

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014 - 2015

Systemische coronavirusinfecties bij carnivoren
door
Joris Props

Promotoren: Dr. Lowiese Desmarets
Prof. Dr. Hans Nauwynck

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

© 2015 Joris Props

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014 - 2015

Systemische coronavirusinfecties bij carnivoren
door
Joris Props

Promotoren: Dr. Lowiese Desmarets
Prof. Dr. Hans Nauwynck

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

© 2015 Joris Props

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden. Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef

Voorwoord

Graag wil ik hier gebruik maken om mijn dank te betuigen aan mijn promotor Dr. Lowiese Desmarets en copromotor Prof. Dr. Hans Nauwynck voor hun begeleiding bij het eerste deel van mijn masterproef. Dit onderwerp sluit mooi aan bij mijn recent afgelopen 'Honours Programme in Life Sciences: breaking frontiers' dat handelde over de pathogenese van het felien enterisch coronavirus, vandaar mijn interesse om dit onderwerp verder uit te breiden naar andere carnivoren.

Inhoudstafel

Samenvatting.....	1
Inleiding.....	2
Literatuurstudie.....	3
1 Morfologie van coronavirussen	3
2 Felien enterisch coronavirus (FECV)/Feliene infectieuze peritonitis virus (FIPV)	5
2.1 Pathogenese en epizoötiologie	6
2.1.1 FECV infectie.....	6
2.1.2 FIPV infectie	6
2.2 Letsels en symptomen	9
2.2.1 Vochtige of effusieve FIP	10
2.2.2 Droge of niet-effusieve FIP.....	11
2.3 Diagnose	14
2.3.1 FECV infectie.....	14
2.3.2 FIPV infectie	14
2.3.2.1 Indirecte testen.....	14
2.3.2.2 Directe testen	16
2.4 Behandeling.....	18
2.5 Vaccinatie en management.....	18
3 Canien coronavirus.....	19
3.1 Pathogenese en epizoötiologie	20
3.1.1 Canien coronavirus: enterische vorm	20
3.1.2 Canien coronavirus: pantropische vorm	21
3.1.3 Canien coronavirus: respiratoire vorm.....	21
3.2 Symptomen	21
3.2.1 Canien coronavirus: enterische vorm	21
3.2.2 Canien coronavirus: pantropische vorm	21
3.3 Diagnose	22
3.4 Behandeling	23
4 Fret coronavirus	24
4.1 Pathogenese en letsels.....	24
4.1.1 Fret enterisch coronavirus (FRECV).....	24
4.1.2 Fret systemisch coronavirus (FRSCV)	24
4.2 Diagnose	26
4.3 Behandeling.....	27
Algemene conclusie	28
Referenties	30

Samenvatting

Feline infectieuze peritonitis is reeds lange tijd gekend als een lethale aandoening bij in groep gehuisveste katten. Tot op heden zijn er nog veel vragen omtrent de pathogenese en is er nog geen optimale diagnostische test of behandeling beschikbaar. Recent zijn op verschillende plaatsen in de wereld ook bij de hond en de fret coronavirusinfecties beschreven met gelijkaardige symptomatologie als FIP. Dit werk haalt het belang van coronavirussen aan en beschrijft wat op heden geweten is over coronavirusinfecties bij de gedomesticeerde carnivoren, meer specifiek bij de kat, de hond en de fret. Hierbij wordt vooral ingegaan op de systemische varianten die momenteel als 'emerging pathogens' beschouwd worden.

Sleutelwoorden: Carnivoren - Coronavirus - Exsudaat - Immuno - evasie - Systemische infectie

Inleiding

Coronavirussen komen voor bij een groot aantal dieren, zowel zoogdieren als vogels¹. Een infectie met deze virussen resulteert hoofdzakelijk in respiratoire of gastro-intestinale klachten, vooral bij jonge dieren², maar soms ook in een systemische infectie waarbij verschillende organen en/of het centraal zenuwstelsel kunnen worden aangetast^{3,4}. Omwille van het uitgebreide gamma aan coronavirussen en gastheren werd een classificatie opgesteld gebaseerd op de vier genera (alfa-, bèta-, gamma- en delta-coronavirussen) zoals weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Classificatie van de coronavirussen (Uit Belouzard et al, 2012)⁴.

Alfacoronavirus	Betacoronavirus	Gammacoronavirus	Deltacoronavirus
Alfa coronavirus 1: <ul style="list-style-type: none"> Feline coronavirus (FCoV) Canine coronavirus (CCoV) serotype 2 Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) Porcine respiratory coronavirus (PRCoV) Human coronavirus 229E Human coronavirus NL63 Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus (PEDV) Rhinolophus bat coronavirus HKU2 Scotophilus bat coronavirus 512/05 Miniopterus bat coronavirus 1 Miniopterus bat coronavirus HKU8	Beta coronavirus 1: <ul style="list-style-type: none"> Bovine coronavirus (BCoV) Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) Equine coronavirus (ECoV) Human enteric coronavirus (HECoV) Porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV) Canine respiratory coronavirus (CrCoV) Murine coronavirus: <ul style="list-style-type: none"> Mouse hepatitis virus (MHV) Rat coronavirus Puffinosis virus Human coronavirus HKU9 Rousettus bat coronavirus HKU4 Tylonycteris bat coronavirus HKU5 SARSr-CoV (SARS related Coronavirus): <ul style="list-style-type: none"> Human SARS-CoV Rhinolophus bat viruses 	Aviare coronavirussen: <ul style="list-style-type: none"> IBV Verschillende coronavirussen die kalkoen, fazant, eend, gans en duif infecteren. Beluga whale coronavirus SW1	Bulbul coronavirus HKU11 Thrush coronavirus HKU12 Munia coronavirus HKU13

Bij de carnivoren zijn vooral feliene coronavirussen (FCoVs) en caniene coronavirussen (CCoVs) van belang. Deze behoren samen met het transmissible gastro-enteritis virus (TGEV) van varkens tot de alfacoronavirussen^{1,5}. Recent werd binnen het genus *alfacoronavirus* een nieuw species (alfacoronavirus 2) voorgesteld, bestaande uit het fret enterisch coronavirus (FRECV) en het fret systemisch coronavirus (FRSCV)⁶. Naast onze gedomesticeerde carnivoren zijn er nog tal van andere wilde carnivoren die gevoelig zijn voor coronavirusinfecties. Onder de wilde *Felidae* zijn dit de Afrikaanse leeuw, de poema en de cheetah^{7,8}. Ook bij gevlechte hyena's in de Serengeti werden alfacoronavirussen geïsoleerd die verantwoordelijk geacht worden voor diarree⁹.

Het klinisch belang van coronavirusinfecties beperkt zich in onze contreien tot de kat, hond en fret. FCoV infecties bij **katten** zijn wereldwijd verspreid in kwekerijen en multi-kat huishoudens. Ze komen voor als 2 pathotypes, namelijk het felien enterisch coronavirus (FECV), dat gekenmerkt wordt door zijn milde enteritis of asymptomatisch verloop¹⁰, en het meer virulente, vrijwel steeds fatale, feliene infectieuze peritonitis virus (FIPV)^{11,12}. CCoV infecties bij de **hond** blijven meestal beperkt tot de darm. Deze zelflimiterende infecties zijn vaak asymptomatisch, maar milde (gastro-)enteritis wordt ook gezien¹³. Hoewel CCoVs lange tijd van weinig belang waren, werd in 2006 voor het eerst een fatale systemische infectie door coronavirussen bij de hond beschreven¹⁴. Dit doet sterk denken aan het fatale FIPV bij de kat. Bij de **fret** kent men een enterische variant (FRECV) die verantwoordelijk is voor epizoötische katarrhale enteritis (ECE) die vrijwel volledig beperkt blijft tot het gastro-intestinaal kanaal. Recent werd ook bij de fret een systemische variant (FRSCV) ontdekt die symptomatisch vrij dicht aanleunt bij een FIP infectie¹⁵. Net zoals voor FIP zijn een pyogranulomateuze perivasculitis en peritonitis kenmerkend voor een FRSCV infectie⁶.

Het is duidelijk dat coronavirussen niet steeds onschadelijk zijn zoals lang gedacht. Omwille van het grote aantal honden en katten in onze streken en de toenemende populariteit van de fret als huisdier wordt verder ingegaan op de coronavirussen die voorkomen bij deze drie diersoorten met nadruk op de systemische varianten.

Literatuurstudie

1 Morfologie van coronavirussen

Een coronavirus is een sferisch of pleomorf virus met een grootte variërend van 80 tot 120 nm⁴. Structureel kunnen een aantal onderdelen onderscheiden worden die voorkomen bij de meeste coronavirussen. Het virion bestaat uit een enkelstrengig RNA genoom dat geassocieerd is met nucleokapsied (N) proteïnes (Fig.1). Dit nucleokapsied wordt omgeven door een bilipide membraan of envelop. In deze envelop zijn de membraan (M) proteïnes, de envelop (E) proteïnes en de spike (S) proteïnes ingebouwd².

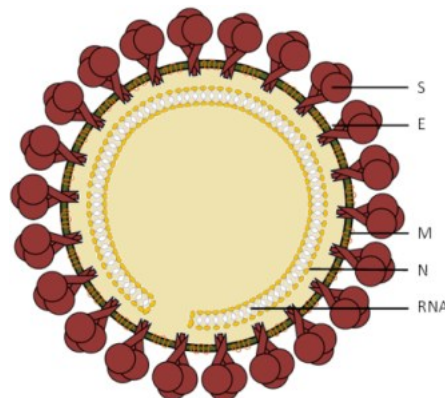


Fig. 1: Coronavirion met spike proteïne (S), envelop proteïne (E), membraan proteïne (M), nucleokapsied (N) proteïne en RNA (naar Dewerchin et al, 2008)¹⁶.

Het coronavirus genoom (Fig. 2) bestaat uit een aantal open leesramen (ORFs) die coderen voor de polymerase polyproteïnen (Pol 1a & 1b), de structurele proteïnes (S, E, M en N) en een aantal niet-structurele, accessoire proteïnes (3a,b,c en 7a,b)¹⁶.

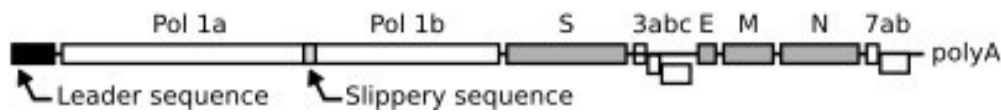


Fig. 2: Genoom van het feliene coronavirus (Uit Dewerchin et al, 2008)¹⁶.

Virussen zijn obligaat intracellulaire parasieten en maken dus gebruik van cellen om te vermeerderen. Deze replicatie verloopt in verschillende stappen en werd tot nu toe vooral bij FCoV's bestudeerd (Fig. 3). De replicatiecyclus van FCoV's wordt in gang gezet eenmaal binding optreedt van het S proteïne met zijn receptor. In tegenstelling tot serotype I FCoV's, waarvoor de receptor nog steeds niet gekend is, gebruiken type II FCoV's aminopeptidase N op het celoppervlak als receptor. Zowel voor serotype I en II werd bovendien aangetoond dat dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) fungeert als co-receptor¹⁷. Na binding aan het celoppervlak zal het virus zijn genoom vrijstellen in het cytoplasma. Dit gebeurt door fusie van de virale envelop met de cel- of endosomale membraan. Internalisatie van serotype II FIPV in monocysten gebeurt door een clathrine- en caveolae onafhankelijke pathway, die afhankelijk is van dynamine. Na de vrijstelling van het genoom in de cel ontstaat een cascade van processen met vorming van nieuw virus dat uiteindelijk de cel verlaat en nieuwe cellen kan infecteren¹⁶. Omdat het serotype II makkelijker groeit in celculturen werden de meeste studies uitgevoerd met dit type^{2,18,19}. Doordat het recent mogelijk is geworden om feliene enterocyt culturen aan te maken, kunnen nu ook serotype I FECV stammen *in vitro* vermeerderd worden en kan ook hun replicatiecyclus bestudeerd worden¹⁹.

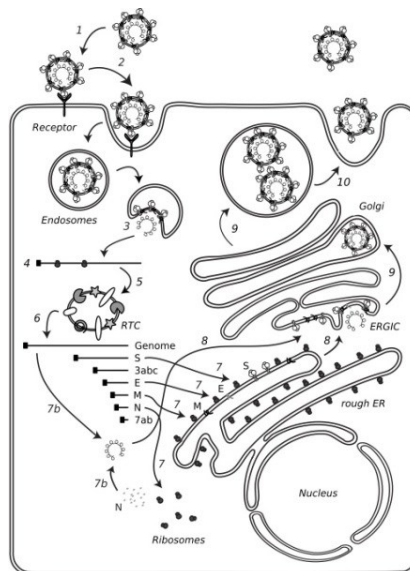


Fig. 3: FCoV replicatiecyclus. 1) Receptor binding. 2) Endocytose. 3) Vrijstelling genoom. 4) Translatie replicase-transcriptase proteïnen. 5) Vorming van het replicatie-transcriptie complex (RTC). 6) Synthese nieuwe genomen en mRNAs. 7) Translatie van mRNA naar proteïnen. 7b) Vorming nucleokapsied. 8) Accumulatie van virale proteïnen in het ER-to-Golgi intermediair compartiment (ERGIC). 9-10) Vrijstelling nieuwe virions (Uit Dewerchin et al., 2008)¹⁶.

