

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**SPREMLJANJE VNETNEGA ODGOVORA PRI
MAČKAH Z MAČJIM INFEKCIJSKIM
PERITONITISOM**

**MONITORING THE INFLAMMATORY
RESPONSE IN CATS WITH FELINE INFECTIOUS
PERITONITIS**

Marjeta Štrljč in Lina Tršar

Ljubljana, 2024

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 005.584.1:578.834:616.381-002:636.8(043.2)

**SPREMLJANJE VNETHNEGA ODGOVORA PRI MAČKAH
Z MAČJIM INFEKCIJSKIM PERITONITISOM**

**MONITORING THE INFLAMMATORY RESPONSE IN
CATS WITH FELINE INFECTIOUS PERITONITIS**

Marjeta Štrlič in Lina Tršar

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju
Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom
doc. dr. Darje Pavlin na Kliniki za male živali
Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

Ljubljana, 2024

SPREMLJANJE VNETNEGA ODGOVORA PRI MAČKAH Z MAČJIM INFEKCIJSKIM PERITONITISOM

IZVLEČEK

Ključne besede: mačji infekcijski peritonitis, FIP, GS-441524, reakcija akutne faze

Namen raziskovalne naloge je bil določiti koncentracijo izbranih krvnih parametrov pri mačkah pred in po zdravljenju mačjega infekcijskega peritonitisa (FIP) z zdravilom, ki vsebuje učinkovino GS-441524. Poleg tega smo želeli ugotoviti, ali bi lahko kateri od vnetnih parametrov služil za spremljanje učinka zdravljenja. V raziskavo smo vključili 35 mačk, 23 z mokro in 12 s suho obliko FIP-a ter 28 zdravih mačk kot kontrolno skupino. Statistično smo ovrednotili izbrane hematološke in biokemijske parametre, serumsko koncentracijo haptoglobina, feritina in treh najpomembnejših mačjih proinflammatoryh citokinov, to so interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) in tumorje nekrotizirajoči dejavnik-alfa (TNF- α). Poleg tega smo iz rezultatov hematoloških preiskav, tj. koncentracij posameznih vrst levkocitov in trombocitov, izračunali hematološke markerje vnetja. Pri mačkah s FIP-om smo pri večini parametrov izmerjenih pred terapijo ugotovili značilno razliko v primerjavi z zdravimi mačkami. Prisotnost vnetja pri mačkah s FIP-om potrjujejo levkocitoza z nevtrofilijo in limfopenijo, povišana koncentracija haptoglobina in hiperglobulinemija. Primerjava skupin s suho in mokro obliko bolezni je pokazala, da sta bili pred terapijo vrednosti NLR (razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov) in SII (sistemski imunsko-vnetni indeks) značilno višji pri mokri obliki. Primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja med mačkami glede na prisotnost očesnih znakov je pokazala značilno nižjo koncentracijo limfocitov ter vrednost TLR (razmerje med koncentracijo trombocitov in limfocitov) in SII po terapiji pri mačkah z očesnimi znaki. Pri primerjavi hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja med mačkami glede na prisotnost nevroloških znakov nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Serumsko koncentracija proinflammatoryh citokinov in feritina se ni razlikovala med mačkami s FIP-om in zdravimi mačkami, prav tako nismo ugotovili razlik v aktivnosti LDH. Potrdili smo tudi pozitivno povezavo med koncentracijo haptoglobina in feritina s hematokritom, kar kaže na povezavo med vnetjem in anemijo. Po terapiji je prišlo do normalizacije večine preučevanih parametrov, kar kaže na klinično učinkovitost zdravila.

MONITORING THE INFLAMMATORY RESPONSE IN CATS WITH FELINE INFECTIOUS PERITONITIS

ABSTRACT

Key words: feline infectious peritonitis, FIP, GS-441524, acute phase reaction

The aim of our study was to investigate the concentration of selected blood parameters in cats before and after treatment of feline infectious peritonitis (FIP) with a drug containing the active substance GS-441524. We also wanted to determine whether any of the inflammatory parameters could be used to monitor the progress of treatment. We enrolled 35 cats with FIP (23 with effusive and 12 with non-effusive form) and 28 healthy cats. We statistically selected haematological and biochemical parameters, serum concentrations of haptoglobin and ferritin as well as the three main feline proinflammatory cytokines: Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). We also evaluated selected hemogram-derived inflammatory markers before and after treatment of FIP cats. In cats with FIP, we found a significant difference in most parameters measured before therapy compared to healthy cats. The presence of inflammation in cats with FIP is confirmed by leukocytosis with neutrophilia and lymphopenia, increased haptoglobin concentration and hyperglobulinaemia. We also found that cats with effusive FIP had significantly higher NLR (neutrophil-to-lymphocyte ratio) and SII (systemic inflammatory index) values compared to cats with non-effusive FIP. Cats with ocular manifestations of FIP had significantly lower concentrations of lymphocytes, PLR (platelet to lymphocyte ratio) and SII after therapy. There were no significant differences in haematological parameters between the patients with neurological symptoms and those without. The results of our study showed no changes in serum concentrations of proinflammatory cytokines, ferritin and LDH activity between cats with FIP and healthy cats. We also confirmed a positive correlation between haptoglobin or ferritin and haematocrit, indicating a link between inflammation and anaemia. After treatment, most of the investigated parameters normalised, indicating the clinical efficacy of the drug.

KAZALO VSEBIN

1	UVOD	13
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	13
1.2	CILJ RAZISKOVANJA	14
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	14
2	PREGLED LITERATURE	16
2.1	ETIOLOGIJA	16
2.2	EPIZOOTIOLOGIJA	17
2.2.1	Biotip FECV	17
2.2.2	Biotip FIPV	18
2.3	PATOGENEZA	18
2.4	REAKCIJA AKUTNE FAZE PRI MAČKAH	20
2.4.1	Serumski amiloid A (SAA)	21
2.4.2	Alfa-1-kisli glikoprotein (AGP)	21
2.4.3	Haptoglobin	22
2.4.4	Feritin	22
2.5	KLINIČNA SLIKA	23
2.5.1	Biotip FECV	23
2.5.2	Biotip FIPV	23
2.6	DIAGNOSTIKA	24
2.6.1	Anamneza in klinični pregled	25
2.6.2	Hematološke preiskave	25
2.6.3	Hematološki markerji vnetja	26
2.6.4	Biokemijska preiskava	27
2.6.5	Laktat-dehidrogenaza (LDH)	28
2.6.6	Elektroforeza serumskih beljakovin	29
2.6.7	Slikovna diagnostika	29
2.6.8	Analiza tekočine	29
2.6.9	Indirektne diagnostične metode	30

2.6.10	Direktne diagnostične metode	30
2.7	TERAPIJA	32
2.7.1	Protivirusne učinkovine proti FCoV.....	32
2.7.2	Podporna terapija.....	35
3	MATERIALI IN METODE	36
3.1	IZBOR PACIENTOV.....	36
3.2	KLINIČNI PODATKI.....	36
3.3	ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV KRVI.....	37
3.4	HEMATOLOŠKE PREISKAVE IN HEMATOLOŠKI MARKERJI VNETJA	37
3.5	BIOKEMIJSKE PREISKAVE.....	38
3.6	CITOKINI IN PROTEINI AKUTNE FAZE VNETJA	38
3.7	STATISTIČNA ANALIZA.....	39
4	REZULTATI	41
4.1	OPISNI PODATKI MAČK.....	41
4.2	HEMATOLOŠKI PARAMETRI IN HEMATOLOŠKI MARKERJI VNETJA	42
4.3	BIOKEMIJSKI PARAMETRI.....	51
4.4	CITOKINI IN PROTEINI AKUTNE FAZE VNETJA	53
4.4.1	Tumorje nekrotizirajoči dejavnik- α	53
4.4.2	Interlevkin-1 β	53
4.4.3	Interlevkin-6.....	53
4.4.4	Haptoglobin.....	55
4.4.5	Feritin.....	55
4.5	POVEZAVE PARAMETROV PRED IN PO TERAPIJI	56
5	RAZPRAVA.....	59
6	SKLEPI.....	69
7	POVZETEK.....	71
8	SUMMARY	74

