW 372,24)

Aqua dest. ad 1000 ml

autoklavieren

Lagerung bei Raumtemperatur

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen

Ethidiumbromid-imprägniertes Agarose-TBE-Gel

100 ml 1x TBE

1, 2,5 g bzw. 3 g Agarose

Aufkochen der Agarose in 1x TBE in der Mikrowelle bis sie sich vollständig gelöst hat, auf ca. 65-70°C abkühlen lassen und 2 µl Ethidiumbromidlösung zugeben (MW 394,3; 10 mg/ml) dazu geben und mischen. Flüssige Agarose in die Plexiglasform blasenfrei ausgießen und beide Kämme mit 20 Slots im Rahmen befestigen. Vor Gebrauch mindestens 1 h lang erstarren lassen. Luftdichte Lagerung der fertigen Gele für max. 1 Woche bei 4°C.

Xylencyanol-Farbstofflösung zur Agarosegelelektrophorese

1,5 ml Percoll™ (Amersham Biosciences, Freiburg)

25 mg Xylencyanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Aqua dest. ad 10 ml

8.2.2 Klonierung**Luria Bertani (LB)-Medium**

10 g Tryptone

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

950 ml Aqua bidest.

pH mit 1N NaOH auf 7,0 einstellen und mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen. 20 Minuten bei 120°C und 15 psi autoklavieren. Die autoklavierte Lösung auf 55°C abkühlen lassen und 100 µg/ml Ampicillin hinzufügen. Aliquots von je 100 ml bei 4°C bis zur weiteren Verwendung (max. 3 Tage) lagern.

Luria Bertani (LB)-Agar

10 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
15 g Agar
950 ml Aqua bidest.

pH mit 1N NaOH auf 7,0 einstellen und mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen. 20 Minuten bei 120°C und 15 psi autoklavieren. Die autoklavierte Lösung auf 55°C abkühlen lassen und 100 µg/ml Ampicillin hinzufügen. In sterile Petrischalen gießen, erstarren lassen und die Petrischalen anschließend bei 4°C bis zur weiteren Verwendung (max. 3 Tage) lagern.

8.2.3 Immunhistologie**Fixation**

Stammlösung 37 % Formaldehyd (Formalin, stabilisiert mit 10 % Methanol)
1:10 verdünnen mit Leitungswasser: 3,7-4,0 % Formaldehyd (10 % Formalin)

Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung (10x):
60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
610 ml Aqua dest.
390 ml HCl 1N
Gebrauchslösung:
100 ml Stammlösung
900 ml 0,8 % (in Aqua dest.)
Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit 0,1 N HCl oder 1 N NaOH.

TUF®

Target Unmasking Fluid®; dient der Demaskierung der Epitope im histologischen Schnitt
Stammlösung 1:3 in aqua bidest.

Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,1)

6,81 g Imidazol

ad 1000 ml aqua dest.

Zugeben von 500 ml 0,1 N HCl.

Einstellen des pH-Wertes mit 0,1 N HCl oder 1 N NaOH.

DAB-Lösung

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer). Unmittelbar vor Gebrauch 30 % H₂O₂ (Perhydrol®) zugeben.

Gegenfärbung

Papanicolaou 1b-Lösung und Aqua bidest im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren.