2 *Felien enterisch coronavirus (FECV)/Feliene infectieuze peritonitis virus (FIPV)*

Zoals reeds vermeld komen coronavirussen bij katten voor als 2 pathotypes, FECV en FIPV¹⁰. FECV geeft in de meeste gevallen aanleiding tot een asymptomatische infectie of een milde enteritis van voorbijgaande aard. Overdracht van het virus gebeurt zeer efficiënt door fecaal-orale route waardoor de prevalentie van FECV stijgt bij hogere densiteit van het aantal dieren², en het virus dus vooral aanwezig is en blijft in catteries en multi-kat huishoudens met een prevalentie van 90-100%². Na infectie zullen katten het virus maanden of, in geval van persisterende uitscheiders, jaren uitscheiden. Uiteindelijk zullen 85-90% van de dieren het virus elimineren, maar herinfectie treedt vaak op, wat de bestrijding soms bemoeilijkt^{17,20}. FIPV ontstaat door een mutatie in het genoom van FECV, wat ervoor zal zorgen dat het virus zeer efficiënt kan vermeerderen in monocyten/macrofagen en een quasi altijd fatale infectie kan veroorzaken, gekend als FIP^{12,20-22}. In tegenstelling tot FECV, kent FIPV gelukkig een veel lagere prevalentie. Studies hebben aangetoond dat slechts 5-12% van de geïnfecteerde katten ooit FIP zullen ontwikkelen². Daarbij komt FIP vooral voor bij dieren jonger dan twee jaar, en in mindere mate ook bij oude dieren¹¹. Het is slechts sinds 1950 dat de eerste gevallen van FIP beschreven werden, wat deze ziekte entiteit bij de kat een vrij recente aandoening maakt²³.

Op basis van de antigeniciteit van de virussen worden beide pathotypes verder onderverdeeld in twee serotypes (I en II). Serotype I FCoV's komen het meest voor binnen kattenpopulaties¹⁸. Serotype II virussen zijn zeldzamer en ontstaan door een dubbele recombinatie tussen het type I feliene coronavirus en het caniene coronavirus^{14,18}, zodat uiteindelijk het spike gen en aanpalende regio's bij serotype II virussen van caniene oorsprong zijn. Serotype I en II virussen verschillen hierdoor sterk in hun receptorgebruik en de mogelijkheid om in celculturen te vermeerderen⁵. Zoals reeds aangegeven werd, gebruiken serotype II virussen aminopeptidase N als receptor, terwijl de receptor voor serotype I virussen niet gekend is^{2,18}.

2.1 Pathogenese en epizoötiologie

2.1.1 FECV infectie

Door de efficiënte feco-orale transmissie van FECV, komt het virus endemisch voor in vrijwel alle omgevingen waar zich een grote densiteit aan katten bevindt zoals kwekerijen, asielen en andere multi-kat huishoudens. Virusverspreiding gebeurt via diverse wegen. Belangrijke spreidingswegen zijn gedeelde kattenbakken, water- en voedselcontainers en direct contact met geïnfecteerde katten^{20,23}. Ook verslepen van met virus besmet materiaal via de handen en kledij dragen bij aan de virusverspreiding. Zoals eerder vermeld kunnen zo prevalenties bekomen worden van 90 - 100%. Na besmetting via orale route komt het virus in het gastro-intestinaal kanaal terecht en zal zich ter hoogte van de darm vasthechten aan het oppervlak van de enterocyt. Na genoomvrijstelling in de cel vindt de replicatie plaats in het cytoplasma. Zodra nieuwe viruspartikels gevormd worden, wordt de cel vernietigd en komen de nieuwe virions vrij die de naburige cellen zullen infecteren of zullen worden uitgescheiden in de mest²³.

Wanneer gevoelige katten in een endemische populatie worden binnengebracht, laat infectie niet lang op zich wachten. Binnen 1 week beginnen deze dieren namelijk op hun beurt het virus uit te scheiden²³. Dit kan bij jonge dieren gepaard gaan met diarree maar verloopt meestal subklinisch. Kittens raken besmet op de leeftijd van zes tot tien weken zodra de maternale immuniteit wegvalt, maar er zijn gevallen bij kittens van 2-3 weken oud beschreven²⁰. Een FECV infectie heeft een heel typisch verloop. Initieel treedt een infectie op die zeven tot achttien maanden duurt waarbij de hoogste uitscheiding plaatsvindt. Daarna verloopt de infectie kat- en/of virusafhankelijk waarbij 1) het virus volledig wordt geëlimineerd; 2) de kat het virus voor jaren zal uitscheiden (= persisterende uitscheider); of 3) het virus intermitterend wordt uitgescheiden, dit laatste meest waarschijnlijk door frequente herinfecties^{2,10,17,24,25}. Eenmaal besmet kan het virus dus gedurende weken tot maanden uitgescheiden worden en dit in hogere mate bij kittens dan bij oudere katten²⁴. De uitscheiding blijkt vooral voort te komen uit het jejunum, ileum, colon en rectum²⁵.

Lange tijd werd verondersteld dat een FECV infectie beperkt bleef tot de darm, maar analyse van bloed en weefsels van gezonde FECV geïnfecteerde dieren toonde aan dat ook bij deze katten het virus via een voornamelijk cel-geassocieerde (monocyt) viremie naar verschillende weefsels wordt verspreid. Het verschil tussen FECV en FIPV ligt dus niet in het al dan niet systemisch kunnen spreiden, maar zoals reeds aangegeven, wel in het al dan niet efficiënt kunnen vermeerderen in deze monocyttaire cellen²⁶. Daardoor gebeurt er na het systemisch spreiden van FECV in de meeste katten niets.

2.1.2 FIPV infectie

Bij het enzoötisch voorkomen van FIP op catteries kan men soms jarenlang geen sterfgevallen ten gevolge van FIP waarnemen, waarna plots meerdere gevallen voorkomen. De ziekte kan dan verdwijnen en na enige tijd terug de kop op steken. Het voorkomen van FIP is dus eerder zeldzaam en onvoorspelbaar²⁷. Algemeen wordt aangenomen dat de overgrote meerderheid van alle FIP gevallen ontstaat door mutatie in het virale genoom tijdens een FECV infectie. FIPV is een hoog virulent virus met

fatale gevolgen, maar in tegenstelling tot het endemisch verspreide FECV is de overdracht van FIPV naar andere katten minder evident^{10,20}. Tot op heden is er namelijk nog geen bewijs dat katten met FIP, FIPV kunnen overdragen naar andere katten¹⁷.

Door de omvorming van FECV naar FIPV, zal het virus efficiënt vermenigvuldigen in monocyt/macrofagen en zo een systemische aandoening veroorzaken in 5-12% van alle FECV geïnfecteerde gevallen². De ideale cel voor FIPV blijkt een precursor monocyt/macrofaag te zijn met een hoog tropisme voor het endotheel in serosae, omentum, pleura, meningen en uvea¹⁷. De exacte mutaties die verantwoordelijk zijn voor deze pathotype-switch zijn nog steeds niet gekend. Wel vermoedt men dat het gerelateerd is met veranderingen in het S proteïne²⁴ en mutaties in de accessorische eiwitten 3c^{20,24} en 7b¹¹.

De incidentie van FIP kan sterk beïnvloed worden door externe factoren:

- ✿ FIP is een aandoening die het meest frequent wordt waargenomen bij jonge dieren^{2,11,12,17} of bij katten die lijden aan immunosuppressie²⁴. Vaak treden de eerste sterfgevallen op na het spenen op een leeftijd van 6 tot 18 maand gevolgd door een dalende trend, waarbij de prevalentie sterk afneemt na de leeftijd van drie tot vijf jaar²³.
- ✿ Intacte mannelijke dieren zouden een hoger risico hebben om FIP te ontwikkelen² en gesteriliseerde kattinnen blijken een lager risico te hebben²⁷. Volgens Pedersen²³ zou er echter geen geslachtsprevalentie zijn.
- ✿ Erfelijkheid vormt een belangrijke factor in de ontwikkeling van FIP²⁷. Deze erfelijke ontvankelijkheid komt van zowel de vaderlijke als de moederlijke lijn²⁰. Daarom zou FIP ook vaker kunnen voorkomen bij raskatten^{27,28}. Zowel hygiëne, de productie van jonge dieren en soms lagere genetische variatie zijn risicofactoren binnen de fok²⁰.
- ✿ Allerlei vormen van stress²³: dracht bij jonge dieren, chirurgie (castratie, sterilisatie, ...), spenen, verhuizen, transport, andere infectieuze ziekten,...
- ✿ Een belangrijke risicofactor is een simultane besmetting met feline leukemie virus (FeLV). Door de aantasting van de immuniteit stijgt het risico op ontwikkeling van FIP^{20,23}.

FIP start met de opname van het virus door een macrofaag. Waarschijnlijk start dit met infectie van macrofagen in de mesenteriale lymfeknopen²³. Vanaf dit punt start een snelle replicatie in het cytoplasma van de macrofaag, gevolgd door het openbarsten van de cel met vrijkomen van nieuw gevormde virusdeeltjes. Andere macrofagen zullen deze virions opnemen wat leidt tot een vicieuze cirkel van virusreplicatie. Sommige macrofagen verlaten de mesenteriale lymfeknopen en kunnen via het bloed naar andere weefsels migreren en eenmaal uit de venules getreden, kan terug vermenigvuldiging optreden in de betreffende weefsels²³. Het vrijstellen van verschillende mediators zorgt er voor dat er continu

nieuwe macrofagen worden aangetrokken die op hun beurt geïnfecteerd worden en bijdragen aan de karakteristieke letsels (zie paragraaf 2.2). Virus replicatie gebeurt gestaag de eerste twee weken. Vanaf 10 tot 21 dagen wordt echter een zeer sterke stijging van macrofaag infiltratie, replicatie en virusspreiding gezien²⁷.

FIP katten hebben typisch zeer hoge anti-coronavirus antistof titers (zie verder), maar het is algemeen gekend dat deze niet beschermen tegen het ontwikkelen van FIP. In tegendeel, de humorale immuniteit blijkt zelf de ontwikkeling van FIP in de hand te werken, aangezien antilichamen de opname en replicatie van FIPV in de macrofaag faciliteren¹⁷. Dit fenomeen wordt aangeduid als *antibody-dependent enhancement of infectivity* (ADEI, Fig. 4). Bovendien wordt beschreven dat het neerslaan van virus-antistof complexen in de bloedvaten kunnen bijdragen aan het ontstaan van de vasculitis (Fig. 4)

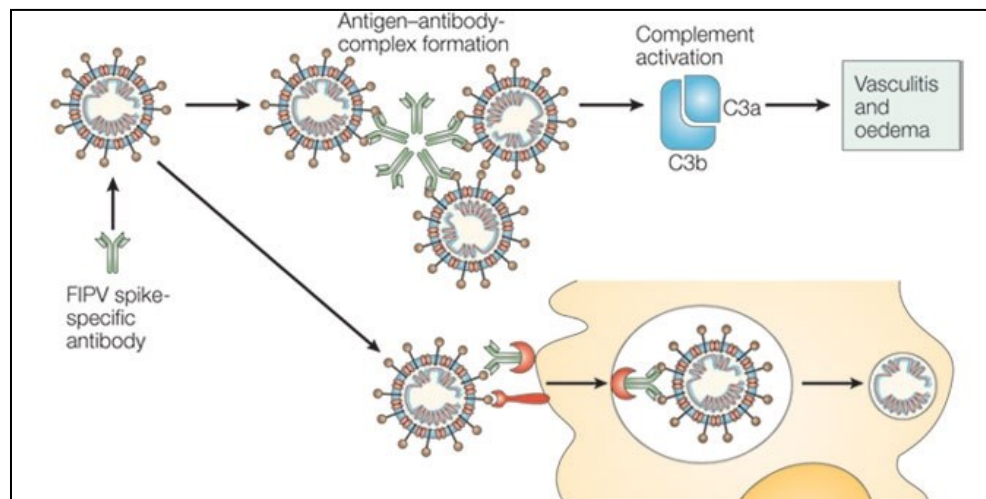


Fig. 4: Bijdrage van FCoV-specifieke antistoffen aan de ontwikkeling van FIP. Het afzetten van virus-antistof complexen in de bloedvaten met daaropvolgende complement activatie kan bijdragen tot de vasculitis. Langs de andere kant kunnen antistoffen het ziekteverloop versnellen doordat ze de opname van FIPV in de macrofaag bevorderen (ADEI) (Uit Perlman et al., 2005)²⁹.