9	ZAHVALE	76
10	LITERATURA	77
11	PRILOGE	94

KAZALO TABEL

Tabela 1: Telesna masa pri zdravljenih mačkah pred in po zdravljenju FIP-a in kontrolni skupini mačk.....	42
Tabela 2: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri skupini mačk pred in po zdravljenju FIP-a in kontrolni skupini mačk.....	43
Tabela 3: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pred in po zdravljenju FIP-a.....	45
Tabela 4: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri mačkah s suho in mačkah z mokro obliko FIP-a pred in po zdravljenju.....	46
Tabela 5: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri mačkah z in brez očesnih znakov pred in po zdravljenju FIP-a.....	48
Tabela 6: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri mačkah z in brez nevroloških znakov pred in po zdravljenju FIP-a.....	50
Tabela 7: Izbrani biokemijski parametri pred in po zdravljenju FIP-a ter njihove referenčne vrednosti.....	52
Tabela 8: Značilne ($p \leq 0,05$) povezave izmerjenih parametrov pri mačkah s FIP-om pred zdravljenjem.....	57
Tabela 9: Značilne ($p \leq 0,05$) povezave izmerjenih parametrov pri mačkah s FIP-om po zdravljenju.....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Koncentracije tumorje nekrotizirajočega dejavnika-alfa (TNF- α) (A), interlevkina-1 β (IL-1 β) (B) in interlevkina-6 (IL-6) (C) pred in po zdravljenju FIP-a ter pri kontrolni skupini zdravih mačk	54
Slika 2: Koncentracije haptoglobina (A) in feritina (B) pred in po zdravljenju FIP-a ter pri kontrolni skupini zdravih mačk	56

SEZNAM PRILOG

Priloga 1: Algoritem za diagnostiko in monitoring FIP-a

Priloga 2: Darja PAVLIN, Alenka NEMEC SVETE, Lina TRŠAR, Marjeta ŠTRLJIČ, Nataša TOZON, COMPARISON OF SELECTED HEMATOLOGY MARKERS IN CATS WITH FIP BEFORE AND AFTER THERAPY. Prispevek sprejet za predstavitev na simpoziju ISCAID (International Society for Companion Animal Infectious Diseases), Glasgow, 4.-7.9.2022.

Priloga 3: Darja PAVLIN, Alenka NEMEC SVETE, Lina TRŠAR, Marjeta ŠTRLJIČ, Saša KOPRIVEC, Nataša TOZON, DYNAMICS OF SELECTED INFLAMMATORY MARKERS DURING TREATMENT OF FIP IN CATS. Prispevek sprejet za predstavitev na kongresu ECVIM-Ca (European College of Veterinary Internal Medicine – Companion animals), Barcelona, 21.-23.9.2023.

Priloga 4: Darja PAVLIN, Marjeta ŠTRLJIČ, Lina TRŠAR, Alenka NEMEC SVETE, Martina KROFIČ ŽEL, Saša KOPRIVEC, Nataša TOZON, HEMATOLOŠKI MARKERJI VNETJA PRI MAČKAH Z MAČJIM INFEKCIOSNIM PERITONITISOM. Prispevek sprejet za predstavitev na Slovenskem veterinarskem kongresu, Portorož, 3.-5.10.2024.

Priloga 5: Lina TRŠAR, Marjeta ŠTRLJIČ, Alenka NEMEC SVETE, Saša KOPRIVEC, Nataša TOZON, Martina KROFIČ ŽEL, Darja PAVLIN, EVALUATION OF SELECTED INFLAMMATORY MARKERS IN CATS WITH FELINE INFECTIOUS PERITONITIS BEFORE AND AFTER THERAPY. Članek poslan v revijo BMC Veterinary Science, v recenziji od 6.4.2024.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ABCD: Evropski svetovni odbor o mačjih boleznih (angl. European Advisory Board on Cat Diseases)

A/G: razmerje med albumini in globulini

AGP: alfa-1-kisli glikoprotein

ALT: alanin-aminotransferaza

ALB: albumini

CB: koncentracija celokupnih beljakovin (angl. TP, Total protein concentration)

COVID-19: koronavirusna bolezen 2019 (angl. Coronavirus Disease 2019)

CRP: C-reaktivni protein

ELISA: encimsko imunski test (angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ERI: številčna koncentracija eritrocitov (RBC, angl. Red Blood Cells)

FCoV: mačji koronavirus angl. (angl. Feline Coronavirus)

FIP: mačji infekcijski peritonitis (angl. Feline Infectious Peritonitis)

FIPV: virus mačjega infekcijskega peritonitisa (angl. Feline Infectious Peritonitis Virus)

FECV: mačji enterični koronavirus (angl. Feline Enteric Coronavirus)

fAPN: encim mačje aminopeptidaze N (angl. Feline Aminopeptidase N)

FIV: mačji virus imunske pomanjkljivosti (angl. Feline Immunodeficiency Virus)

FELV: virus mačje levkoze (angl. Feline Leukemia Virus)

FPV: mačji parvovirus (angl. Feline Parvovirus)

GLOB: globulini

GM-CSF: granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (angl. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)

G-CSF: granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (angl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor)

HGB: koncentracija hemoglobina

HT: hematokrit (angl. HCT, Hematocrit)

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-6: interleukin-6

IQR: interkvartilni razmik (angl. Interquartile range)

LEVKO: številčna koncentracija levkocitov (WBC, angl. White Blood Cells)

LMR: razmerje med koncentracijo limfocitov in monocitov

LIMFO: koncentracija limfocitov (LYMPH, angl. Lymphocytes)

LDH: laktat-dehidrogenaza

MLR: razmerje med koncentracijo monocitov in limfocitov

MONO: koncentracija monocitov

MERS: bližnjevzhodni respiratorni sindrom (angl. Middle East Respiratory Syndrome)

NLR: razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov

NEVTRO: koncentracija nevtrofilnih granulocitov (NEUT, angl. Neutrophils)

ORF: odprti bralni okvir (angl. Open Reading Frame)

TROMBO: koncentracija trombocitov (angl. Platelets)

TLR: razmerje med koncentracijo trombocitov in limfocitov

RNA: ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic Acid)

RT-PCR: verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo

rfIFN- ω : rekombinantni mačji interferon omega (angl. Recombinant Feline Interferon-omega)

SAA: serumski amiloid A (angl. Serum Amyloid A)

SII: sistemski imunsko-vnetni indeks (angl. Systemic Immune-inflammation Index)

SARS: hudi akutni respiratorni sindrom (angl. Severe Acute Respiratory Syndrome)

SARS-CoV-2: koronavirus, ki povzroča sindrom akutnega oteženega dihanja (angl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus)

TNF- α : tumorje nekrotizirajoči dejavnik-alfa (angl. Tumor Necrosis Factor-alpha)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mačji infekcijski peritonitis (FIP, angl. Feline Infectious Peritonitis) je bolezen mačk, ki jo povzroča mačji koronavirus (FCoV, angl. Feline Coronavirus). Ločimo dva biotipa FCoV: nizko patogen mačji enterični koronavirus (FECV, angl. Feline Enteric Coronavirus), ki povzroča običajno nenevaren enteritis, in visoko patogen virus mačjega infekcijskega peritonitisa (FIPV, angl. Feline Infectious Peritonitis Virus), ki povzroča sistemsko bolezen FIP (1, 2). FIP razvije samo majhen delež (do 10 %) s FCoV okuženih mačk (3). Poznamo dve klinični obliki bolezni: mokro in suho, ki imata različno patogenezo in prognozo (4).

Do nedavnega je FIP veljal za neozdravljivo bolezen z izjemno slabo prognozo in skoraj 100 % stopnjo umrljivosti (1). Leta 2019 so na Veterinarski fakulteti Univerze v Kaliforniji Davis v ZDA objavili raziskavo s prelomnimi rezultati na področju terapije FIP-a. V študiji so z eksperimentalnim protivirusnim zdravilom, nukleozidnim analogom GS-441524, dosegli kar 80 % uspeh pri zdravljenju 31 naravno okuženih mačk s FIP-om, s čimer je FIP postal ozdravljiva bolezen (5). Zaradi možnosti učinkovitega zdravljenja prej neozdravljive bolezni in nedostopnosti zdravila GS-441524 v veterinarski medicini, so lastniki začeli zdraviti mačke z nelicenciranim, komercialno dostopnim zdravilom, vsebujočim GS-441524 (angl. »Crowd-sourced therapy«, 6).