8.2.4 Gewebekultur**Kultivierungsmedium**

445 ml RPMI 1640

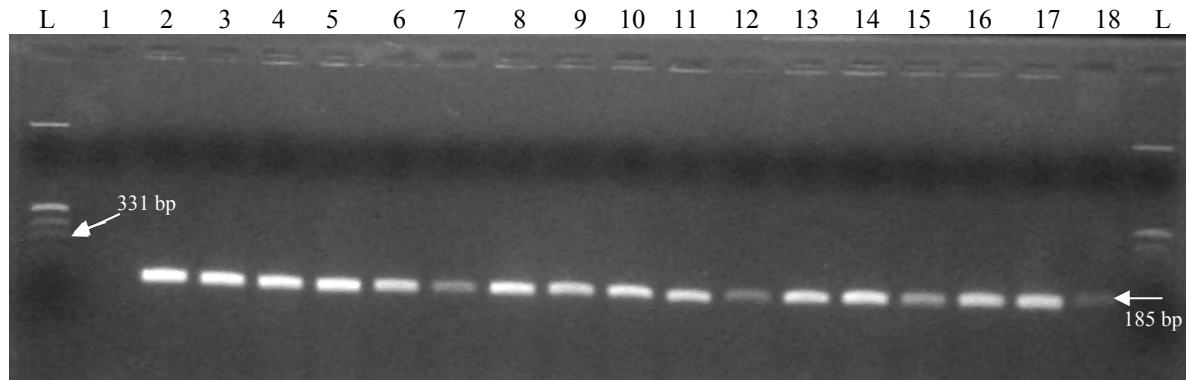
50 ml FKS

5 ml Penicillin/Streptomycin

Lagerung 4°C für max. 4 Wochen

9. Abbildungen

Abbildung 9.1: U3-spezifische PCR zum Nachweis erfolgreich transformierter E.coli (Koloniescreening)

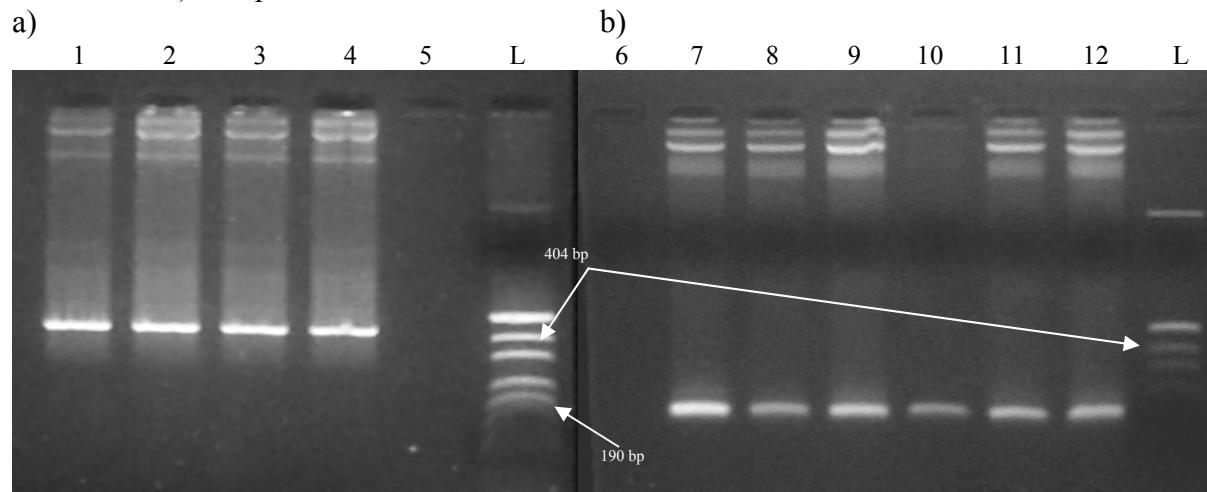


L	pUC19/MSP I
1	Wasserkontrolle
2-17	Bakteriensuspensionen (transformierte E. coli-Kolonien)
18	Positivkontrolle (FL74-Zellen)

Abbildung 9.2: Screening der Plasmid-DNS vor der Sequenzierung

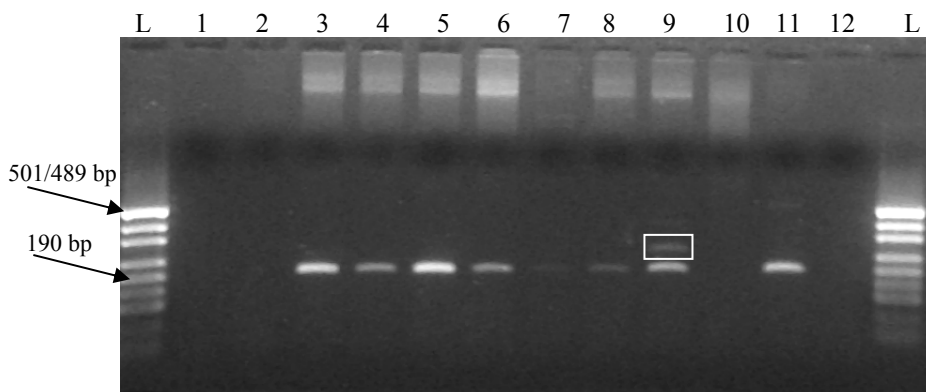
a) T7/BGH-PCR zum Nachweis eines Inserts von ca. 200 bp im transformierten Plasmid