ADEI geeft een verklaring voor het snelle verloop van de ziekte, maar verklaart niet waarom het immuunsysteem niet in staat is de geïnfecteerde cellen af te doden. Geïnfecteerde cellen worden namelijk onder normale omstandigheden geëlimineerd door het adaptieve immuunsysteem³⁰. Van FIPV is gekend dat het kan ontsnappen aan verschillende takken van het immuunsysteem.

- ✿ Het ontsnappen aan antistof-afhankelijk complement-gemedieerde cellyse (ADCML) en antistof-afhankelijk celgemedieerde cytotoxiciteit (ADCC)

Wanneer virale antigenen tot expressie komen op het oppervlak van de geïnfecteerde cel, kunnen deze herkend worden door antilichamen³¹. Het Fc uiteinde van de gebonden antilichamen kan herkend worden

door het complement en door fagocyten of natural killer cellen¹⁶. Dit wordt gevolgd door vorming van *membrane attack complexes of celgedimeerde destructie* van de geïnfecteerde cel¹⁶.

In vitro studies toonden aan dat slechts 50% van de geïnfecteerde monocytten antigenen tot expressie brengen in hun celoppervlak (S en M proteïnen)³¹. De andere helft van de cellen vertonen geen expressie van antigenen op hun celoppervlak³². Dit zorgt er dus voor dat 50% van de geïnfecteerde cellen niet herkend kunnen worden door het immuunapparaat, en bijgevolg niet vernietigd worden via ADCML of ADCC. Zo krijgt FIPV vrij spel, en kan het ongebreideld vermenigvuldigen, of in een latente toestand overgaan³². Maar ook de andere 50% van de cellen ontsnappen aan het immuunsysteem. Bij de cellen die wel degelijk antigenen tot expressie brengen, worden deze antigenen geïnternaliseerd eenmaal binding van antistoffen optreedt (Fig. 5)³². De internalisatie gebeurt via een clathrine- en caveolae-onafhankelijke internalisatie pathway die afhankelijk is van serine/threonine kinase(s)^{27,32,33}. De opgenomen antigeen/antistof complexen gaan dan naar de vroege endosomen en accumuleren in de late endosomen. Ze gaan niet naar de lysosomen, maar komen in een niet-lysosomaal compartiment^{27,33}. *In vivo* worden dus geen virale antigenen tot expressie gebracht waardoor de humorale immuunrespons niet in staat is de infectie op te ruimen³⁰.

🌀 Het ontsnappen aan de cellulaire immuniteit

De cellulaire immuniteit lijkt de belangrijkste determinator voor het al dan niet overleven van een FIPV infectie³². FIP katten worden typisch gekenmerkt door een onderdrukking van de normaal beschermende cellulaire immuniteit, met afwijkingen aan zowel de aangeboren (NK-cellen) als adaptieve (CD4+, CD8+ en regulatorische T cellen) cellulaire immuniteit³⁴. De T-cel lymfopenie wordt geacht veroorzaakt te worden door virale eiwitten (vb. 7b) en/of door ontstekingsmediatoren (vb TNF- α)^{35,36}.

🌀 Ontsnappen aan de aangeboren immuniteit

Recent werd aangetoond dat FIPV ook tools bezit om de antivirale interferon respons in de cel te weerstaan, maar verder onderzoek is nodig om het mechanisme hiervoor te achterhalen³⁷.

2.2 Letsels en symptomen

De eerste tekenen van een FIP infectie worden vaak weken, maanden en soms zelfs jaren na de initiële FECV infectie gezien^{20,27}. Voordat de echte typische FIP letsels waarneembaar zijn, gedijt het virus eerder in een latente vorm met soms vage klachten zoals slechte eetlust, slechte groei, verhoogde gevoeligheid voor andere infecties,...²⁰. Progressief ziet men bij deze dieren: vermageren, fluctuerende koorts en algemeen verslechterende conditie²⁷.

De vaakst aangetaste weefsels en organen zijn de mesenteriale lymfeknopen, serosae van het gastro-intestinaal stelsel, peritoneum, pleura en omentum. De sterkste aantasting ziet men in weefsels en organen die bevoeid worden door de a. mesenterica cranialis en weefsels rijk aan fagocyten²⁷. Daarnaast

kan ook op andere plaatsen FIPV aangetroffen worden zoals in de meningen, het ependymkanaal, de dura mater, het ruggenmerg, de uvea, de retina en het oog^{23,27}.

Klinisch kan FIP onderverdeeld worden in twee types nl. de vochtige of effusieve vorm, en de droge of non-effusieve vorm³⁰. Behalve het klinische beeld verschillen beide vormen vrijwel niet van elkaar en komen ook vaak overgangsvormen en mengvormen voor³⁸.

2.2.1 Vochtige of effusieve FIP

Typisch is de sterke pijnloze zwelling van het abdomen²⁷ door effusie van geelachtig slijmerig exsudaat vooral ter hoogte van de abdominale holte (pot-belly uitzicht, Fig. 5)³, en in mindere mate thoracaal²⁰. Dit laatste kan ervoor zorgen dat dyspnee één van de eerste symptomen is die ontstaan^{20,27}.



Fig. 5: Kat met effusieve FIP: 'pot-belly' uitzicht (Uit Addie et al, 2009)³⁹.

De belangrijkste laesies die voorkomen bij effusieve FIP zijn de pyogranulomateuze vasculitis en serositis, gekenmerkt door accumulatie van lymfocyten, macrofagen¹⁷ en in mindere mate neutrofielen⁴⁰ rond kleine bloedvaten in de verschillende aangetaste weefsels¹⁷. De resulterende vasculitis wordt voornamelijk gezien bij zeer kleine en kleine venen en minder in post-capillaire venulen⁴⁰. De zware bloedvat beschadigingen die hierdoor optreden resulteren in de excessieve vloeit van proteïnerijk, cellulair exudaat naar de lichaamsholtes (Fig. 6). Deze effusie zou veroorzaakt worden door met FIPV geïnfecteerde monocyt/macrofagen. Deze produceren vasculair endotheliale groei factor (VEGF), die verantwoordelijk is voor verhoogde vaatwandpermeabiliteit³⁸.



Fig. 6: Opstapeling proteïnerijk vocht in het abdomen (Uit Addie et al, 2009)³⁹.

Op het peritoneum en de viscerele organen wordt vaak fibrineneerslag gevonden⁴¹. Wanneer een drachtige kattin effusieve FIP ontwikkelt tijdens de dracht, is het mogelijk dat de kittens *in utero* geïnfecteerd raken maar dit is eerder zeldzaam. De voornaamste symptomen bij in utero-geïnfekteerde kittens zijn pneumonie, pleuritis en hepatitis²⁷.

2.2.2 Droge of niet-effusieve FIP

In tegenstelling tot de effusieve vorm, komt bij de droge vorm vrijwel geen accumulatie van vocht in de abdominale/thoracale holte voor, maar veruiterlijkt dit zich meer als een chronische vorm gekenmerkt door typische nodulaire massa's op diverse organen (Fig. 7)²⁰. Vaak komen tekenen van beide vormen voor³ of gaat de ene vorm over in de andere²³.

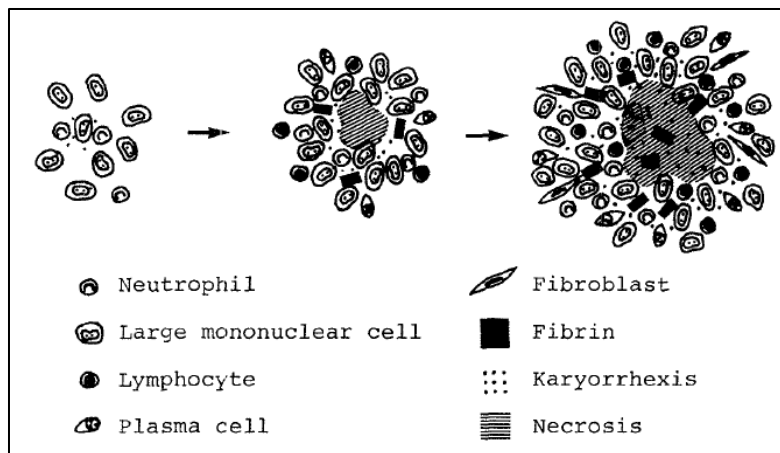


Fig. 7: Ontstaan van een granulomateuze laesie bij niet-effusieve FIP (Uit Hayashi et al, 1980)⁴¹.

In het prille begin van een droge FIP infectie, kunnen duidelijke symptomen achterwege blijven en ziet men vooral vage symptomen zoals koorts, anorexie, lethargie³⁹. Later worden meer typische letsels gevormd in de aangetaste (vaak abdominale) organen^{23,39}. Abdominale laesies bij de droge variant zijn vaak minder talrijk, maar veel groter en hebben de neiging om dieper in het parenchym onder de serosae van de organen door te dringen^{27,42}. Ter hoogte van het abdomen zijn de vaakst voorkomende aangetaste

organen de nieren (renomegalie), de mesenteriale lymfeknopen en in veel mindere mate de lever en zijn lymfeknopen (Fig. 8)²⁷.

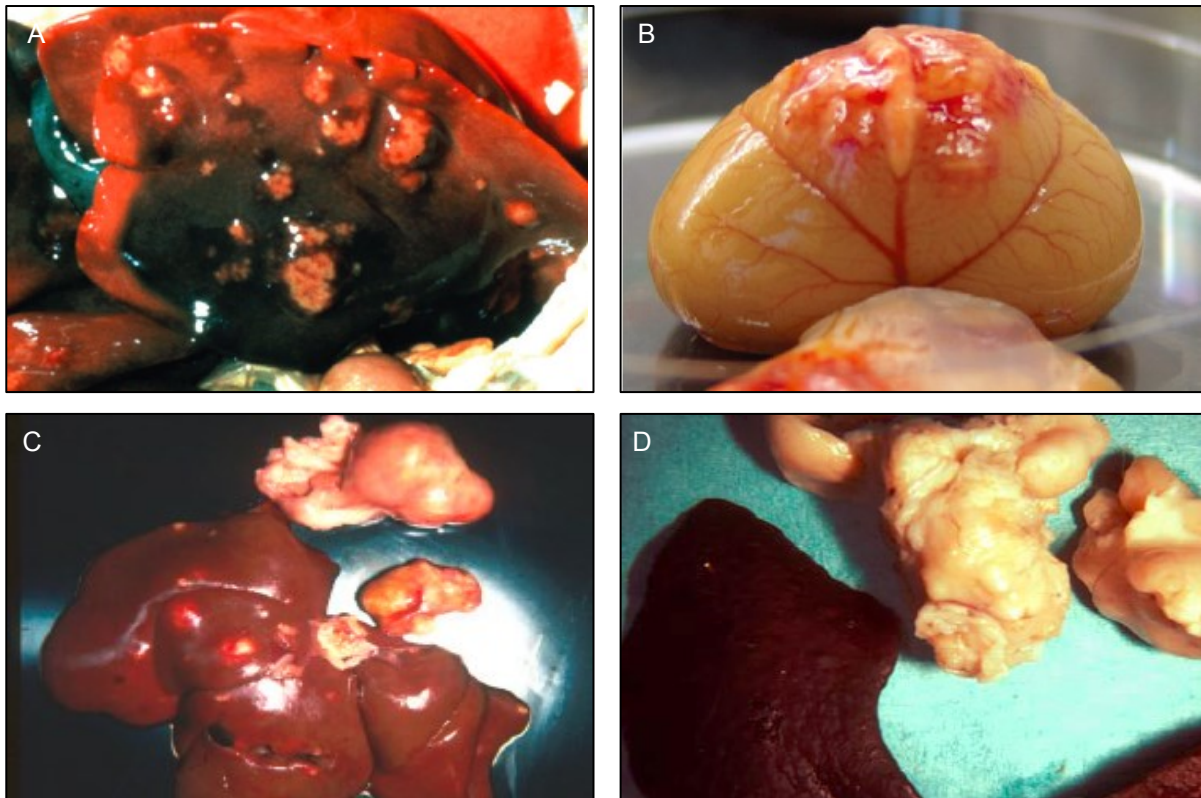


Fig. 8: Droge FIP: Granulomateuze letsels ter hoogte van de lever (A) en nier (B) (Uit Addie et al, 2009)³⁹. Vergrote mesenteriale lymfeknopen en witte verheven foci op de lever (C) en vergrote mesenteriale lymfeknopen en fibrine op de milt (D) (Uit Pedersen, 2009)²⁷.