S pojavom nove terapije je potrebno določiti napovedne dejavnike in parametre, s katerimi lahko spremljamo njen učinek. Pri izbiri parametrov, ki smo jih želeli ovrednotiti, smo si pomagali s podatki iz literature o že znanih napovednih parametrih pri COVID-19, saj imata bolezni številne skupne značilnosti, in sicer: obe bolezni povzroča koronavirus in pri obeh lahko okužba bodisi spontano izzveni z blažjimi kliničnimi znaki ali pa se razvije v smrtno nevarno obliko. Napovedni parametri, ki se uporabljajo pri COVID-19, vključujejo: razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov (NLR), limfocitov in monocitov (LMR), trombocitov in limfocitov (TLR), sistemski imunsko-vnetni indeks (SII), aktivnost encima laktat-dehidrogenaze (LDH), koncentracijo citokinov, kot so interlevkin-6 (IL-6), interlevkin-1 β (IL-1 β) in tumorje nekrotizirajoči dejavnik-alfa (TNF- α), ter proteine akutne faze vnetja, kot sta feritin in C-reaktivni protein (CRP) (7). Kljub uspešnemu zdravljenju velikega števila mačk z GS-441524 je do zdaj opisanih le nekaj prognostičnih parametrov, ki kažejo na ugoden izid

zdravljenja. Ti vključujejo dober apetit in stopnjo aktivnosti, pridobitev telesne mase, nižjo koncentracijo bilirubina, normalizacijo koncentracije alfa-1-kislega glikoproteina (AGP) in serumskega amiloida A (SAA) (4, 8). Drugi parametri, ki jih je mogoče uporabiti za oceno napredka zdravljenja, so normalizacija limfopenije in anemije ter razmerja med albumini in globulini (A/G) (5, 8).

V naši raziskavi smo pred in po terapiji ovrednotili naslednje krvne parametre: izbrane hematološke in biokemijske parametre, NLR, LMR, TLR, SII in aktivnost encima LDH, koncentracijo citokinov IL-6, IL-1 β in TNF- α ter dveh proteinov akutne faze vnetja haptoglobina in feritina.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Cilj raziskovalne naloge je bil spremljanje učinka zdravljenja FIP-a z GS-441524 na koncentracijo vnetnih citokinov in vrednosti hematoloških markerjev vnetja. Poleg tega smo želeli ugotoviti, ali bi lahko kateri od vnetnih parametrov služil kot napovedni parameter za potek in izid bolezni ter spremljanje učinka zdravljenja.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V okviru raziskave smo postavili naslednje hipoteze:

1. Mačke s FIP-om imajo značilno višje vrednosti NLR, TLR, PLR in SII in značilno nižjo vrednost LMR v primerjavi z zdravimi mačkami.
2. Mačke s FIP-om imajo značilno višje koncentracije proinflammatoryh citokinov IL-6, IL-1 β , in TNF- α , proteinov akutne faze vnetja haptoglobina in feritina ter višjo aktivnost LDH v primerjavi z zdravimi mačkami.
3. Mačke z mokro obliko FIP-a imajo bolj izrazit akutni vnetni odgovor, kar se kaže v značilno višjih vrednostih NLR, TLR, PLR in SII in značilno nižji vrednosti LMR v primerjavi z mačkami s suho obliko FIP-a.
4. Terapija z GS-441524 zmanjša akutni vnetni odgovor mačk s FIP-om, kar se kaže v normalizaciji vrednosti hematoloških in biokemijskih parametrov. Poleg tega terapija značilno zniža koncentracijo vnetnih citokinov in proteinov akutne faze vnetja.
5. Pri mačkah s FIP-om so hematološki markerji vnetja NLR, LMR, TLR in SII v značilni povezavi s citokini in proteini akutne faze vnetja. Spremljanje izbranih laboratorijskih

parametrov (NLR, LMR, TLR in SII, haptoglobin, feritin, IL-6, IL-1 β , n TNF- α ter aktivnost LDH) med zdravljenjem je mogoče uporabiti za spremljanje učinka terapije.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ETIOLOGIJA

FCoV je velik, z ovojnico obdan virus sferične do pleomorfne oblike, ki spada v red *Nidovirales*, družino *Coronaviridae*. Gre za veliko družino virusov, ki povzročajo bolezni pri številnih živalskih vrstah in primarno prizadenejo respiratorni in/ali gastrointestinalni trakt (9). Viruse iz družine *Coronaviridae* delimo na dve poddružini: *Coronavirinae* in *Torovirinae*. Poddružino *Coronavirinae* sestavljajo štiri rodovi, in sicer *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* in *Gammacoronavirus* (10).

FCoV uvrščamo v rod *Alphacoronavirus*, vrsto *Alphacoronavirus 1*, kjer najdemo tudi koronavirus psov in virus transmisibilnega gastroenteritisa. Koronavirusno bolezen 2019 (COVID-19, angl. Coronavirus Disease 2019) povzroča koronavirus hudega akutnega respiratornega sindroma 2 (SARS-CoV-2, angl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), ki spada v rod *Betacoronavirus* in se tako taksonomsko razlikuje od FCoV (10).

Virusni genom predstavlja pozitivno orientirana, enovijačna molekula ribonukleinske kisline (RNA), velikosti 27–32 kilobaznih parov, ki jo obdaja nukleokapsida (4). Virus sestavljajo štiri strukturni proteini: protein S (angl. Spike), protein M (angl. Membrane), protein E (angl. Envelope) in protein N (angl. Nucleocapsid) ter sedem nestrukturnih proteinov: replikazna proteina 1a in 1b ter pomožni proteini 3a, 3b, 3c, 7a in 7b (9).

Spike ali koničasti proteini se nahajajo na površini koronavirusa in mu pod elektronskim mikroskopom dajejo videz krone, od koder izvira njegovo ime. Proteini S omogočijo vezavo virusa na gostiteljsko celico in izzovejo nastanek protiteles (4). Za FCoV in ostale RNA viruse je značilno, da so podvrženi mutacijam zaradi pomanjkljivega popravljalnega mehanizma virusne polimeraze RNA (11), kar je ključnega pomena v patogenezi bolezni (10).

FCoV se deli na dva serotipa: serotip I (FCoV I) in serotip II (FCoV II). FCoV I se pojavlja pogosteje in naj bi povzročil do 90 % naravnih okužb. Kljub temu je bolj raziskan serotip II zaradi boljše rasti v pogojih *in vitro*. Serotip II je nastal z rekombinacijo serotipa I FCoV in pasjega koronavirusa. Veže se na encim mačje aminopeptidaze N (fAPN, angl. Feline aminopeptidase N), medtem ko celični receptor za serotip I še ni znan. Serotipa se razlikujeta

tudi v antigenskih lastnostih, genomu in sekvencah proteina S, zato izzoveta nastanek drugačnih protiteles (9). Vsak serotip se nadalje razvršča na dva bio/pato-tipa: FECV, ki povzroča večinoma asimptomatski koronavirusni enteritis, in FIPV, ki povzroča bolezen FIP in se razvija pri 5–10 % s FECV okuženih mačk (4).

2.2 EPIZOOTIOLOGIJA

2.2.1 Biotip FECV

FECV je ubikvitaren in zelo nalezljiv virus mačk (12), ki je razširjen po skoraj celem svetu (10). Prevalenca okužb s FECV je visoka v okoljih, kjer živi več mačk skupaj, kot so vzrejališča, zavetišča in gospodinjstva z več mačkami (12). Virus se širi fekalno-oralno, najpogosteje posredno preko kontaminiranih predmetov ali med osebno nego po uporabi kontaminiranih mačjih stranišč, ki predstavljajo glavni vir okužbe (4). Prenašajo ga lahko tudi ljudje z onesnaženo obleko (10).

S FECV se lahko okužijo tako domače kot divje mačke (10). Ni dokaza, da bi bil FCoV nevaren za ljudi (13). Najbolj dovzetne za okužbo s FECV so mačke, stare 6–12 tednov po padcu titra maternalnih protiteles (14), ter mačke, starejše od deset let s pridruženimi kroničnimi boleznimi in oslabilnim imunskim sistemom (10). Mlade mačke pogosteje kažejo simptome gastroenteritisa, medtem ko so odrasle večinoma asimptomatske (14).

Okužene mačke lahko začnejo izločati FECV s fecesom najhitreje dva dni po okužbi (10). Izločanje praviloma traja nekaj tednov ali mesecev in poteka kontinuirano ali intermitentno. Približno 13 % mačk je perzistentno okuženih in izločajo virus celo življenje (4). Virus izločajo zlasti mlajše mačke in v večjih količinah v primerjavi z odraslimi, kar je najverjetneje posledica nezrelosti njihovega imunskega sistema (12). Zaradi kratkotrajne imunosti je možna ponovna okužba. Majhen delež mačk je odpornih na FCoV in virusa ne izločajo (4).

FECV je nizko patogen in v glavnem povzroča subklinične okužbe ali blage enteritise (15). Klinična pomembnost biotipa FECV izvira zlasti iz njegove nagnjenosti k mutacijam in sposobnosti pretvorbe v bolj virulentni FIPV, ki povzroča bolezen FIP (10).