b) U3-spezifische PCR zum Nachweis von U3 im transformierten Plasmid



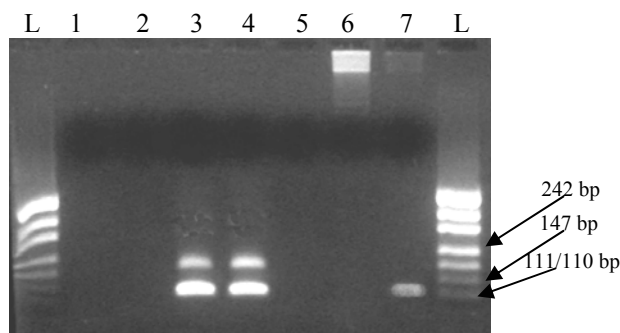
L	pUC19/MSP I
1-4	isolierte Plasmid-DNS (T7/BGH-PCR)
5+6	Wasserkontrolle
7-9; 11-12	isolierte Plasmid-DNS (U3-PCR)
10	Positivkontrolle (FL74-Zellen)

Abbildung 9.3: U3-PCR, 1. Reaktion, experimentell FeLV-infizierte Katzen und eine Sektionskatze

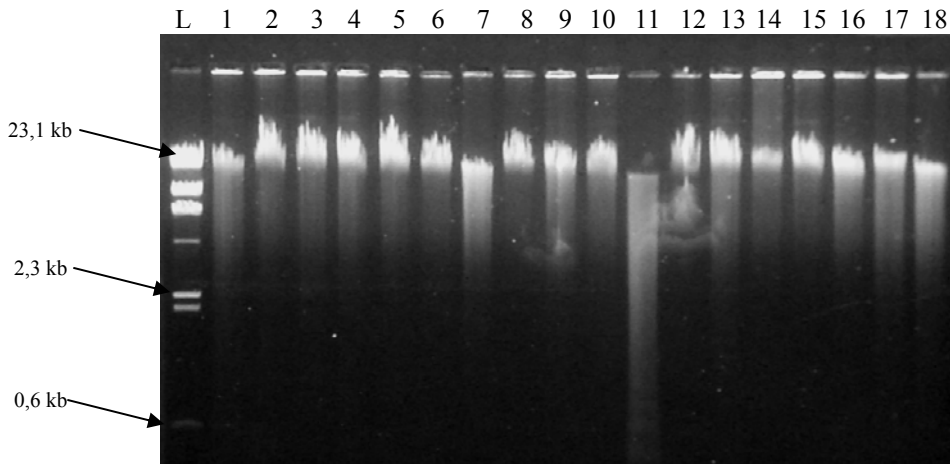


- L pUC19/MSP I
 1 Wasserkontrolle 1
 2 Negativkontrolle (Rind)
 3 Tier 232 (immunhistologisch und ELISA FeLV-negative Katze nach experimenteller Infektion)
 4 Tier 169 (immunhistologisch und ELISA FeLV-negative Katze nach experimenteller Infektion)
 5 Tier 157 (immunhistologisch und ELISA FeLV-positive Katze nach experimenteller Infektion)
 6 Tier 181 (immunhistologisch und ELISA FeLV-negative Katze nach experimenteller Infektion)
 7 Tier 159 (immunhistologisch und ELISA FeLV-negative Katze nach experimenteller Infektion)
 8 Tier 224 (immunhistologisch und ELISA FeLV-negative Katze nach experimenteller Infektion)
 9 Tier S1414/02 (latent infizierte Sektionskatze; „positive“ Bande bei ca. 190 bp, weitere Bande bei ca. 250 bp (weißer Kasten; siehe Kapitel 4.4.2.2., S. 69 und Kapitel 5.1, S. 94))
 10 Negativkontrolle (FE-Zellen)
 11 Positivkontrolle (FL74-Zellen)
 12 Wasserkontrolle 2