Naast abdominale letsels ziet men bij deze uitingsvorm spreading naar verder gelegen gebieden in het lichaam. Aantasting van de nieren, longen, hersenen en ogen blijken vaker voor te komen bij de droge vorm dan bij de vochtige vorm⁴¹. Oculaire lokalisatie (Fig. 9) is vrijwel uitsluitend gelinkt aan de droge variant van FIP, evenals aantasting van het centrale zenuwstelsel²³. Uveïtis is een vaak voorkomende uitingsvorm van infectie van het oog leidende tot diverse symptomen zoals blindheid, hyphema en anisocorie/dyscorie secundair aan iritis³⁹. Ook chorioretinitis^{27,39} en verandering in iriskleur komt voor en wordt aanzien als een vroeg teken van droge FIP²⁷. In het oog ziet men soms troebelheid van de cornea veroorzaakt door precipitatie van fibrine en inflammatoire cellen^{27,28}.

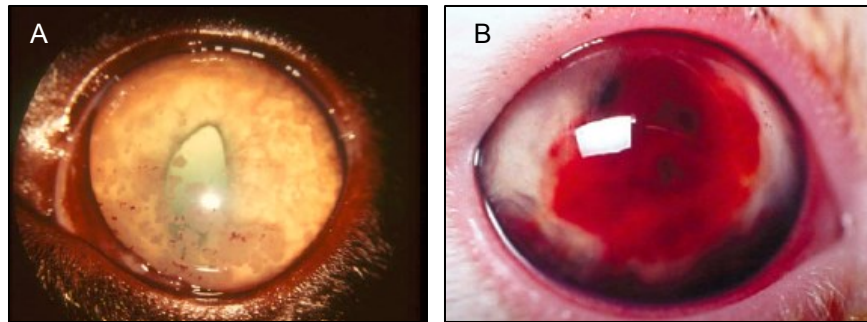


Fig. 9: Oculaire laesies: Keratistische precipitatie aan de binnenzijde van de cornea (A) (Uit Pedersen, 2009)²⁷. Hyphema (B) (Uit Addie et al, 2009)³⁹.

Aantasting van het centraal zenuwstelsel wordt beschreven in minstens 10% van de gevallen³⁹ en blijkt het vaakst voor te komen bij dieren jonger dan vier jaar²⁸. Daarbij blijkt dat bij 1/3 van de katten met droge FIP, neurologische symptomen ontstaan^{42,43}. Klinisch komt de aandoening tot uiting afhankelijk van de lokalisatie van de letsels, welke zowel focaal als multifocaal kunnen zijn en vrijwel overal in het CZS kunnen voorkomen²⁸. Symptomatisch ziet men beroertes, abnormale houdingen, mentale status en gedrag, centraal vestibulaire aandoeningen, ataxie, tetraparese, hyperesthesie³⁹. Hydrocefalus werd beschreven, mogelijks door obstructie van de ventrikels ten gevolge van meningitis, choroïditis, ependymitis of vasculitis^{41,43}. FIP is ook één van de belangrijkste oorzaken van aandoeningen aan de wervelkolom, leidende tot verlammingen, parese en aantasting van craniale zenuwen (Fig. 10)²⁷.

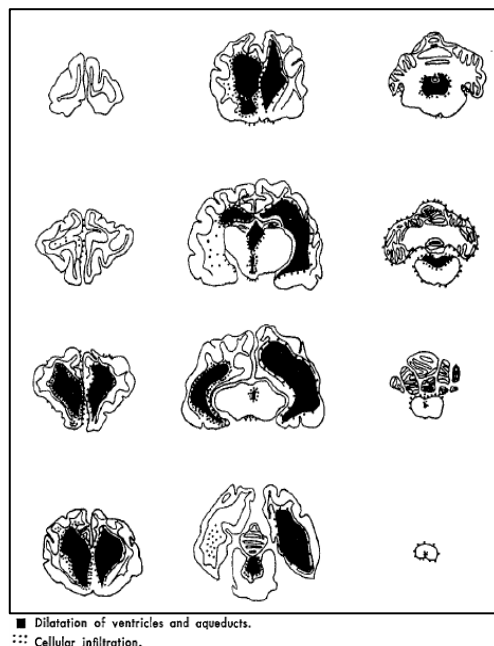


Fig. 10: Verdelingspatroon van FIP granuloma's in de hersenen en ruggenmerg bij een casegeval in 1980 (Uit Hayashi et al, 1980)⁴¹.

2.3 Diagnose

2.3.1 FECV infectie

Aangezien FECV vaak subklinisch voorkomt of een milde enteritis veroorzaakt is het op basis van klinische symptomen vrijwel onmogelijk om een juiste diagnose te stellen. De aanwezigheid van antistoffen bij gezonde dieren wijst erop dat ze zijn blootgesteld aan het virus maar zegt niets over een actuele infectie. Hoe hoger deze antistof titer, hoe hoger echter de kans dat deze dieren het virus ook uitscheiden²³.

2.3.2 FIPV infectie

Gebaseerd op post mortem pathologisch onderzoek, kan men op basis van de gevonden typische letsels snel besluiten dat het om FIP ging. Bij het levende dier zorgt het stellen van een zekerheidsdiagnose echter voor heel wat moeilijkheden⁴⁴⁻⁴⁶. Aangezien er geen enkelvoudige test bestaat die FIP kan aantonen (behalve het aantonen van FIPV in macrofagen), wordt de diagnose vaak gesteund op cumulatieve testresultaten van meerdere testen²⁰. Zeker bij afwezigheid van exsudaat blijft het stellen van een FIP diagnose nog steeds een uitdaging (Fig 12).

Initieel wordt de diagnose gebaseerd op een aantal snel waar te nemen parameters (zoals de leeftijd en oorsprong van het dier, de symptomen en het klinisch onderzoek) die een eerste vermoeden van FIP doen ontstaan⁴⁴. Omdat klinische symptomen vaak niet specifiek zijn en bepaalde parameters zoals anemie, lymfopenie, neutropenie, hyperproteïnemie en hypergammaglobulinemie niet pathognomonisch zijn, dringen zich een aantal testen op voor het stellen van een correcte diagnose⁴⁵. Daarbij komt ook nog eens de lage specificiteit en sensitiviteit van de meeste routinematige testen⁴⁶. Samen met het klinisch beeld kunnen een aantal indirecte testen uitgevoerd worden die een vermoeden van FIP kunnen staven. Deze geven echter op zichzelf geen 100% diagnose, maar samen kunnen ze een FIP infectie met vrij grote zekerheid aantonen. Daarnaast zijn er momenteel twee directe testen die in de meeste gevallen een definitieve diagnose geven⁴⁴.

2.3.2.1 Indirecte testen

Bloedtelling, albumine, globuline en bilirubine.

De meest kenmerkende veranderingen die gezien worden zijn chronische niet-regeneratieve anemie, leukocytosis (neutrofilie en lymfopenie), hyperglobulinemie, laag albumine en een lage albumine/globuline ratio, hyperbilirubinemie en hyperbilirubinurie⁴⁴.

Testen voor effusie.

Een van de meest kenmerkende symptomen van effusieve FIP is de sterke opstapeling van inflammatoir exsudaat in de buikholte en in mindere mate in de pleurale holte. De vaak typische gele kleur is afkomstig van bilirubine resulterend uit de afbraak van erythrocyten door macrofagen⁴⁴. Vaak is het exsudaat

troebel, viskeus met hoog gehalte aan eiwit en een matig cel gehalte (matig neutrofiel en macrofaag gehalte en laag gehalte lymfocyten)⁴⁶.

Naast cytologisch onderzoek kan men ook een andere diagnostische test gebruiken die eerder snel, makkelijk en goedkoop uit te voeren is⁴⁶. Na het afnemen van het verdachte exsudaat via punctie kan men een Rivalta test uitvoeren (Fig. 11). Globaal omvat dit een zwakke azijnzuur oplossing in een proefbuis waarin men enkele druppels van het exsudaat laat druppelen. Een positieve test uit zich door typische vlok/druppelvorming⁴⁴. Effusie van een verdachte patiënt kan tot drie weken bewaard worden in de koelkast of diepvries⁴⁷.

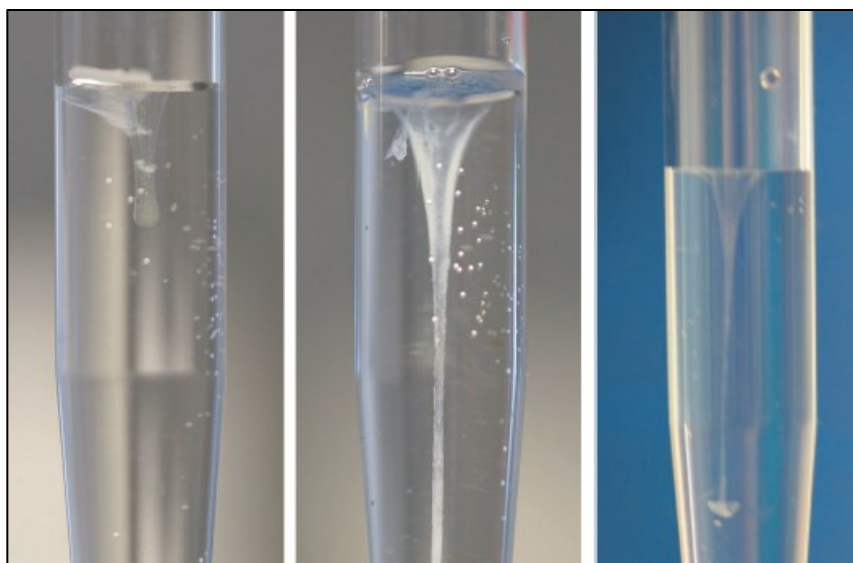


Fig. 11: Drie positieve Rivalta testen: Typische vlok/druppelvorming (Uit Fischer, 2013)⁴⁷.

Echografie en radiografie kunnen een hulpmiddel vormen bij het opsporen van vochttopstapeling in de thorax of abdomen. Daarnaast kan echografie toegepast worden in de begeleiding van de punctie⁴⁴.

✿ Albumine/globuline (A/G) ratio en totaal serum proteïne.

Katten met FIP vertonen vaak een stijging van het totaal serum proteïne ten gevolge van een stijging van globulines, voornamelijk gammaglobulines (hypergammaglobulinemie) en een daling in het albuminegehalte. Dit zorgt voor een daling in albumine/globuline ratio⁴⁵. Een hoge A/G ratio ($> 0,8$) blijkt een goed hulpmiddel om FIP uit te sluiten indien de prevalentie van FIP laag is⁴⁸, hoewel een lage A:G ratio ($< 0,8$) niet behulpzaam is in het maken van een positieve diagnose³⁹.

✿ Antilichamen FCoV.

De vaakst gebruikte testen voor antistofbepaling in serum zijn immunofluorescentie, virus neutralisatie en ELISA testen. De interpretatie van deze resultaten zorgt voor enige problemen daar zowel FECV als FIPV bijna identiek zijn aan elkaar en dus op basis van antigeniciteit niet van elkaar te onderscheiden zijn⁴⁹. Bij een kat met antilichamen kan er dus geen onderscheid worden gemaakt tussen een FECV en een FIPV

infectie²⁷. Negatieve antistof titers hebben een beperkte diagnostische waarde, terwijl lage tot middelmatige titers (1:25-1:1600) geen tot misleidende diagnostische informatie geven. Hoge antistof titers kunnen daarentegen wel helpen bij het stellen van een diagnose, op voorwaarde dat ook andere indicatieve parameters aanwezig zijn (Fig. 14)^{44,45}.

✿ α_1 -zuur glycoproteïne (AGP).

Hoewel deze parameter niet alleenstaand kan gebruikt worden bij het stellen van een diagnose blijkt een stijging in AGP een sterke indicator voor FIP⁵⁰.

2.3.2.2 Directe testen

✿ Real Time RT-PCR

Fecale stalen kunnen onderzocht worden met RT-PCR op aanwezigheid van FCoV. Dit kan zijn om diagnostische redenen, maar ook om dragers aan te tonen en hierbij de bron van uitscheiding aan te pakken en zo dus FIP proberen te vermijden⁴⁶. Zowel dieren met FECV als met FIPV scheiden virus uit via de mest, hoewel dit bij FIP veel lager is⁴⁴. Het uitgescheiden virus bij FIP katten is vaak dan ook nog van het FECV type¹⁰, of is niet meer infectieus voor andere katten³⁸. Met deze test kan ook de hoeveelheid en frequentie van uitscheiding bepalen⁴⁴. Het is van groot belang dat stalen goed genomen en verpakt worden en zo snel mogelijk na staalname onderzocht worden om vals negatieve resultaten te vermijden⁴⁶.

Naast het aantonen van FCoVs in feces kan RT-PCR gebruikt worden voor het aantonen van de virussen in aangetaste weefsels (nier, milt, lever,...) en vloeistoffen (ascites,...)⁴⁶. Zowel bij gezonde als bij FIP katten kan viraal RNA worden teruggevonden in de weefsels, maar de virale lading is beduidend hoger bij FIP katten dan bij gezonde katten. Deze methode kan dus een hulp zijn in het stellen van een diagnose. Vereisten voor een goed staal zijn: hoog virus gehalte, goede extractie viraal RNA, PCR inhibitoren afwezig,...⁴⁴.