2.2.2 Biotip FIPV

Za FIP-om lahko zbolijo domače in divje mačke vseh starosti. Posebno občutljive so mačke, stare od treh mesecev do dveh let, ter mačke, starejše od deset let (14). FIP se pogosteje pojavlja pri pasemskih mačkah (10, 16, 17). Opisana je večja predispozicija pri britanski, bengalski, birmanski, himalajski, abesinski, ragdoll in rex pasmah, vendar se ti podatki med študijami razlikujejo (10, 16, 18). Poleg tega so v številnih raziskavah, toda ne v vseh, ugotovili večje tveganje za obolenje pri samcih (10). Največje tveganje za razvoj FIP-a predstavljajo že prej omenjena okolja, kjer živi več mačk skupaj in v katerih je visoka obremenitev s FCoV (12). Drugi dejavniki, ki vplivajo na razvoj bolezni, so genetska predispozicija, imunosupresija, pridružene bolezni in stres. FIPV se nahaja znotraj makrofagov v prizadetih tkivih in efuzijah, zato je horizontalni prenos FIP-a malo verjeten (10). Možen je transplacentarni prenos FIPV, vendar velja za izjemno redek pojav. Prenos s transfuzijo krvi in mehaničnimi vektorji zaenkrat ni opisan. Eksperimentalna okužba je možna z intraperitonealnim vnosom virusa (4).

2.3 PATOGENEZA

Nagnjenost FCoV k mutacijam je ključnega pomena v patogenezi FIP-a, ki temelji na t. i. teoriji notranje mutacije (angl. Internal mutation theory) (10, 14). Po tej teoriji FECV v posamezni okuženi mački mutira v FIPV, ki povzroča FIP (14), kar pomeni, da je virus FIP-a genetsko specifičen za posamično mačko (10). Teorija notranje mutacije je splošno sprejeta zaradi ugotovljene tesne genetske povezave med FIPV in FECV izolati mačk, ki živijo v istem okolju, v primerjavi z izolati iz drugih okolij (4).

FECV vstopi v organizem po fekalno-oralni poti in potuje do tarčnih celic v črevesju. Replicira se v zrelih epitelijskih celicah črevesja. FECV se nato spremeni v FIPV tako, da izgubi afiniteto do epitelijskih celic črevesja ter pridobi afiniteto do monocitov/makrofagov (10). Sama sprememba tropizma ne zadostuje za razvoj FIP-a (12). Ko virus pridobi sposobnost okužbe monocitov/makrofagov, se v njih replicira in nadalje mutira, kar vodi do nastanka virulentnejših sevov in spremembe v FIPV (14). FIPV z učinkovito replikacijo v monocitih/makrofagih omogoči prehod iz lokalne oblike okužbe v sistemsko ter hkrati sproži aktivacijo okuženih monocitov/makrofagov, kar vodi v proizvodnjo citokinov in aktivacijo imunskega sistema (12).

Predvideva se, da virus mutira v regionalnem limfatičnem tkivu cekuma in kolona (10). Obstaja veliko raziskav genoma FCoV (9), vendar še ni povsem jasno, katere mutacije so odgovorne za spremembo biotipa (12). Pomembne so mutacije na vsaj treh mestih virusnega genoma: na genu S, na pomožnem genu 3c ter na mestu cepitve S1/S2 (10). Vloga proteina S je vezava z receptorjem, ki omogoča virusu vstop v celico, zato se predvideva, da so mutacije na genu S odgovorne za spremembo v celičnem tropizmu (14). Identificirane so posamezne nukleotidne spremembe na mestu 1058 in 1060 proteina S, ki kodirajo fuzijski peptid. Mutacija, ki povzroči zamenjavo metionina v levcin (M1058L), je prisotna pri 91,6 % mačk s FIP-om, medtem ko mutacija, ki povzroči zamenjavo serina v alanin (S1060A), najdemo le pri 4,3 % bolnih mačk. 4 % izolatov FIPV nima nobene od teh dveh mutacij, zato je težko z gotovostjo določiti njuno vlogo (10). Razlike med FIPV in FECV so ugotovili tudi na regiji odprtega bralnega okvirja (ORF, angl. Open Reading Frame) 3abc, ki kodira akcesorne proteine 3a, 3b in 3c (9). Delecije in točkaste mutacije na pomožnem genu 3c imajo za posledico nefunkcionalen protein 3c in se pojavljajo v več kot dveh tretjinah izolatov virusa FIP (14). Protein 3c je pri mačkah s FIP-om skrajšan, medtem ko je pri zdravih mačkah, okuženih s FECV, intakten (9). Vloga proteina 3c sicer še ni znana, predpostavlja pa se, da se izguba njegove funkcije odraža v povečani replikaciji virusa v makrofagih (10). Proteina 3a in 3b naj bi prav tako igrala vlogo v patogenezi FIP-a (9). Tretje pomembno mesto mutacije je na mestu cepitve S1/S2 gena S (10). Mutacije na tem mestu vplivajo na učinkovitost cepitve proteina S s strani furina in so ugotovljene pri dveh tretjinah FIPV izolatov (19).

Ko FCoV pridobi afiniteto do monocitov/makrofagov, preide okužba v sistemsko obliko, kar pa ne pomeni nujno, da se bo razvila bolezen, saj niso vsi mutirani sevi patogeni. Virus se lahko razširi v mezenterialne bezgavke, tonzile, zgornji respiratorni trakt, serozo črevesja, plevro, omentum, možganske ovojnice, uveo in mrežnico očesa (14). Inkubacijska doba pri okužbi s FIPV traja od nekaj tednov do nekaj let (20).

Pri obrambi pred FIP-om je pomemben zlasti celični imunski odziv, medtem ko je proizvodnja protiteles kontraproduktivna (19). FCoV namreč sproži s protitelesi povzročeno krepitev okužbe (angl. Antibody-dependant enhancement), kar pomeni, da protitelesa po vezavi z virusom izboljšajo njegovo infektivnost in ga ne nevtralizirajo (14). Poleg tega povzročijo tip III hipersenzitivne reakcije, ki povzroči vaskulitits. Potek bolezni je pogojen z imunskim odzivom gostitelja. Pri mačkah, ki na okužbo odgovorijo z močnim celičnim imunskim

odzivom, se bolezen ne razvije. Grobo gledano, kadar je celični imunski odziv šibek ter prevlada humoralni, se razvije mokra oblika FIP-a, za katero so značilni izlivi v telesnih votlinah. Kadar pa je celični imunski odziv močnejši in uspe delno omejiti širjenje virusa, se bolezen odraža v suhi obliki, pri kateri izlivov ni (19).

2.4 REAKCIJA AKUTNE FAZE PRI MAČKAH

Reakcija akutne faze je niz patofizioloških reakcij, ki se zgodijo v organizmu, potem ko je izpostavljen okužbi ali poškodbi. Začne se z izločanjem vnetnih citokinov, ki jih sproščajo imunske celice, zlasti makrofagi (21). Citokini so majhni, topni proteini, ki imajo širok spekter učinkov, med drugim vplivajo na celično rast in diferenciacijo, so mediatorji imunskega odziva, vplivajo na hematopoezo in sodelujejo pri celjenju ran (22). V centralnem živčnem sistemu citokini sprožijo kaskado dogodkov, ki imajo za posledico povišanje telesne temperature, levkocitozo in spremembo v koncentraciji proteinov akutne faze vnetja. Poleg tega stimulacija centralnega živčnega sistema vpliva tudi na samo obnašanje živali, ki se kaže kot letargija, anoreksija in adipsija (21).

Po okužbi s FCoV pride do sindroma sproščanja citokinov ali do t. i. citokinske nevihte. S FCoV okuženi makrofagi začnejo sproščati citokine, ki pomembno prispevajo k vnetnemu odzivu in patogenezi FIP-a (23). Pri mačkah so glavni mediatorji akutnega vnetnega odziva IL-1 β , IL-6 in TNF- α (24). S sinergističnim delovanjem med seboj regulirajo sintezo proteinov akutne faze vnetja v hepatocitih. TNF- α mobilizira aminokislino, tako da aktivira proteolitične procese v mišicah in s tem jetrom zagotovi molekule za sintezo novih proteinov. IL-1 deluje stimulatorno na sintezo pozitivnih proteinov akutne faze vnetja, medtem ko zavre sintezo negativnih proteinov akutne faze vnetja. Za sproščanje novo nastalih proteinov v krvni obtok je odgovoren IL-6 (21).

Glede na magnitudo povišanja plazemske koncentracije lahko proteine akutne faze vnetja razdelimo na glavne, zmerno in rahlo povišane. Glavna proteina akutne faze vnetja pri mačkah sta SAA in AGP. Njuna koncentracija se začne dvigovati takoj po vnetnem dražljaju in doseže maksimum po 24 do 48 urah. Haptoglobin je zmerno povišan, CRP in ceruloplazmin pa uvrščamo med rahlo povišane proteine akutne faze vnetja (25).