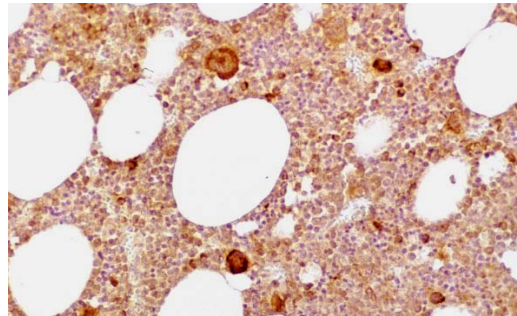
Abbildung 9.4: U3-PCR, 2. Reaktion (seminested), Tier 159 und 224 aus 1. Reaktion



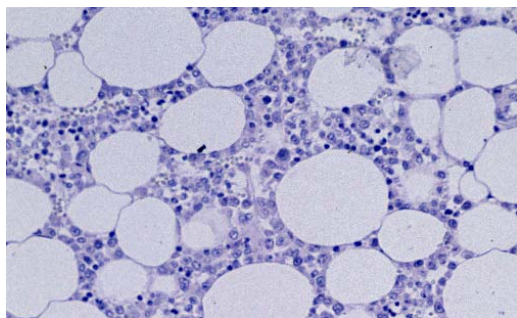
- L pUC19/MSP I
 1 Wasserkontrolle (PCR-Ansatz 1:1000 aus 1. Reaktion)
 2 Negativkontrolle (PCR-Ansatz 1:1000 aus 1. Reaktion)
 3 Tier 159 (PCR-Ansatz 1:1000 aus 1. Reaktion); „positive“ Bande bei ca. 110 bp, zusätzliche Bande auf Höhe von ca. 190 bp (entspricht „positiver“ Bande der 1. Reaktion)
 4 Tier 224 (PCR-Ansatz 1:1000 aus 1. Reaktion); „positive“ Bande bei ca. 110 bp, zusätzliche Bande auf Höhe von ca. 190 bp (entspricht „positiver“ Bande der 1. Reaktion)
 5 Wasserkontrolle
 6 Negativkontrolle (Rind)
 7 Positivkontrolle (FL74-Zellen)

Abbildung 9.5: DNS-Degradation bei unterschiedlichen Erhaltungszuständen

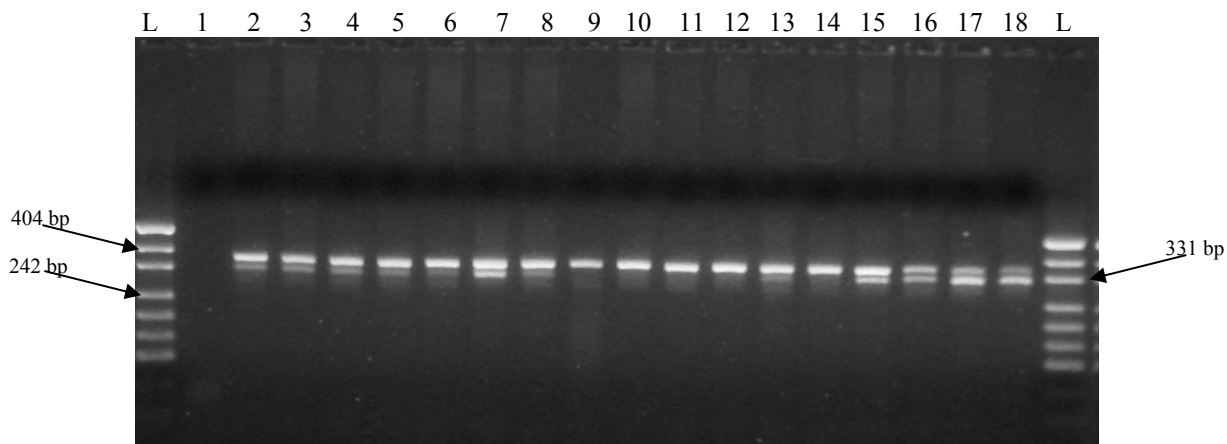
L	λ Hind III
1, 9, 11, 16	fortgeschritten faul und autolytisch
3, 4, 5, 6, 10, 14	nicht mehr frisch
8, 15	frisch
7, 17, 18	gefroren