✿ IDEXX FIP Virus RealPCR™ Test

Dit is de meest recente test die gebaseerd is op twee mutaties die voorkomen bij FIPVs in het S2 domein van het S proteïne. Deze test wordt verondersteld een definitieve diagnose te stellen voor FIP op effusie of biopsieën. De exacte testkarakteristieken zijn nog niet gekend, maar deze test lijkt veelbelovend⁵¹.

✿ Immuunhistochemie

Histopathologisch onderzoek wordt vaak als gouden standaard beschouwd bij de diagnose van FIP^{27,46}. Immunofluorescentie of immunoperoxidase kunnen beide gebruikt worden voor het aantonen van FIP in aangetaste weefsels. Het nadeel hiervan is dat men ante mortem biopsieën moet nemen, wat riskant is bij zieke dieren³⁹. Post mortem kunnen makkelijk diverse stalen onderzocht worden. Ook exudaat kan met behulp van immunofluorescentie onderzocht worden op aanwezigheid van virus aangezien vaak grote aantallen geïnfecteerde macrofagen aanwezig zijn⁴⁴. De resultaten van deze test kunnen op de dag van

staalname reeds verkregen worden⁵². Ook in gezonde dieren kan FCoV systemisch voorkomen, maar enkel in gevallen met FIP zal er genoeg virus aanwezig zijn in macrofagen om voldoende kleuring te verkrijgen bij de immuunhistochemie techniek³⁹.

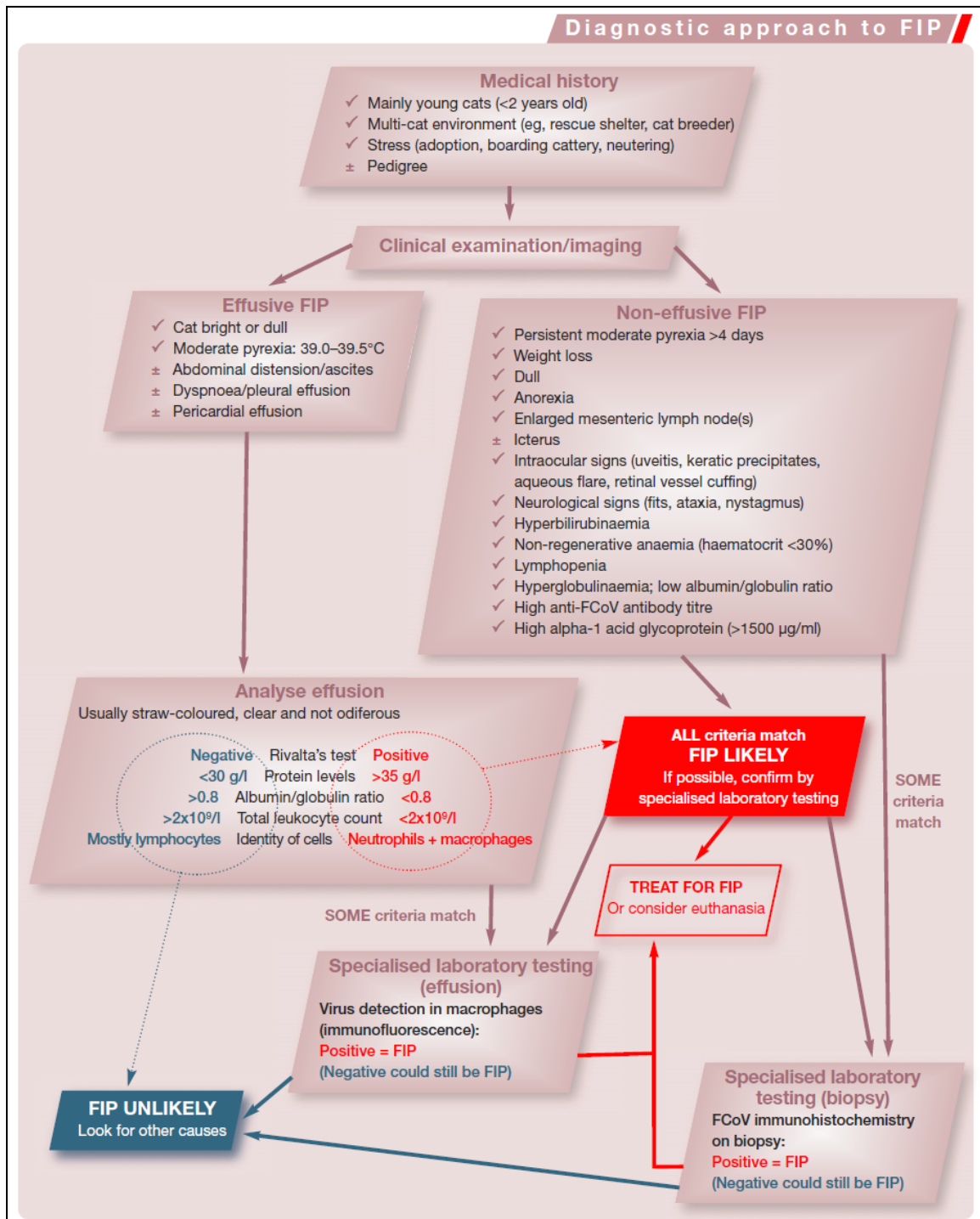


Fig. 12: Diagnose FIP (Uit Addie et al, 2009)³⁹.

2.4 Behandeling

Tot op heden bestaat er dus nog geen behandeling voor FIP. Er werden reeds meerdere geneesmiddelen getest in het verleden zonder gunstig resultaat (Fig. 13). Veel studies zijn bovendien niet representatief en dienen met voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden. Vaak werd enkel aangenomen dat de dieren FIP hadden, zonder zekere diagnose⁵³. In sommige gevallen werd medicatie getest, maar waren deze studies onvoldoende gecontroleerd³⁹.

Drug	Comments	ABCD recommendation [EBM grade*]
ANTIVIRALS		
Ribavirin	Works in vitro but toxic in cats	Not recommended [II]
Vidarabine	Works in vitro but toxic in cats	Likely ineffective [IV]
Human interferon-alpha – SC high dose	Although human interferon-alpha has in vitro effects on FCoV, SC treatment did not work in an experimental trial	Ineffective [II]
Human interferon-alpha – PO low dose	No trials Only acts as immune stimulant if given orally Immune stimulation should be avoided in cats with FIP	Contraindicated [IV]
Feline interferon-omega	One placebo-controlled study of naturally occurring cases and one uncontrolled study	No benefit was observed [grade I study]; may require further studies in view of anecdotal clinical evidence [IV]
IMMUNOSUPPRESSANTS		
Prednisolone/dexamethasone – immunosuppressive doses	No controlled studies. Some cats have improved during treatment and survived for several months, but does not cure FIP	Currently supportive treatment of choice [III] If effusion is present, dexamethasone IT or IP may help
Pentoxifylline	Aimed at treating the vasculitis Some veterinarians in practice have tried this treatment, but there are no published studies or case reports	Requires studies [IV]
Ozagrel hydrochloride	Thromboxane synthesis inhibitor aimed at treating the inflammatory response. Only used in two cases with beneficial effect	Controlled studies needed [III]
Ciclosporin A	Aimed to immunosuppress (lower the corticosteroid dose). No published studies	Not recommended because directed more at cellular immunity than humoral (lack of data) [IV]
Cyclophosphamide	Aimed to immunosuppress (lower the corticosteroid dose). No published studies	Might be considered in combination with glucocorticoids [IV]
Chlorambucil	Aimed to immunosuppress (lower the corticosteroid dose). No published studies	Might be considered in combination with glucocorticoids [IV]
Azathioprine	Toxic in cats (!) Aimed to immunosuppress (lower the corticosteroid dose). No published studies	Not recommended [IV]
Salicylic acid (aspirin) – platelet inhibitory dosage	Aimed at treating the inflammatory response as well as the vasculitis. No published studies	May have some beneficial effect, but side effects possible if used in combination with high steroid doses

Fig. 13: Geneesmiddelen ter behandeling van FIP (Uit Addie et al, 2009)³⁹.

2.5 Vaccinatie en management

Er is één commercieel vaccin beschikbaar, maar dit vaccin is niet effectief bij dieren die reeds FCoV antistoffen hebben (de overgrote meerderheid). bovendien kan het maar gebruikt worden op de leeftijd van 16 weken, wanneer de meeste dieren al lang besmet zijn. Het gebruik wordt dus afgeraden door de zeer lage efficaciteit²⁰. Tot op heden is dus de optimalisering van het management de enige vorm van preventie.

3 Canien coronavirus

CCoV werd voor het eerst aangetoond in 1971 en behoort tot de familie *Coronaviridae*, genus *Alfacoronavirus*, species *alfacoronavirus* 1^{54,55}. Zoals FCoV's zijn CCoV's sferische virussen bestaande uit een positief enkelstrengig RNA omgeven door een envelop⁵⁴ (zie paragraaf 1). CCoV's komen voor als 2 genotypes: CCoV-I en CCoV-II, die zich van elkaar onderscheiden op basis van verschillen in het gen dat codeert voor het spike eiwit⁵⁵. Vergelijkbaar met FCoV's ziet men dat type I zich moeilijk kan vermeerderen in celculturen en daardoor minder bestudeerd is dan type II, dat wel in staat is vlot te vermeerderen in celculturen⁵⁵. Mogelijks is dit te verklaren door het verschil in receptor tropisme. Type II CCoV gebruikt zoals FCoV type II aminopeptidase N als receptor. De receptor voor CCoV type I is zoals bij FCoV type I nog steeds onbekend^{54,55}. Binnen de genotype II CCoV's, maakt men nog een onderverdeling in subtypes op basis van het N-terminal domain (NTD) van het genetisch materiaal van het S proteïne⁵⁵. Men onderscheidt CCoV-IIa en CCoV-IIb op basis van TGEV recombinanten (Fig. 14).

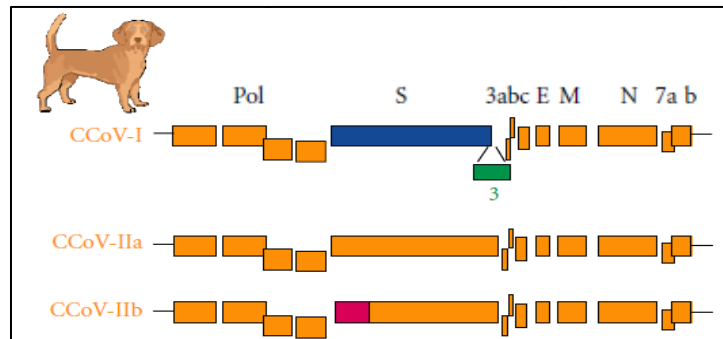


Fig. 14: Canien coronavirus genoom en classificatie (Uit Le Poder, 2011)⁵⁴.

Vaak worden beide genotypes simultaan teruggevonden in eenzelfde hond, dit in tegenstelling tot de kat waar men type I of type II FCoV terugvindt⁵⁶. Tabel 2 geeft de prevalentie van CCoV weer uit een onderzoek van fecale stalen van 493 honden met diarree in Europa⁵⁷:

Tabel 2: Prevalentie van CCoV in feces van 493 honden met diarree in Europa (Uit Decaro et al, 2010)⁵⁷.

CCoV-I	18,86 %
CCoV-II	44,22 %
CCoV-IIa	80,10 %
CCoV-IIb	19,50 %
Zowel CCoV-I als -II	36,92 %

Beide genotypen veroorzaken milde klinische symptomen bij puppies⁵⁷. Onder normale omstandigheden blijft een CCoV infectie beperkt tot het maagdamkanaal resulterende in een subklinische infectie of milde enteritis^{14,58}. Het belang van een coronavirus infectie is dus gering, net zoals bij een FECV infectie bij de kat.

3.1 Pathogenese en epizootiologie

CCoV infecties ziet men vooral op plaatsen waar er een hoge densiteit van honden is zoals in kennels, opvangcentra en fokkerijen. CCoV is zeer besmettelijk en manifesteert zich vooral bij jonge honden, vaak jonger dan 12 weken. Een CCoV infectie wordt vaak gekenmerkt door een hoge morbiditeit en lage mortaliteit⁵⁹.

3.1.1 Canien coronavirus: enterische vorm

Virus verspreiding van de enterische CCoV varianten gebeurt voornamelijk via de feco-orale route. Opname van het virus resulteert in vermeerdering in het cytoplasma van de enterocyten aan de top en zijkant van de darmvilli⁶⁰. De intestinale epitheelcellen worden aangezet tot apoptose⁵⁴, komen in het darmlumen terecht en zorgen voor een verkorten, vervormen en atrofie van de darmvilli (Fig. 15). Ter hoogte van de crypten ziet men een verhoogde mitotische activiteit van het epitheel, resulterende in grote aantallen immature enterocyten. Door het verlies van epitheelcellen aan de top en rand van de villi, de villusatrofie en het relatief hoog aandeel immature cellen ziet men absorptie- en verteringsstoornissen wat leidt tot klinische symptomen zoals diarree en dehydratie⁶⁰. CCoV wordt in grote aantallen, maar intermitterend, uitgescheiden met de feces gedurende 6-9 dagen^{13,61}. Het virus kan tot 6 maanden uitgescheiden worden nadat de klinische symptomen verdwenen zijn⁶².