2.4.1 Serumski amiloid A (SAA)

SAA je glavni protein akutne faze vnetja tako pri mačkah kot pri večini drugih sesalcev. Njegova koncentracija se po vnetnem dražljaju poviša za tisočkrat, zaradi česar lahko služi kot marker vnetja. V humani medicini SAA ne služi le kot marker za določanje prisotnosti vnetja, temveč tudi kot prognostični dejavnik za številne bolezni, vključno z vnetnimi boleznimi, neoplazijami, in pa tudi za nevnetne bolezni, kot je sladkorna bolezen (26, 27, 28). Tudi pri mačkah je znano, da se SAA ne poviša le pri vnetnih boleznih, kot je FIP, temveč tudi pri neoplastičnih stanjih, sladkorni bolezni, hipertiroidizmu, odpovedi ledvic, kongestivnem srčnem popuščanju in tako dalje (29).

Povišana koncentracija SAA pri mačkah s FIP-om je posledica intenzivnega vnetnega procesa (21). Katayama in sod. (2023) so ugotovili, da je koncentracija SAA pri mačkah z mešano obliko višja kot pri mačkah s suho obliko bolezni. Razlog za to je najverjetneje ta, da je SAA klinični marker vnetja krvnih žil, ki je pri mačkah z izlivi bolj izrazito. Poleg tega niso ugotovili značilne razlike v koncentraciji SAA med mačkami s suho obliko FIP-a in kontrolno skupino. Prav tako niso ugotovili značilne razlike v koncentraciji SAA med skupinama mačk, ki so ozdravele, in med tistimi, ki niso, zato je njegova prognostična vloga vprašljiva (30).

Pri mačkah, ki so prejemale GS-441524, je prišlo kmalu po začetku zdravljenja do izrazitega padca koncentracije SAA, kar kaže na dobro učinkovitost zdravila (8, 30, 31).

2.4.2 Alfa-1-kisli glikoprotein (AGP)

Vloga AGP še ni povsem definirana, predvideva pa se, da ima tako imunomodulatorni kot antiinflamatorni učinek. Inhibira proliferacijo limfocitov, agregacijo trombocitov in funkcijo nevtrofilnih granulocitov (25). Proteini akutne faze vnetja imajo visoko specifičnost in občutljivost za diagnosticiranje sistemskega vnetja, vendar kljub temu z njimi ne moremo z gotovostjo razlikovati med samimi vzroki. Izjema bi lahko bil FIP, saj so ugotovili, da je koncentracija AGP pri mačkah s FIP-om značilno višja kot pri mačkah, ki so imele podobne klinične znake in niso imele FIP-a (21, 25, 32, 33). Specifičnost za razlikovanje FIP-a od drugih podobnih kliničnih stanj je tako za AGP pri mejni vrednosti 2260 µg/ml 90 % in je višja tako od specifičnosti SAA (87 %) kot tudi od specifičnosti haptoglobina (82 %) (32).

Koncentracija AGP se pri FIP-u močno zviša tako pri mokri kot pri suhi obliki bolezni (30), vendar so Addie in sod. (2022) ugotovili nižje koncentracije pri suhi obliki, kar pripisujejo njenemu kroničnemu poteku (23).

V literaturi se AGP omenja tudi kot možni prognostični dejavnik in kot parameter za spremljanje učinkovitosti terapije. Kadar se koncentracija AGP med zdravljenjem poviša ali ob koncu zdravljenja vztraja nad 500 µg/ml, je to negativen prognostični znak (23). Nasprotno so dokazali Katayama in sod. (2023), ki niso ugotovili značilne razlike v koncentraciji AGP pred začetkom zdravljenja med preživeli in nepreživeli mačkami (30).

2.4.3 Haptoglobin

Haptoglobin je zmerno povišan protein akutne faze vnetja pri mačkah, njegova koncentracija narašča in pada počasneje v primerjavi s SAA in AGP ter doseže vrh po 2 do 3 dneh. Njegova vloga je, da ščiti tkiva pred delovanjem hemoglobina, tako da veže prosti hemoglobin in s tem zavira njegovo oksidativno delovanje. Poleg tega ima inhibitorni učinek na funkcijo granulocitov in na bakterijsko aktivnost (25).

O haptoglobinu pri mačkah so objavljene sporadične študije (32, 34, 35, 36, 37). Povišano koncentracijo haptoglobina so ugotovili pri mačkah, okuženih s hemotropnimi mikoplazmami *Babesia vogeli*, *Hepatozoon felis* in pri plazmacitnem gingivostomatitisu (36, 37, 38).

Znano je, da se pri mačkah s FIP-om haptoglobin poviša (32, 34, 35), vendar pa učinek terapije na njegovo koncentracijo še ni bil raziskan.

2.4.4 Feritin

Feritin je prav tako protein akutne faze vnetja. Serumska koncentracija feritina je v povezavi z zalogami železa v tkivih tako pri ljudeh kot tudi pri mačkah (39). Do zdaj je bilo izvedenih malo raziskav o feritinu pri mačkah.

Ottenjann in sod. (2006) so določali koncentracijo feritina pri mačkah z različnimi vnetnimi stanji in ugotovili, da je imelo 63,2 % mačk povišan feritin, medtem ko je 36,8 % mačk imelo feritin znotraj referenčnih vrednosti (40).

Pri ljudeh s COVID-19 so ugotovili, da so imeli hospitalizirani bolniki z visokimi ravnmi feritina znatno večje tveganje za smrt (7, 41, 42).

2.5 KLINIČNA SLIKA

2.5.1 Biotip FECV

Okužba s FECV je večinoma subklinična oziroma poteka v obliki blagega enteritisa (15). Lahko se pojavijo povišana telesna temperatura, letargija, občasno bruhanje ter (krvava) driska z dehidracijo. Smrtnost je nizka (14).

2.5.2 Biotip FIPV

FIP se kaže v različnih kliničnih oblikah. V zgodnjem stadiju so za vse oblike bolezni značilni isti nespecifični klinični znaki, kot so letargija, inapetenca, izguba telesne mase oziroma težje pridobivanje telesne mase, intermitentna vročina, ki je neodzivna na antibiotike, limfadenopatija, driska, dehidracija in blede sluznice (10, 12, 14). Nekateri mačke razvijejo tudi zlatenico (12, 14). V začetni fazi je lahko blago povišana telesna temperatura edini simptom FIP-a (12). Ostali klinični znaki variirajo odvisno od oblike bolezni in glede na to, kateri organi so prizadeti (10). Zaradi variabilnosti klinične slike je natančen klinični pregled živali izrednega pomena za postavitve diagnoze (12).

Specifični klinični znaki so posledica poškodbe krvnih žil (vaskulopatije) in se lahko manifestirajo na različne načine, zato se FIP deli na dve klinični obliki: mokro/efuzivno in suho/ne-efuzivno, ki se med seboj pogosto prepletata in prehajata ena v drugo. Mačke z mokro obliko imajo namreč na patoanatomski preiskavi pogosto pridružene tudi piogranulomatozne lezije (4).

Klasična ali mokra oblika se kaže kot izliv vnetne tekočine iz poškodovanih krvnih žil v eni ali več telesnih votlinah (4). Najpogosteje se pojavlja ascites (12), in sicer pri 75 % mačk, 10–15 % ima izlive v prsni votlini, manj kot 10 % mačk pa v prsni in trebušni votlini (10). Perikardialni in skrotalni izlivi so redkejši (12). Ascites se kaže kot neboleča abdominalna distenzija, plevralni izliv pa kot dispneja, tahipneja in pridušeni srčni toni (12, 14).

Za suho obliko je značilen nastanek (pio)granulomov in kronično progresiven potek (14). Klinični znaki pri suhi obliki so odvisni od tega, kateri organi so prizadeti (12). Najpogosteje

so to ledvice, pljuča, jetra, črevo, mezenterialne bezgavke, perikard, možgani, hrbtenjača in oči (10, 12, 14). Piogranulomatozne lezije se lahko z abdominalno palpacijo zatipa kot mase (12). Suha oblika lahko postane klinično zaznavna šele po več tednih ali mesecih. Mačke s suho obliko imajo pogosteje pridružene očesne in nevrološke znake v primerjavi z mokro obliko (14).

Nevrološki znaki se pojavijo pri 30 % mačk s FIP-om in se razlikujejo glede na to, kateri del živčnega sistema je prizadet. Opisani živčni znaki so ataksija, izguba koordinacije, spremenjeno obnašanje, napadi, nistagmus, kroženje, nagibanje glave, motnje posturalnih refleksov, anizokorija/diskorija, tetrapareza ali parapareza, paraliza živcev, hiperestezija in kortikalna slepota. (12).