Abbildung 9.6: FeLV-Immunhistologie (kombinierter Nachweis von gp70 und p27)
Vergleich positiver und negativer Ergebnisse bei der Auswertung von Knochenmark

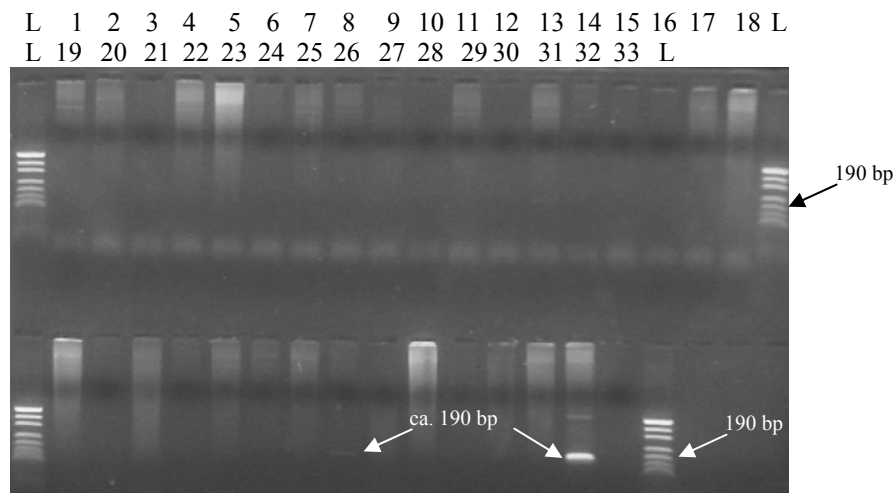
positive FeLV-
Immunhistologie (gp70
und p27), Knochenmark,
(S948/03), Obj. x 20.



negative FeLV-
Immunhistologie
(gp70 und p27),
Knochenmark,
(S2137/02), Obj. x 20.

Abbildung 9.7.: DNS-Test zum Nachweis der Amplifizierbarkeit der DNS (gp70-PCR)

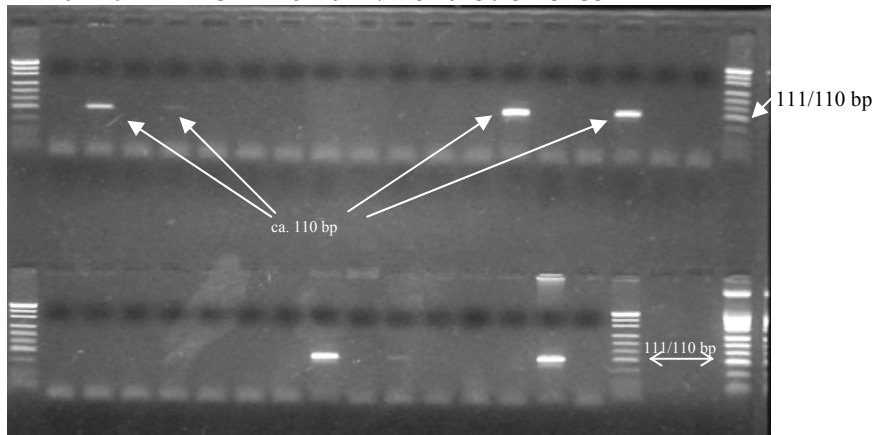
L pUC19/MSP I
 1 Wasserkontrolle
 2-18 DNS aus Knochenmark immunhistologisch FeLV-positiver Katzen. Man erkennt z. T. Doppelbanden als Nachweis von FeLV C und/oder einer exogenen Infektion mit FeLV A

Abbildung 9.8: U3-PCR Sektionskatzen, 1. Reaktion

L pUC19/MSP I
 1 Negativkontrolle (Rind)
 2-31 DNS Knochenmark (Sektionskatzen)
 32 Positivkontrolle (FL74-Zellen)
 33 Wasserkontrolle

Abbildung 9.9: U3-PCR Sektionskatzen, 2. Reaktion (seminested)

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 L
 L 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 L x x L1