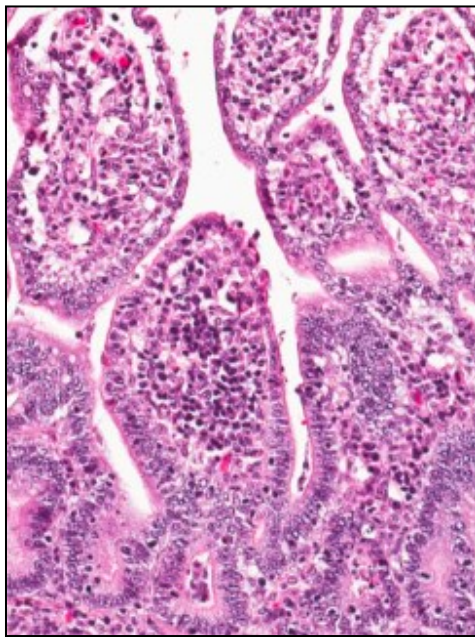


Fig. 15: Erge atrofie van de intestinale villi (Uit Licitra et al, 2014)⁶⁰.

3.1.2 *Canien coronavirus: pantropische vorm*

In 2005 werd voor het eerst bij de hond een hoog pathogene systemische variant van het CCoV type II beschreven met fatale afloop¹⁴. Alle beschreven gevallen van deze pantropische variant blijken te behoren tot het CCoV type IIa⁵⁴.

De eerste gevallen van een fatale systemische infectie door CCoV werd beschreven in Italië¹⁴. Recent werden nieuwe gevallen beschreven in Frankrijk en België⁵⁸, en ook in Latijns-Amerika werden pantropische CCoV II infecties bij puppy's gemeld⁶³. Het belang van CCoV neemt dus toe waardoor deze infectie beschouwd wordt als een 'emerging infectious disease' bij honden⁶⁰. Omdat het hier gaat om een recente ontwikkeling, zijn er nog veel onduidelijkheden omtrent de pathogenese van een pantropische CCoV infectie. Het cel tropisme is tot op heden onbekend, maar het virus wordt teruggevonden in macrofagen van diverse organen⁶⁴. Er werd ook viraal RNA aangetoond in bloedmonocyten, wat wijst op de mogelijkheid om ook deze cellen te infecteren⁵⁹. Om nog onbekende reden is het virus dus in staat om vanuit de darm te spreiden naar andere organen, wat sterk aan FIPV doet denken bij de kat.

3.1.3 *Canien coronavirus: respiratoire vorm*

In 2003 zijn in het Verenigd Koninkrijk ook enkele respiratoire CCoVs infecties opgedoken^{65,66}. Ze vertonen een sterke gelijkenis met het humane en bovine coronavirus, maar zijn duidelijk verschillend van het enterische canien coronavirus⁶⁶. Canien respiratoir coronavirus (CRCoV) veroorzaakt normaal milde respiratoire symptomen en is een etiologisch pathogeen binnen het 'Canine infectious respiratory disease' complex (CIRD) samen met *Bordetella bronchiseptica*, canien adenovirus type 1 en 2, canien parainfluenza, herpesvirus, hondenziektevirus, reovirus en influenza⁵⁹. Infecties met CRCoV treden vrij snel op binnen het CIRD zodat ze vaak als eerste schade toebrengen aan de luchtwegen, wat infecties met andere pathogenen vergemakkelijkt⁶⁷.

3.2 *Symptomen*

3.2.1 *Canien coronavirus: enterische vorm*

Een aantal factoren bepalen of er al dan niet klinische symptomen optreden, zoals leeftijd waarop infectie optreedt, blootstellingsrisico, stress, type virus en maternale immuniteit. Superinfecties met andere pathogenen zoals canien parvovirus (CPV) kunnen het symptoombeeld sterk verergeren met vaak fatale afloop¹³. De meest voorkomende symptomen zijn verlies eetlust, braken, vloeibare diarree en dehydratie⁵⁹. Sterfte treedt slechts uitzonderlijk op wanneer alleen CCoV de oorzaak is. Simultane infectie met andere pathogenen zoals parvovirus verhoogt de mortaliteit sterk⁵⁸.

3.2.2 *Canien coronavirus: pantropische vorm*

Het klinisch beeld van een pantropische CCoV infectie bestaat uit koorts, lethargie, bloederige diarree, erge lymfopenie, neurologische symptomen (ataxie, convulsies), braken en sterfte⁵⁴. Eén van de meest prominent aanwezige afwijkingen is lymfopenie⁵⁵ en leukopenie⁶⁰. Daarnaast kunnen bij

immunohistochemisch onderzoek virale antigenen aangetoond worden in verschillende weefsels zoals de longen, lymfeknopen, lever, milt, nieren, urineblaas en hersenen⁶⁰. Na pathologisch onderzoek van een casegeval in 2007 kon men macroscopisch diffuse hemorrhagische enteritis, hemorrhagisch/sereuze vloeistof in het abdomen, laesies op de viscerale organen en vergroting van mediastinale en mesenteriale lymfeknopen met puntbloedingen waarnemen. Longen en lever waren verkleurd en de milt was vergroot (Fig. 16)⁶⁴.

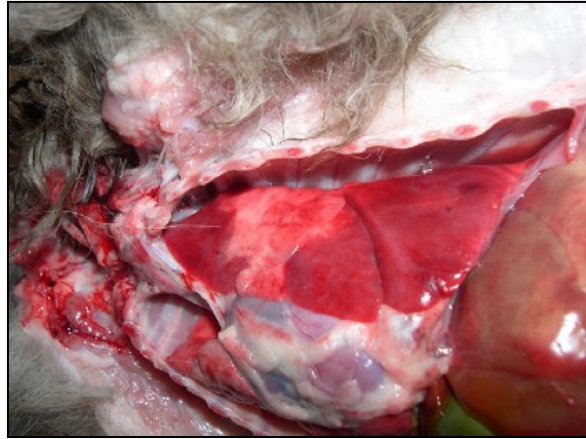


Fig. 16: Aantasting longen en lever. De longen vertonen samenvloeiende rode vlekken. De lever vertoont versmeltende zones van verkleuring (Uit Zappulli et al, 2008)⁶⁴.

In principe zorgen pantropische CCoV voor subklinische infecties en leidt zelden tot de dood. Hierdoor zou een erger ziektebeeld worden gezien bij superinfecties door andere agentia zoals parvovirose en adenovirose type I. Hierdoor kan het zijn dat CCoV vaak onder-gediagnostiseerd wordt⁶⁸. Er wordt zelfs voorgesteld dat een simultane infectie met parvovirose type 2, de verspreiding van CCoV naar andere weefsels in de hand zou kunnen werken⁵⁸.

3.3 Diagnose

Het bevestigen van een vermoeden van een CCoV infectie blijft op dit moment moeilijk⁶⁰. Door het weinig pathogene karakter van de enterische variant wordt een routinematige diagnose zelden uitgevoerd. De seroprevalentie van CCoV is echter hoog (tot 100%)⁶⁹. Met de opkomst van de pantropische vorm, is een betrouwbare diagnostische test welkom. Door het recent optreden van de pantropische vorm is er op dit moment nog weinig informatie ter beschikking over de prevalentie. Momenteel zijn een aantal laboratoriumtesten beschikbaar¹³.

🔬 Virus isolatie (VI)

Virus isolatie van CCoV-II kan gebeuren op A-72 celculturen⁵⁹, maar deze techniek is niet routinematig beschikbaar omdat deze test veel tijd vraagt en bovendien enkel wordt uitgevoerd in gespecialiseerde laboratoria^{60,61}. CCoV vertoont een cytopatisch effect dat zich uit als celdood en vorming van syncytia. CCoV-I kan niet gecultiveerd worden in celculturen⁵⁵.

✚ PCR

Een snellere test met hoge specificiteit en sensitiviteit is PCR. Aan de hand van een RT-PCR kan men makkelijk virussen aantonen ante mortem. Zo kan ook een onderscheid gemaakt worden tussen CCoV-I en CCoV-II⁵⁹. Meer specifieke PCR testen komen in aanmerking om verder te specificeren in serotypen en/of genotypen⁶⁰. Nested-PCR vormt een zeer goede techniek om CCoV op te sporen met hoge sensitiviteit in vergelijking met virus isolatie. Fecale stalen die negatief bevonden zijn met VI kunnen positief zijn met nested-PCR⁶¹.

✚ Serologie

Serologische testen (ELISA,...) zijn van beperkte waarde, omdat men slechts kan aantonen dat er contact is geweest met CCoV, en dat er geen onderscheid kan gemaakt worden tussen de genotypes en serotypes⁶⁰. Ze kunnen eventueel gebruikt worden in epidemiologisch onderzoek om prevalenties te onderzoeken.

✚ Immuunhistochemie

Post-mortem kan men in aangetaste weefsels virale antigenen opsporen. Op deze manier kan men een definitieve diagnose stellen (Fig. 17).

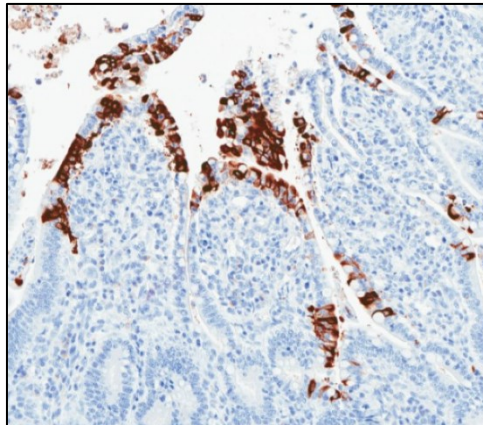


Fig. 17: Coronavirus antigenen in geïnfecteerde enterocyten (Uit Licitra et al, 2014)⁶⁰.

3.4 Behandeling

Momenteel bestaan er geen antivirale geneesmiddelen tegen een CCoV infectie. Curatief kan men enkel ondersteunende therapie verschaffen om klinische symptomen te onderdrukken. Toedienen van vocht en elektrolyten vormen de eerste stappen in de behandeling. Profylactisch behandelen kan met een reeks geïnactiveerde en levende virus vaccins. Vaccinatie kan geen volledige bescherming bieden, doch kan het klinisch verloop temperen. De meeste vaccins zijn gebaseerd op de CCoV-IIa stam waardoor de bescherming tegen CCoV-I en type -IIb (TGEV-achtige) stammen twijfelachtig zijn^{57,60}.

4 Fret coronavirus

Bij de fret kent men twee coronavirussen: fret enterisch coronavirus (FRECV) en fret systemisch coronavirus (FRSCV) en beide geven een verschillend ziektebeeld. FRECV veroorzaakt epizoötische katarrhale enteritis (ECE) en FRSCV toont een klinisch beeld zoals FIP bij de kat. Beide virussen zijn nauw verwant, maar men weet niet of het om twee totaal verschillende virussen gaat of dat FRSCV zou ontstaan uit FRECV⁷⁰.

4.1 Pathogenese en letsels

4.1.1 Fret enterisch coronavirus (FRECV)

Eenmaal dit enteropathogeen virus binnengeraakt in opvangcentra, kennels of bij gezinnen veroorzaakt het al snel ziekte bij alle dieren die samen gehuisvest zijn. De ziekte wordt gekenmerkt door een hoge morbiditeit (tot 100%) en lage mortaliteit (<5%). Oudere dieren blijken de ergste symptomen te vertonen, terwijl bij jonge dieren eerder milde symptomen de kop opsteken⁶. Hoe de virustransmissie gebeurt is nog steeds onbekend, maar de feco-orale route lijkt het meest aannemelijk⁷⁰.

Dieren aangetast met ECE vertonen hyperemie en verdunning van de darmwand op de plaatsen waar het virus vermeerderd. Zoals bij FECV en CCoV ziet men verkorten, fusie en atrofie van de darmvilli door vaculaire degeneratie van het apicaal epitheel van de darmvilli⁶. Dit alles resulteert in stinkende geelgroene diarree met mucus^{71,72}.

4.1.2 Fret systemisch coronavirus (FRSCV)

FRSCV veroorzaakt een infectieuze aandoening die sterk vergelijkbaar is met feliene infectieuze peritonitis bij de kat en dan vooral de droge of niet-effusieve vorm⁶. Vooral de granulomateuze letsels doen denken aan FIP⁷³. Sommige auteurs noemen dit *granulomatous inflammatory syndrome* (GIS)⁷¹. Typisch zoals bij FIP kan men ook via immunohistochemie antigenen van FRSCV aantonen in macrofagen (Fig. 18)^{6,73}.