FIP se lahko kaže tudi s spremembami na očeh (10, 12, 14), ki se praviloma najprej pojavijo na enem očesu in nato zajamejo še drugo oko. Očesna oblika FIP-a se običajno kaže z različnimi stopnjami uveitisa in retinitisa (10). Zgodnji znak uveitisa je sprememba barve šarenice, ki jo spremlja hiperemija in prisotnost precipitativ (10, 14), kasneje pa lahko šarenica postane bela ali brezbarvna. Precipitati se lahko nabirajo tudi v roženici, zaradi česar ta pomotni (14). Hkrati lahko pride do razlike v obliki (diskorija) in velikosti (anizokorija) zenic (4). Vnetje mrežnice se kaže s krvavitvami in kongestijo mrežničnih krvnih žil (10). V težjih primerih pride zaradi izliva do odstopa mrežnice in slepote (12).

Manj pogosti klinični znaki FIP-a so spremembe v ustni in nosni votlini, na modih ter koži (10). Pri intaktnih samcih je opisana otekline mošnje (14). Kožne spremembe vključujejo srbeče ali nesrbeče papule, toksično epidermalno nekrolizo ter sindrom krhkosti kože, kar je posledica piogranulomatoznega vaskulitisa kože (12).

2.6 DIAGNOSTIKA

Diagnostika FIP-a je zahtevna predvsem zaradi kompleksne patogeneze bolezni, ki je posledica številnih mutacij virusa. Pri pacientih s sumom na FIP je zato potrebno opraviti več diagnostičnih preiskav, na podlagi katerih lahko z večjo ali manjšo verjetnostjo trdimo, da gre za to bolezen (4).

2.6.1 Anamneza in klinični pregled

Postavitev suma na FIP temelji na anamnestičnih podatkih (starost, spol, pasma) in kliničnem pregledu. Zaradi nespecifičnih kliničnih znakov si pomagamo s preiskavami krvi, slikovno diagnostiko in analizo tekočine, če je ta prisotna (4). Za postavitev končne diagnoze so potrebni invazivnejši diagnostični pristopi, vendar metode s 100 % specifičnostjo in občutljivostjo ni (10).

2.6.2 Hematološke preiskave

Osnovne hematološke preiskave so neinvazivne, enostavne ter hitro dostopne metode, ki povedo veliko o zdravstvenem stanju živali. Odstopanja v krvni sliki so zelo pogosta pri mačkah s FIP-om, vendar morajo biti vedno interpretirana skupaj s klinično sliko, saj niso specifična zgolj za FIP, ampak tudi za druge bolezni. Preiskave krvi pogosto razkrijejo neregenerativno ali regenerativno anemijo, mikrocitozo z ali brez anemije, limfopenijo, nevtrofilijo in trombocitozo (4).

Anemija se pojavi pri približno 60 % mačk s FIP-om (8, 18, 43, 44) in je v večini primerov blaga do zmerno huda (18, 45). Anemija zaradi vnetja je najpogostejši vzrok za anemijo tako pri živalih kot pri ljudeh. Patogeneza je multifaktorialna in je najverjetneje del hematološkega stresnega sindroma, ki ga sproži sproščanje citokinov kot odgovor na celično poškodbo ne glede na to, ali jo povzročijo okužba, vnetje ali maligna bolezen. Glavni mehanizmi vključujejo zmanjšano razpoložljivost železa med eritropoezo, zmanjšano preživetje eritrocitov in zmanjšan odgovor organizma na anemijo zaradi neustreznega izločanja eritropoetina ali zmanjšane odziva kostnega mozga na eritropoetin. Za anemijo kroničnega vnetja je značilno, da je blaga do zmerna, neregenerativna, normocitna in normokromna (40). Pri mačkah s FIP-om so ugotovili, da je anemija v večini primerov (98,1 %) neregenerativna in redko izrazita, s hematokritom pod 15 % (11,1 %) (18). Čeprav je za anemijo zaradi vnetja značilno, da je normocitna, so Riemer in sod. (2016) zaznali mikrocitozo pri več kot eni tretjini mačk s FIP-om. Od tega 40 % mačk z mikrocitozo ni bilo anemičnih. Mikrocitosa pri mačkah s FIP-om bi lahko bila posledica sekvestracije železa zaradi kronične bolezni ali zaradi zmanjšane črevesne absorpcije železa, ki je posledica povečane sinteze hepcidina (45). Hepcidin je nedavno odkriti protein akutne faze vnetja (46), ki zavira prevzem železa v črevesju. Sintezo hepcidina v jetrih stimulirata IL-1 in IL-6, za katera je bilo dokazano, da sta povišana pri mačkah s FIP-om (45).

Limfopenija naj bi bila prisotna pri približno polovici mačk s FIP-om (44, 45) in je pogostejša pri mačkah z mokro obliko (45). Drugi članki navajajo nižji odstotek limfopenije pri mačkah s FIP-om, med 20,9 % in 22,2 % (8, 18). Pri eksperimentalni okužbi mačk prostih specifičnih patogenih organizmov se je limfopenija pojavila približno 2–4 tedne po okužbi in je bila povezana s potekom bolezni. Prej kot se je pojavila, hitreje je bilo napredovanje bolezni, zato lahko število limfocitov v krvi služi kot napovedni dejavnik izida bolezni (19). Limfopenija je posledica apoptoze, ki je ne povzroči neposredno virus, saj se ta ne razmnožuje v limfocitih, ampak so za to odgovorni drugi dejavniki. Predvideva se, da je v indukcijo apoptoze limfocitov vključen TNF- α , ki ga proizvajajo z virusom okuženi makrofagi (47).

Riemer in sod. (2016) so ugotovili, da je limfopenija pogostejša pri mačkah z mokro obliko. Razlog je najverjetneje v perivaskularni migraciji limfocitov, ki je posledica vaskulitisa. Limfopenijo so ugotovili pri 56,1 % mačk z mokro obliko in 28,8 % mačk s suho obliko FIP-a (45). Ta ugotovitev je bila v nasprotju z raziskavo Sparkes in sod. (1991), ki niso ugotovili razlik v pogostosti limfopenije med skupinama mačk z mokro in suho obliko (48).

Nevtrofilni granulociti predstavljajo pomembno obrambo gostitelja pred patogeni. Okužbe z virusi, kot sta virus mačje levkoze (FELV, angl. Feline Leukemia Virus) ali mačji parvovirus (FPV, angl. Feline Parvovirus), običajno zmanjšajo število nevtrofilnih granulocitov, kar pa ne velja za FIP (49). Nevtrofilijo lahko opazimo pri 40,6–57,1 % mačk s FIP-om (18, 44, 45, 48). Ta je posledica vnetja in delovanja citokinov, ki zakasnijo apoptozo nevtrofilnih granulocitov in s tem podaljšajo njihovo življenjsko dobo. Dejavniki, ki podaljšajo njihovo dobo preživetja so TNF- α , granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF, angl. Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor) in granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF, angl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor). Te kot odgovor na razmnoževanje virusa izločajo s FIPV okuženi makrofagi. Takano in sod. (2009) so ugotovili povišane koncentracije TNF- α , GM-CSF in G-CSF v makrofagih mačk s FIP-om, kar potrjuje, da je nevtrofilija posledica podaljšanega preživetja nevtrofilnih granulocitov (49).

2.6.3 Hematološki markerji vnetja

Hematološki markerji vnetja so enostavno dostopni parametri, izračunani kot razmerja koncentracij posameznih vrst levkocitov in trombocitov, ki lahko služijo kot diagnostični in/ali prognostični parametri pri različnih boleznih tako pri ljudeh kot živalih (50).

V veterinarski medicini so jih raziskovali zlasti pri psih (51, 52, 53, 54). Pri mačkah so uporabo razmerij preučevali pri boleznih, kot so hipertrofična kardiomiopatija, akutni pankreatitis, postinjekcijski sarkom in limfom (50, 55, 56, 57, 58).

Vrednost NLR je bila značilno večja pri mačkah s kongestivnim srčnim popuščanjem in je tako negativen prognostični parameter pri mačkah s hipertrofično kardiomiopatijo (55). Pri mačkah z akutnim pankreatitisom, za katerega je tako kot pri FIP-u značilen sistemski vnetni odziv, so ugotovili značilno povišane vrednosti NLR in TLR v primerjavi z zdravimi živalmi (57).

Nedavno je Donato s sod. (2023) preučeval povezave med vrednostmi NLR, MLR in TLR ter ostalimi vnetnimi parametri pri mačkah. Pri mačkah s hipoalbuminemijo, hiperglobulinemijo in povišano koncentracijo SAA so bile vrednosti razmerij višje. Ti rezultati kažejo, da lahko izračunana razmerja služijo kot pokazatelj vnetja pri mačkah (59).

Uporaba hematoloških markerjev vnetja pri mačkah s FIP-om do zdaj še ni bila raziskana.