- L pUC19/MSP I
 1 Negativkontrolle (Rind) aus 1. Reaktion (1:1000)
 2-31 PCR-Ansatz (Sektionskatzen) aus 1. Reaktion (1:1000)
 32 Positivkontrolle (FL74-Zellen)
 33 Wasserkontrolle aus 1. Reaktion (1:1000)
 x leere Slots
 L1 pUC19/MSP I (eigene Herstellung)

10. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
aqua bidest.	aqua bidestillata
aqua dest.	aqua destillata
BaEV	Baboon endogenous retrovirus
bp	Basenpaare (base pairs)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CA	Kapsid
CD 4/CD 8	Cluster of differentiation 4/8
cDNS	komplementäre DNS
DAB	3, 3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
d. p. i.	day(s) post infection
ds	double stranded (Doppelstrang)
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>env</i>	Envelopegen
et al.	und andere
FeLV	Felines Leukämievirus
FeSFV	Felines Syncytium Forming Virus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FFV	Felines Foamy Virus
FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
FIV	Felines Immundefizienzvirus
FKS	Fetales Kälberserum
FOCMA	Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen

G	Guanin
<i>gag</i>	Gen kodierend für gruppenspezifisches Antigen
gp70/85	Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 70000/ 85000 Dalton (FeLV-Hüllprotein)
Hess.	Hessisch
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IF	Immunfluoreszenz
IgG-PO	Immunglobulin-G-gekoppelt mit Peroxidase
IL-2	Interleukin 2
IN	Integrase
IPO	Indirekte Peroxidase-Methode
LB	Luria Bertani
LTR	Long terminal repeat
MA	Matrixprotein
<i>mdr</i>	multi drug resistance
MuLV	Murines Leukämievirus
NC	Nukleokapsid
neg.	negativ
p15E	Protein mit einem Molekulargewicht von 15000 Dalton (FeLV-Hüllprotein)
p27	Protein mit einem Molekulargewicht von 27000 Dalton (FeLV-Coreprotein)
pbs	primer binding site
PIC	pre integration complex
ppt	poly purine tract
pr180 ^{gag-pol} /pr65 ^{gag}	Vorläuferpolyproteine mit 180000/65000 Dalton
RBC	red blood cell lysis
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>pol</i> /POL	Polymerasegen/Polymerase
PRO	Protease
RNS	Ribonukleinsäure
RR	Relatives Risiko
RT	Reverse Transkriptase

RTC	reverse transcription complex
SS	Schweineserum
ss	single stranded (Einzelstrang)
SU	Surface protein
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TM	Transmembrane protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
TUF	Target unmasking fluid
U3/U5	unique 3/unique 5

Danksagung

Ohne die Hilfe vieler Menschen wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen. Daher möchte ich hier die Gelegenheit nutzen, mich zu bedanken.

Danke Herrn Prof. Dr. M. Reinacher für die freundliche Überlassung des Themas sowie die fachliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Danke Dr. Werner Hecht für das immer offene Ohr, die Hilfestellung in Fragen der Molekularbiologie und die stets zum Nachdenken anregenden Gespräche.

Danke Dr. Failing und Frau Sparenberg für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Danke an das gesamte „Stallteam“ und Anette Artelt für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Dr. Robert Kreuzer, einem tollen Kollegen.

Danke an alle Mitarbeiter für die trotz aller Arbeit und zeitweisem Frust sehr schöne Zeit am Institut für Veterinär-Pathologie, für die Gelassenheit und die Nachsicht im Umgang mit meinen Eigenheiten.

Danke Dr. Dr. Hetzel für Guns´n´Roses zwischen 22:30 Uhr und Mitternacht.

Danke Dr. Köhler für die stetige Motivation. Sport frei!

Danke an alle Musiker dieser Welt. Sie machen das Leben erträglich.

Danke Silke mit Familie. Bei Euch fühle ich mich immer willkommen und kann den Alltag vergessen.

Danke Juliane.

Danke Eva.

Danke meinen Eltern Ingeborg und Aribert dafür, dass sie immer da sind, wenn man sie braucht, für ihr Interesse am Fortgang der Arbeit und die moralische Unterstützung.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5172-6



9 783835 951723 