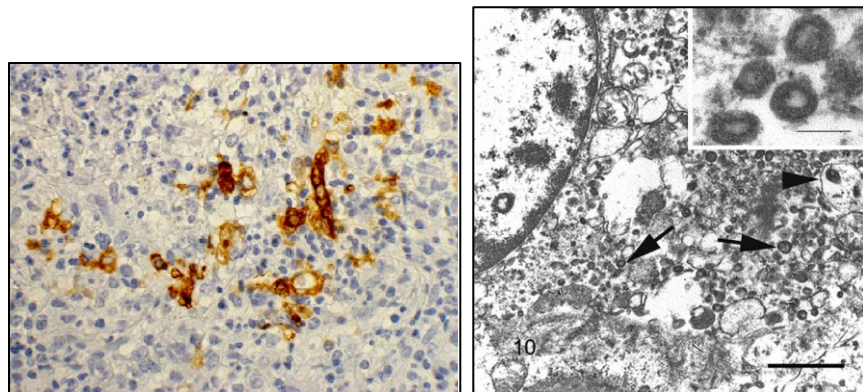


Fig. 18: Links: Macrofagen positief voor coronavirus antigen in het longweefsel van een fret na natuurlijke infectie (Uit Martínez et al, 2008)⁷³. **Rechts:** Mesenteritis. Macrofagen met intracellulaire virions (pijlen) en virions in vacuoles (pijlhoofd) (Uit Garner et al, 2008)¹⁵.

Vermoedelijk kent FRSCV een gelijkaardig ontstaan zoals FIP. FRSCV vertoont namelijk een zeer sterke gelijkenis met FRECV, en zou bij persisterende infectie kunnen ontstaan na mutatie uit FRECV. Tot op heden is dit echter nog niet experimenteel bevestigd⁶.

Het peritoneum, maar vooral de intestinale serosae en het mesenterium vertonen de ergste letsels bestaande uit wit-bruine onregelmatige verhevenheden van 0,5 tot 2 cm verspreid over het serosaal oppervlak. Dit zijn de granuloma's die het beeld van een FIP infectie oproepen (Fig. 19). Lever, nieren, milt en longen vertonen deze letsels ook regelmatig, hetzij oppervlakkig of meer penetrerend in het parenchym.

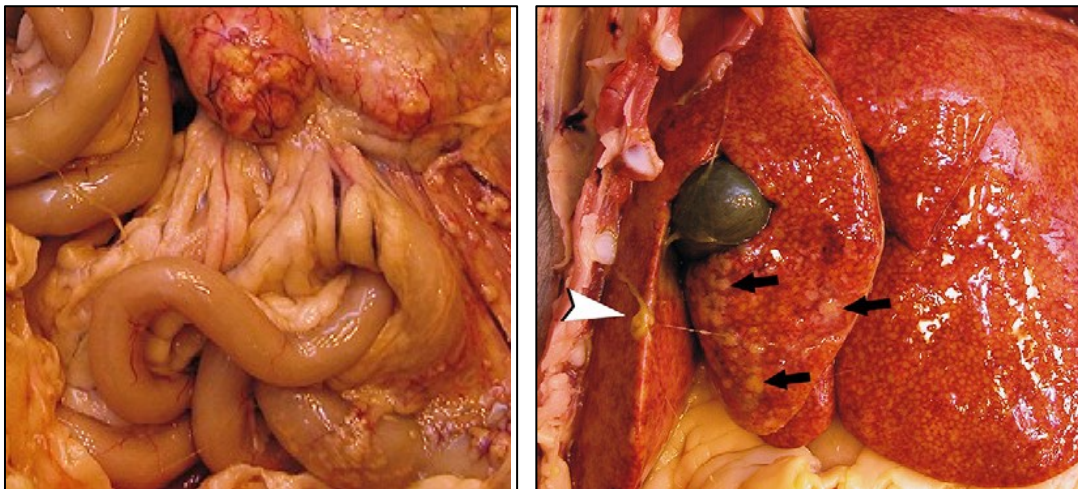


Fig. 19: Links: Granulomateuze peritonitis ten gevolge van een FRSCV infectie. Rechts: Granulomateuze hepatitis en fibrineuze peritonitis ten gevolge van een FRSCV infectie (Uit Murray et al, 2010)⁶.

Zoals bij FIP ziet men bij de mesenteriale lymfeknopen een vergroting en onregelmatigheid van het oppervlak (Fig. 20). Vaak zijn talrijke nodules aanwezig⁶.

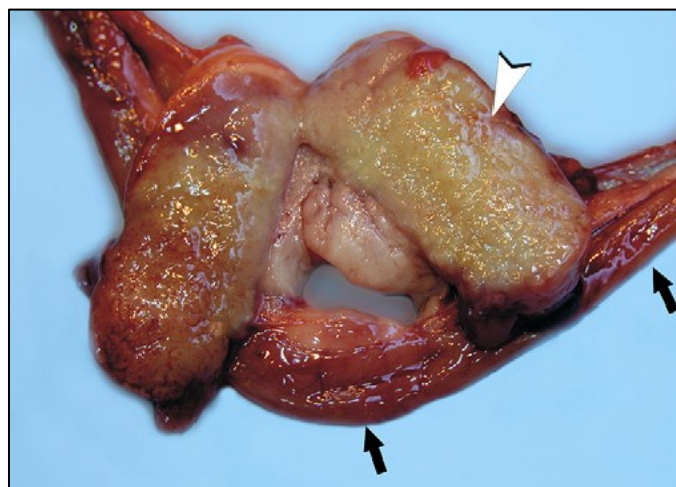


Fig. 20: Granulomateuze lymfadenitis: Doorsnede door het jejunum (zwarte pijlen) en sterk vergrote mesenteriale lymfeknoep met granulomateuze ontsteking (Uit Murray et al, 2010)⁶.

Diverse andere letsels en afwijkingen kunnen ontstaan zoals splenomegalie (Fig. 21, links), renomegalie, hepatomegalie, niet-regeneratieve anemie, lage albumine/globuline ratio, hypergammaglobulinemie (Fig. 21, rechts)⁷¹ en zwakte in de achterhand. Sereuze effusie door vasculitis zoals bij FIP wordt minder vaak gezien. In tegenstelling tot bij FIP komt zelden fibrineus exsudaat voor⁶. Neurologische symptomen zoals leptomeningitis, choroïditis ependymitis en encephalomyelitis worden ook bechreven⁶.

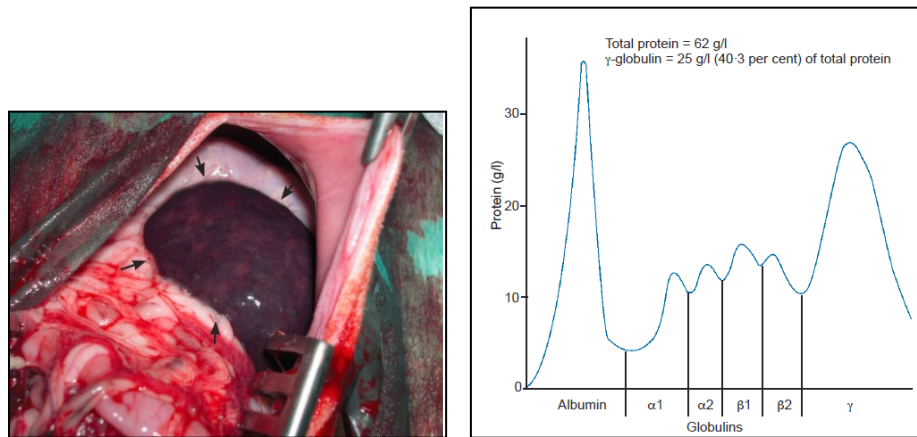


Fig. 21: Links: Splenomegalie. **Rechts:** Polyclonale hypergammaglobulinemie in een fret met GIS (Uit Perpiñán et al, 2008)⁷¹.

4.2 Diagnose

De voornaamste differentiaal diagnoses voor fretten met mesenteriale lymfadenopathie en hypergammaglobulinemie zijn Aleutian disease (parvovirose), lymfoma en chronic inflammatory bowel disease⁷¹. Ook chronische infecties door *helicobacter* en multiple myeloma komen hiervoor in aanmerking⁶. Voorlopig stelt men de diagnose op basis van de geschiedenis van het dier, de klinische symptomen en pathologische bevindingen. Voor het nemen van biopsieën kan men laparoscopische technieken gebruiken⁷¹. Deze biopsiestalen kunnen onderzocht worden met histologie/immunohistochemie (Fig. 22). Momenteel is dit de gouden standaard voor de diagnose van FRSCV⁷⁰.

Bloedonderzoek geeft regelmatig gestegen serum lipase, ALP, GGT en gammaglobulines. Na urine analyse vindt men soms proteïnurie, bloed en groene urine (vermoedelijk door billiverdine). Deze bevindingen zijn suggestief voor een FRSCV infectie, maar zijn niet sluitend. Uitscheiders kunnen opgespoord worden met een RT-PCR assay op fecale stalen/swabs⁶.

Via immunohistochemie kan een sluitende diagnose gesteld worden door het aantonen van coronavirus in macrofagen in de granulomen. De gebruikte antilichamen maken echter geen onderscheid tussen FRECV en FRSCV. Momenteel gebeurt deze differentiatie via twee RT-PCR assays op basis van een deel van het spike gen⁶.

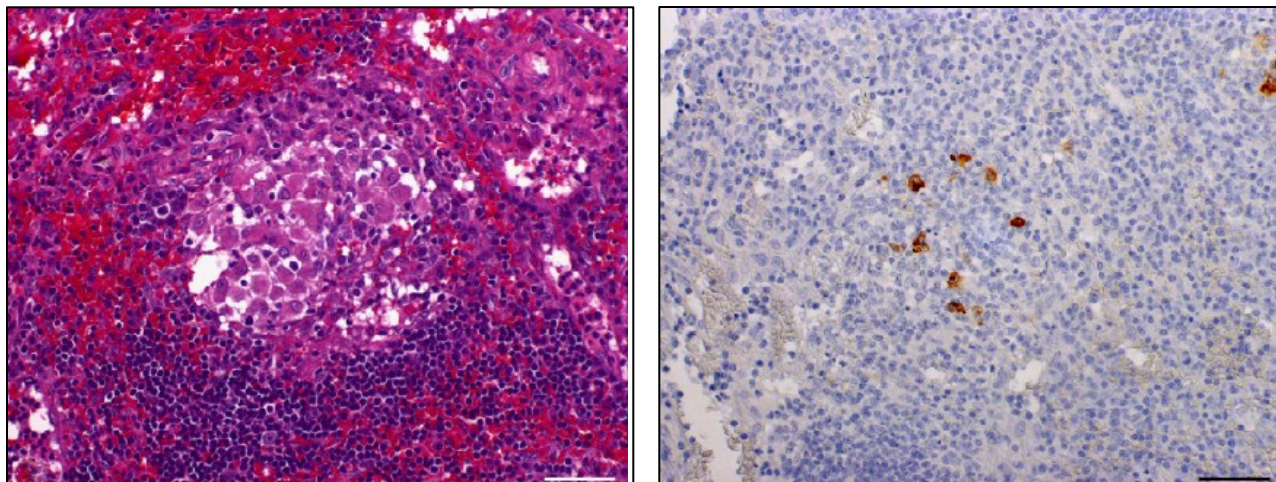


Fig. 22: Geïnfekteerde lymfeknoop. **Links:** Histologie (HE): granuloma zonder necrose met centraal macrofagen omgeven door lymfoplasmocytair cellen. **Rechts:** Immunohistochemie: aanwezigheid van coronavirus antigen het centrum van het granuloma (Uit Martínez et al, 2008)⁷³.

4.3 Behandeling

Immunosuppressiva zoals prednisolone en azathioprine kunnen gebruikt worden om het immuunapparaat te onderdrukken. Naast het onderdrukken van de immuniteit kan men ook proberen de immuniteit te stimuleren om FRSCV te elimineren. Producten zoals polyprenyl immunostimulantia en interferon werden reeds bij de droge variant van FIP getest en gaven enig effect, maar studies voor het gebruik bij fretten zijn nodig⁶.

Reductie van vasculitis door in te spelen op de verwekkende factoren (TNF- α , IL-1 bèta, MMP-9, MHC-II) kan bijdragen tot het milderen van de symptomen. Geneesmiddelen die hiervoor in aanmerking komen zijn o.a. pentoxifylline, doxycycline.

Deze medicatie kan gebruikt worden om de levensduur te verlengen, doch bieden geen volledig herstel. FRSCV is bijna steeds fataal voor fretten, waardoor de behandeling eerder symptomatisch zal zijn. Aangezien diarree een hoofdsymptoom is, zal vochttoediening een belangrijke plaats innemen in de behandeling. Bloedtransfusies en toedienen van colloïde kunnen ook nuttig zijn. Braken en misselijkheid kunnen behandeld worden met maropitant citraat of metoclopramide. Bescherming van de maagmucosa tegen ulcera veroorzaakt door hoge dosissen prednisolone met bijvoorbeeld sucralfaat zijn belangrijk.