2.6.4 Biokemijska preiskava

Pri večini mačk s FIP-om se odstopanja pojavijo tudi pri biokemijski preiskavi krvi (43, 45). Spremembe v biokemijskih parametrih so nespecifične, kar pomeni, da ne moremo postaviti diagnoze samo na podlagi teh izvidov (4). Vsa odstopanja biokemijskih parametrov moramo interpretirati skupaj z anamnezo, klinično sliko ter rezultati ostalih diagnostičnih preiskav (60).

Najbolj značilna je hiperglobulinemija, ki se pojavi pri 89 % mačk s FIP-om (60). Hiperglobulinemiji je lahko pridružena hipoalbuminemija in/ali hiperproteinemija (45, 60, 61). Posledično je razmerje A/G znižano, o čemer poročajo v številnih člankih (4, 61, 62). Kadar je razmerje A/G manjše od 0,4, naj bi bila verjetnost FIP-a večja, njegova vrednost pa je manjša, kadar je razmerje nad 0,8, vendar se mejne vrednosti med različnimi študijami razlikujejo (4). Razmerje A/G naj bi imelo večjo diagnostično vrednost kot koncentracija celokupnih beljakovin ali gama globulinov (63).

Pogosta je tudi hiperbilirubinemija, ki prevladuje predvsem pri mačkah z mokro obliko. Po navadi ni povezana z boleznijo jeter, saj so jetrni encimi pri večini mačk s FIP-om normalni (45). Vzrok za hiperbilirubinemijo je bolj verjetno povečana hemoliza (4). Tsai je v svoji raziskavi ugotovil, da koncentracija bilirubina narašča pri napredovanju bolezni, kar pomeni,

da bi bilirubin lahko služil kot negativni prognostični dejavnik (62). Do podobnih ugotovitev so prišli Katayama in sod. (2021), ki so ugotovili značilno višje koncentracije bilirubina v skupini mačk, ki so med zdravljenjem poginile, v primerjavi z mačkami, ki so preživele (64).

V literaturi se poroča o dvigu aktivnosti alanin-aminotransferaze (ALT) med zdravljenjem mačk z GS-441524 ali s kombinacijo remdesivirja in GS-441524 (18, 31, 61). Taylor in sod. (2023) pri zdravljenju zgolj z remdesivirjem tega niso opazili (18). Vzrok za hepatopatijo v povezavi z aplikacijo GS-441524 in remdesivirja še vedno ni v celoti pojasnjen (61). Pri bolnikih s COVID-19 so opisani majhni dvigi v aktivnosti ALT med zdravljenjem z remdesivirjem, ki so se po koncu zdravljenja normalizirali, pri čemer bolniki niso kazali nobenih drugih znakov poškodbe jeter (65).

V primerih, ko se bolezenski proces razširi na ledvice, se lahko pojavi azotemija, ki je pogostejša pri mačkah s suho obliko bolezni (45).

Hipoglikemija je manj pogosta najdba in se povezuje s hujšim potekom bolezni, prisotnostjo sistemskega vnetnega odgovora ali sepso (4).

2.6.5 Laktat-dehidrogenaza (LDH)

LDH je znotrajcelični encim, ki sodeluje v anaerobni proizvodnji energije. Odgovoren je za reverzibilno konverzijo piruvata v laktat v procesu glukoneogeneze (66). Povečana aktivnost LDH je lahko povezana z anemijo, ishemično boleznijo srca, mišično travmo, neoplazijami ter patološkimi procesi na pljučih, jetrih, ledvicah, osrčniku in pankreasu (66, 67).

Številne raziskave poročajo o možni uporabi LDH kot napovednega dejavnika za hujšo obliko COVID-19 pri ljudeh (67, 68). Huang in sod. (2022) so ugotovili, da je povišana aktivnost LDH povezana s slabo klinično prognozo in večjo stopnjo smrtnosti bolnikov s COVID-19 (68).

Romanelli in sod. (2022) so merili aktivnost LDH v abdominalnih in torakalnih izlivih mačk s FIP-om in ugotovili, da je ta primerljiva z aktivnostjo LDH pri mačkah z neoplastično ali septično efuzijo (69).

Pri pregledu literature nismo našli objavljenih raziskav, ki bi določevale aktivnost LDH v serumu mačk s FIP-om.

2.6.6 Elektroforeza serumskih beljakovin

Spremembe v proteinogramu na račun hiperproteinemije ali hiperglobulinemije je možno zaznati pri 87,7 % mačk s FIP-om (10). Elektroforeza serumskih beljakovin je indirektni laboratorijski test, ki se uporablja za diagnostiko FIP-a (70). Deluje tako, da loči serumske beljakovine glede na njihovo velikost, obliko in električni naboj na šest frakcij: albumine, globuline alfa-1, globuline alfa-2, globuline beta-1, globuline beta-2 in globuline gama. Običajno pri mačkah s FIP-om opisujejo zgodnji dvig v frakciji globulinov alfa-2, ki jim sledi poliklonalni dvig globulinov gama. Med globuline alfa-2 sodijo nekateri proteini akutne faze vnetja, kot so ceruloplazmin, haptoglobin, in alfa-2 makroglobulin, zato je ta frakcija povišana v primeru akutnega vnetja ter neoplazij ali nefrotskega sindroma (71). Hipergamaglobulinemija se pojavi približno dva tedna po okužbi, ko se aktivira humoralni imunski sistem (70). Med globuline gama uvrščamo zlasti imunoglobuline razreda G ter CRP (71). Poliklonska hipergamaglobulinemija je pri FIP-u pogostejša kot monoklonska (70).

2.6.7 Slikovna diagnostika

Ultrazvočnih ali rentgenskih sprememb, ki bi bile specifične za FIP, ni. Ultrazvok je neinvazivna in zelo občutljiva diagnostična metoda, s katero lahko zaznamo prisotnost že majhne količine proste tekočine v abdomnu, prsni votlini ali osrčniku. Poleg tega lahko z ultrazvočno preiskavo ugotovimo povečane mezenterialne bezgavke, zadebeljeno steno črevesja, spremenjena in/ali povečana jetra, vranico in ledvica. S pomočjo ultrazvoka lahko punktiramo tekočino ter opravimo ultrazvočno vodeno tankoigelno (citološko) ali debeloigelno (histološko) biopsijo organov (4). Z rentgenskim slikanjem prsnega koša lahko diagnosticiramo plevralni ali perikardialni izliv. Pri mačkah s piogranulomatozno pljučnico so na rentgenski sliki vidni pulmonalni ali peribronhialni infiltrati. Ugotovimo lahko tudi povečane organe, pri čemer so lahko detajli slike zaradi proste tekočine v trebušni votlini slabši (10). Napredne diagnostične metode, kot sta magnetna resonanca s kontrastom ali računalniška tomografija, so indicirane pri mačkah z nevrološkimi znaki (4).

2.6.8 Analiza tekočine

Pri mačkah z mokro obliko je pomembna analiza tekočine, odvzete iz trebušne ali prsne votline. Z makroskopsko oceno, citološkim pregledom razmaza, biokemičnimi preiskavami in

mikrobiološko analizo vzorca tekočine lahko ločimo FIP od drugih bolezni, kot sta limfom in bakterijski peritonitis/plevritis. Tekočina pri FIP-u je slamnato rumena, bistra do zmerno motna, vsebuje veliko beljakovin (> 35 g/L) in majhno število celic ($< 5,0 \times 10^9$ /L). V razmazu izliva so vidni makrofagi, nedegenerirani nevtrofilni granulociti in posamezni limfociti, kar je značilno za piogranulomatozno vnetje. Izvedemo lahko tudi Rivalta test, ki je hiter in poceni ter ima dobro občutljivost (91–100 %), vendar je lahko pozitiven tudi pri mačkah z limfomom ali bakterijskim peritonitisom/plevritisom (4).

2.6.9 Indirektne diagnostične metode

2.6.9.1 Serološka diagnostika – dokazovanje protiteles

Serološki testi, kot so indirektna imunofluorescenca, virus nevtralizacijski test, ELISA, hitri imunokromatografski test, so pri diagnostiki FIP-a zaradi slabše občutljivosti in specifičnosti manj uporabni. Z njimi lahko zaznamo protitelesa proti FCoV v krvi, efuziji ali cerebrospinalni tekočini 7–28 dni po okužbi. Slabost seroloških testov je, da ne ločijo med okužbo s FECV ali FIPV (60), poleg tega ima do 80 % mačk v populaciji protitelesa proti FCoV (72, 73, 74). Negativen rezultat prav tako ne izključi FIP-a, saj približno 10 % mačk nima serumskih protiteles, ker so ta zaradi vaskulitisa in ekstravazacije krvnih komponent v izlivih. Za mačke s FIP-om niso značilni niti naraščajoči ali visoki titri protiteles. Pri zdravih mačkah, okuženih s FCoV, titri protiteles zelo nihajo, zato enkratno merjenje titrov nima diagnostične vrednosti. Detekcija protiteles v izlivih ali cerebrospinalni tekočini ni nič bolj diagnostično uporabna od dokazovanja protiteles v serumu (60).