Verder dient voorzien te worden in goede voeding met voldoende inhoud, daar de fretten vaak slecht eten tijdens de ziekte. Voedingssupplementen, vitaminen, mineralen en eventueel antioxidanten kunnen een bijkomende bescherming bieden⁶.

Algemene conclusie

Sinds de opkomst van FIP zijn vele pogingen ondernomen om deze fatale aandoening te doorgronden, maar hoewel er op heden veel vooruitgang geboekt is, zijn er nog vele vragen die onbeantwoord blijven. Om een doeltreffende therapie te kunnen ontwikkelen is de kennis van de pathogenese, die nog steeds onvolledig gekend is, onontbeerlijk. Bovendien is het belangrijk om de ziekte in een vroeg stadium te kunnen diagnosticeren om de kans op herstel te kunnen garanderen. De vele pogingen tot behandeling van aangetaste dieren hebben tot nu toe weinig vruchten afgeworpen, met als gevolg dat euthanasie vaak de enige uitweg is. De soms vage klinische klachten bemoeilijken langs de andere kant vaak een correcte diagnose zodat vaak te vlug FIP wordt gediagnosticeerd en te snel tot euthanasie wordt overgegaan. De voornaamste doelstellingen omtrent FIP zijn momenteel de opheldering van de pathogenese voor het vinden van een doeltreffende behandeling. Daarnaast zal het ook essentieel zijn om een goede diagnostische test te ontwikkelen die toelaat om FIP reeds te detecteren vooraleer het virus al enorme schade heeft kunnen aanrichten.

Preventie van FECV infecties is momenteel de enige mogelijkheid in de bestrijding van FIP. Om het risico op FIP zo veel mogelijk te reduceren binnen kwekerijen kan men trachten de dieren FECV vrij te krijgen door alle dieren te testen via feces. Aangetaste dieren worden apart gehuisvest tot geen uitscheiding meer optreedt. Aankoop van geïnfecteerde dieren en contact met wilde katten is uit den boze. Het delen van kattenbakken tussen dragers en gevoelige dieren werkt ook de spreiding in de hand. Het is duidelijk dat door de makkelijke spreiding van FECV in populaties het bijna onmogelijk is om alle dieren FECV negatief te krijgen, laat staan om deze status te behouden. Toch is het mits voldoende doorzettingsvermogen van de eigenaars zeker haalbaar.

Het pantropische CCoV bij de hond en het FRSCV bij de fret zijn momenteel nog niet in grote aantallen aangetroffen, maar blijken een opmars te maken. Deze bevindingen zijn verontrustend, daar eenmaal deze aandoeningen vaker zullen optreden, de noodzaak zal ontstaan naar gepaste diagnostische tools en behandelingen. De enterische varianten van deze virussen zijn zoals FECV bij de kat van weinig belang naar de gezondheid toe van het dier. Echter door de sterke gelijkenis met een FIP infectie bij de kat, is er een sterk vermoeden dat respectievelijk ook bij de hond en de fret een pantropische CCoV infectie en een FRSCV een gelijkaardig ontstaan kent.

Door de recente ontwikkeling van feline enterocytiijnen kan de replicatie van FCoVs verder bestudeerd worden en kan de pathogenese verder uitgedokterd worden. Idealiter zouden ook voor honden en fretten intestinale cellijnen gecreëerd moeten worden om interacties met coronavirussen te onderzoeken. Door het vermoeden dat deze kunnen spreiden naar andere organen via invasie van monocytten zoals bij de kat, zou een monocytencellijn ook nieuwe inzichten kunnen verschaffen. Het *in vitro* bestuderen van coronavirussen kan dus heel wat bijdragen in het verwerven van nieuwe kennis omtrent systemische

coronavirusinfecties. In de diergeneeskunde blijft het echter moeilijk om al dit onderzoek te financieren, daar het vrij zeldzame karakter van deze systemische infecties en de toch nog lage populariteit van de fret als huisdier. Daarnaast moet de eigenaar ook bereid zijn om dure diagnostische testen en behandelingen te betalen, zonder enige zekerheid op herstel van het dier.

Referenties

1. Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol.* 1998;72(5):4508-4514.
2. Drechsler Y, Alcaraz A, Bossong FJ, Collisson EW, Diniz PP. Feline coronavirus in multicat environments. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41(6):1133-1169.
3. Horhoge, Cristina. Feline Infectious Peritonitis: Clinical and Anatomopathological Aspects. *Veterinary Medicine.* 2011;68(2):6.
4. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses.* 2012;4(6):1011-1033.
5. Terada Y, Matsui N, Noguchi K, et al. Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One.* 2014;9(9):e106534.
6. Murray J, Kiupel M, Maes RK. Ferret coronavirus-associated diseases. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2010;13(3):543-560.
7. Bálint Á, Farsang A, Zádori Z, et al. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol.* 2012;86(11):6258-6267.
8. Vlasova AN, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Spiro DJ, Saif LJ. Molecular characterization of a new species in the genus Alphacoronavirus associated with mink epizootic catarrhal gastroenteritis. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 6):1369-1379.
9. East ML, Moestl K, Benetka V, et al. Coronavirus infection of spotted hyenas in the Serengeti ecosystem. *Vet Microbiol.* 2004;102(1-2):1-9.
10. Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJ. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 2):415-420.
11. Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1445-1452.
12. Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology.* 1998;243(1):150-157.
13. Naylor MJ, Harrison GA, Monckton RP, McOrist S, Lehrbach PR, Deane EM. Identification of canine coronavirus strains from feces by S gene nested PCR and molecular characterization of a new Australian isolate. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):1036-1041.
14. Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(3):492-494.
15. Garner MM, Ramsell K, Morera N, et al. Clinicopathologic features of a systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in the domestic ferret (*Mustela putorius*). *Vet Pathol.* 2008;45(2):236-246.
16. Dewerchin, L., Hannah. *Characterization of putative immune evasion mechanisms of feline infectious peritonitis virus*, Ghent University; 2008.
17. Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *Vet J.* 2014;201(2):123-132.
18. Tekes G, Hofmann-Lehmann R, Bank-Wolf B, Maier R, Thiel HJ, Thiel V. Chimeric feline coronaviruses that encode type II spike protein on type I genetic background display accelerated viral growth and altered receptor usage. *J Virol.* 2010;84(3):1326-1333.
19. Desmarests LM, Theuns S, Olyslaegers DA, et al. Establishment of feline intestinal epithelial cell cultures for the propagation and study of feline enteric coronaviruses. *Vet Res.* 2013;44:71.
20. Pedersen, C., Niels. Understanding Feline Infectious Peritonitis.8.
21. Desmarests LM, Theuns S, Roukaerts ID, Acar DD, Nauwynck HJ. Role of sialic acids in feline enteric coronavirus infections. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 9):1911-1918.
22. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(4):635-664.
23. Pedersen, C., Niels. An Overview of Feline Enteric Coronavirus and Infectious Peritonitis Virus Infections. Davis, California School of Veterinary Medicine; 1995.

24. Pedersen NC, Allen CE, Lyons LA. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg*. 2008;10(6):529-541.
25. Herrewegh AA, Mähler M, Hedrich HJ, et al. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*. 1997;234(2):349-363.
26. Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol*. 2005;79(22):14122-14130.
27. Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg*. 2009;11(4):225-258.
28. Diaz JV, Poma R. Diagnosis and clinical signs of feline infectious peritonitis in the central nervous system. *Can Vet J*. 2009;50(10):1091-1093.
29. Perlman S, Dandekar AA. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):917-927.
30. Cornelissen E, Dewerchin HL, Van Hamme E, Nauwynck HJ. Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells isolated from cats with FIP. *Vet Microbiol*. 2007;121(1-2):131-137.
31. Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol*. 2005;150(12):2483-2500.
32. Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 6):1685-1690.
33. Dewerchin HL, Cornelissen E, Van Hamme E, Smits K, Verhasselt B, Nauwynck HJ. Surface-expressed viral proteins in feline infectious peritonitis virus-infected monocytes are internalized through a clathrin- and caveolae-independent pathway. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 11):2731-2740.
34. Dedeurwaerder, Annelike. *Feline infectious peritonitis virus accessory proteins and type I interferon are fighting for dominance*. University Ghent.
35. Takano T, Hohdatsu T, Toda A, Tanabe M, Koyama H. TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology*. 2007;364(1):64-72.
36. Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J Virol*. 1996;70(12):8977-8983.
37. Dedeurwaerder A, Desmarets LM, Olyslaegers DA, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet Microbiol*. 2013;162(2-4):447-455.
38. Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol*. 2014;51(2):505-526.
39. Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, et al. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2009;11(7):594-604.
40. Kipar A, May H, Menger S, Weber M, Leukert W, Reinacher M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol*. 2005;42(3):321-330.
41. Hayashi T, Utsumi F, Takahashi R, Fujiwara K. Pathology of non-effusive type feline infectious peritonitis and experimental transmission. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1980;42(2):197-210.
42. Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, Poland A, Pedersen NC. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med*. 1998;12(6):415-423.
43. Foley JE, Rand C, Leutenegger C. Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg*. 2003;5(6):313-322.
44. Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J*. 2014;201(2):133-141.
45. Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, et al. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med*. 2003;17(6):781-790.
46. Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA, Alazawy A. Diagnostic methods for feline coronavirus: a review. *Vet Med Int*. 2010;2010.
47. Fischer, Y. Die Rivalta-Probe als diagnostisches Mittel bei feline Ergüssen – Evaluierung von optimalen Reaktions- und Lagerungsbedingungen. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*. 2013;41:297-303.

48. Jeffery U, Deitz K, Hostetter S. Positive predictive value of albumin: globulin ratio for feline infectious peritonitis in a mid-western referral hospital population. *J Feline Med Surg*. 2012;14(12):903-905.
49. Myrrha LW, Silva FM, Peternelli EF, Junior AS, Resende M, de Almeida MR. The paradox of feline coronavirus pathogenesis: a review. *Adv Virol*. 2011;2011:109849.
50. Paltrinieri S, Saverio P, Giordano A, et al. Critical assessment of the diagnostic value of feline alpha1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios approach. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19(3):266-272.
51. Desmarets, Lowiese. *Tracing back roots: unravelling feline enteric coronavirus pathogenesis to combat felineinfectious peritonitis*, Ghent University; 2015.
52. Litster AL, Pogradichniy R, Lin TL. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *Vet J*. 2013;198(2):362-366.
53. Hartmann K, Ritz S. Treatment of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;123(1-2):172-175.
54. Le Poder S. Feline and canine coronaviruses: common genetic and pathobiological features. *Adv Virol*. 2011;2011:609465.
55. Licitra BN, Whittaker GR, Dubovi EJ, Duhamel GE. Genotypic characterization of canine coronaviruses associated with fatal canine neonatal enteritis in the United States. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4230-4238.
56. Pratelli A, Decaro N, Tinelli A, et al. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2004;42(4):1797-1799.
57. Decaro N, Mari V, Elia G, et al. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):41-47.
58. Zicola A, Jolly S, Mathijs E, et al. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *J Small Anim Pract*. 2012;53(5):297-300.
59. Decaro N, Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol*. 2008;132(3-4):221-234.
60. Licitra BN, Duhamel GE, Whittaker GR. Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses*. 2014;6(8):3363-3376.
61. Pratelli A, Buonavoglia D, Martella V, Tempesta M, Lavazza A, Buonavoglia C. Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. *J Virol Methods*. 2000;84(1):91-94.
62. Pratelli A. The evolutionary processes of canine coronaviruses. *Adv Virol*. 2011;2011:562831.
63. Pinto LD, Barros IN, Budaszewski RF, et al. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil. *Vet J*. 2014.
64. Zappulli V, Caliarì D, Cavicchioli L, Tinelli A, Castagnaro M. Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: pathological findings and immunohistochemistry. *Res Vet Sci*. 2008;84(2):278-282.
65. Erles K, Toomey C, Brooks HW, Brownlie J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*. 2003;310(2):216-223.
66. Vieson, D., Miranda. A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2012;3:25-39.
67. Erles K, Dubovi EJ, Brooks HW, Brownlie J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4524-4529.
68. Decaro N, Cordonnier N, Demeter Z, et al. European surveillance for pantropic canine coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):83-88.
69. Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet Rec*. 1993;132(1):7-11.
70. Graham E, Lamm C, Denk D, Stidworthy MF, Carrasco DC, Kubiak M. Systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in ferrets in the UK. *Vet Rec*. 2012;171(8):200-201.
71. Perpiñán D, López C. Clinical aspects of systemic granulomatous inflammatory syndrome in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Rec*. 2008;162(6):180-184.
72. Provacia LB, Smits SL, Martina BE, et al. Enteric coronavirus in ferrets, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(8):1570-1571.

73. Martínez J, Reinacher M, Perpiñán D, Ramis A. Identification of group 1 coronavirus antigen in multisystemic granulomatous lesions in ferrets (*Mustela putorius furo*). *J Comp Pathol*. 2008;138(1):54-58.