2.6.10 Direktne diagnostične metode

2.6.10.1 Molekularne metode

Molekularne metode so hitre in zelo občutljive, saj zaznajo že zelo majhno količino virusne RNA v vzorcu. Za analizo zato zadostuje minimalno invazivna ultrazvočno vodena tankoigelnja biopsija organov, ki kažejo vnetne spremembe. Z njimi lahko dokažemo prisotnost virusne RNA v različnih vzorcih, kot so kri, punktati, tkiva, cerebrospinalna tekočina ali očesna vodica, vendar pa z nobeno od teh metod ne moremo ločiti med FIPV in FECV (4).

Dokaz virusne RNA zunaj gastrointestinalnega trakta ni specifičen za FIP. Tudi pri zdravih mačkah, ki so okužene s FECV, lahko dokažemo prisotnost virusa zlasti v hemolimfatičnih tkivih, kot so vranica, mezenterialne bezgavke, kostni mozeg in pa tudi v krvi, vendar je pri mačkah s FIP-om virusno breme precej višje. Virusno breme je najvišje v omentumu, mezenterialnih bezgavkah in vranici, zato so ta tkiva najbolj primerna za vzorčenje. Manj primerna so ledvica, jetra, pljuča, miokard in poplitealne bezgavke. Vzorci krvi niso primerni za potrditev FIP-a, saj lahko viremijo zaznamo pri 80–90 % mačk, ki so okužene s FECV. Pri mačkah z mokro obliko je najprimernejši vzorec abdominalna ali torakalna efuzija (4).

Vse dosedanje študije, ki so proučevale verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo (RT-PCR) na vzorcu cerebrospinalne tekočine, so ugotovile 100 % specifičnost, kar pomeni, da najdemo virusno RNA v cerebrospinalni tekočini samo pri mačkah s FIP-om ne glede na to, ali imajo nevrološke znake. Kljub temu, da se zaenkrat o lažno pozitivnih RT-PCR rezultatih še ni poročalo, se sklepa, da je teoretično možno, da bi tudi FECV prešel krvno-možgansko bariero pri mačkah z nevrološkimi znaki, ki niso posledica FIP-a (4).

Z molekularnimi metodami lahko ugotavljamo tudi mutacijo, ki na mestu 1058 povzroči zamenjavo aminokislina metionin v levcin (M1058L), in mutacijo na mestu 1060, ki povzroči zamenjavo serina v alanin (S1060A). Sprva so mislili, da sta mutaciji specifični za FIP, vendar so novejša študija dokazale, da sta mutaciji znak sistemskega širjenja virusa, ki pa se lahko zgodi tudi pri zdravih mačkah in je benigno (4).

Pozitiven RT-PCR test na vzorcih tekočine ali tkiva, skupaj z značilnimi hematološkimi in biokemijskimi odstopanji ter značilnim izgledom tekočine, FIP postavi na prvo mesto na listi diferencialnih diagnoz (4).

2.6.10.2 Imunooznačevanje

Trenutni zlati standard za diagnosticiranje FIP-a je dokaz antigena FCoV z imunohistokemijo ali imunofluorescenco v tkivih. Slabost te metode je, da je za pridobitev vzorcev potrebna invazivna kirurška diagnostika (laparotomija, laparoskopija) v splošni anesteziji, ki predstavlja določeno tveganje za mačke s sumom na FIP, zato se v večini primerov lahko izvede samo post-mortem. Metoda temelji na vezavi specifičnih protiteles, ki se vežejo na antigene v makrofagih. Za natančen izvid je potrebno kirurško vzorčenje več prizadetih organov, saj so

antigeni različno razporejeni v spremembah znotraj organov, zato negativen rezultat ne izključi FIP-a. Imunohistokemija ali imunofluorescenca se lahko izvajata tudi na vzorcih, kot so efuzija, vzorci tankoigelne biopsije, cerebrospinalna tekočina in očesna vodica, vendar je specifičnost slabša (4).

2.7 TERAPIJA

FIP je do razvoja in uporabe specifičnih protivirusnih zdravil veljal za neozdravljivo bolezen (12). Brez zdravljenja je povprečna doba preživetja pri mačkah z mokro obliko 21 dni, pri mačkah s suho obliko pa 38 dni (62). Pred uporabo protivirusnih zdravil so mačke s FIP-om zdravili paliativno z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili, glukokortikoidi, rekombinantnim mačjim interferonom omega (rIFN- ω) in poliprenil imunostimulantom (4). S simptomatsko terapijo ni mogoče pozdraviti FIP-a, lahko pa dosežemo kratkotrajno izboljšanje kliničnih znakov (31). Bolezni, kot so ebola, bližnjevzhodni respiratorni sindrom (MERS, angl. Middle East Respiratory Syndrome) in hudi akutni respiratorni sindrom (SARS, angl. Severe Acute Respiratory Syndrome), so spodbudile farmacevtsko industrijo k hitrejšemu razvoju protivirusnih zdravil, ki zavirajo replikacijo RNA virusov (5), vendar so zdravila v večini držav po svetu trenutno registrirana samo za ljudi (4).

2.7.1 Protivirusne učinkovine proti FCoV

2.7.1.1 Remdesivir (GS-5734)

Remdesivir (GS-5734) je nukleozidni analog, ki je bil prvotno razvit za zdravljenje ebola (75). Zdravilo se je kasneje izkazalo za učinkovito proti številnim RNA virusom, kar je spodbudilo raziskave glede učinkovitosti remdesivirja in njegovega aktivnega metabolita GS-441524 pri zdravljenju FIP-a. Učinkovitost remdesivirja in GS-441524 pri zdravljenju FIP-a je bila primerljiva, vendar so nadaljnje študije preferirale uporabo GS-441524 zaradi njegove manj kompleksne kemijske zgradbe (5). Cosaro in sod. (2023) so primerjali učinkovitost remdesivirja in GS-441524 za peroralno uporabo pri zdravljenju FIP-a, pri čemer rezultati niso pokazali značilne razlike v preživetju med mačkami, ki so prejemale remdesivir, in mačkami, ki so prejemale GS-441524 (76).

2.7.1.2 GS-441524

GS-441524 je adenoziński nukleozidni analog in aktivni metabolit remdesivirja (8). Izkazal se je kot varno in učinkovito zdravilo (5) in je trenutno eno najbolj uporabljenih protivirusnih zdravil za zdravljenje FIP-a (5, 6, 30, 31, 61, 76, 77, 78, 79). Visoka cena in nedostopnost zdravila v večini držav po svetu omejujeta njegovo uporabo, zato so lastniki primorani zdraviti mačke z nelicenciranim, komercialno dostopnim zdravilom, ki vsebuje GS-441524 (angl. »Crowd-sourced therapy«, 6).

Mehanizem delovanja nukleozidnih analogov je, da se vgrajujejo v nastajajočo virusno RNA in s tem onemogočijo replikacijo virusa (61). Zdravilo deluje hitro, saj klinično izboljšanje običajno nastopi v nekaj dneh. Na voljo je v peroralni in injekcijski obliki za subkutano dajanje (4). Negativni stranski učinki so vezani zlasti na injekcijsko obliko zdravila. Poroča se predvsem o bolečini in reakcijah kože, kot so razjede, odprte rane in brazgotine na mestu aplikacije zdravila (5, 61, 77, 78). Pri posameznih mačkah se poveša aktivnost ALT, vendar še ni povsem razjasnjeno, ali je to posledica zdravila ali bolezni (4, 61).

Murphy in sod. (2018) so prvi preučevali učinkovitost in varnost GS-441524 pri zdravljenju FIP-a. Zdravilo se je izkazalo za netoksično in je učinkovito zavrlo replikacijo FCoV v dveh različnih celičnih kulturah. Poleg raziskav *in vitro* so z GS-441524 zdravili tudi 10 eksperimentalno okuženih mačk, in sicer z odmerkom 2,0 ali 5,0 mg na kilogram telesne mase na 24 ur subkutano. Zdravljenje je trajalo dva tedna, pri čemer je prišlo do hitrega kliničnega izboljšanja. Med višino odmerka in odgovorom na terapijo niso ugotovili razlik. Pri dveh mačkah je prišlo do recidiva, zato so ju ponovno zdravili z enakim odmerkom in pri tem uporabili enako dolžino zdravljenja. Na ponovno terapijo sta se dobro odzvali in med raziskavo ostali zdravi (77). Leto kasneje je Pedersen s sodelavci (2019) objavil študijo o učinkovitost zdravljenja FIP-a z GS-441524 pri mačkah z naravno povzročeno okužbo s FCoV. Vključili so 31 mačk, 26 z mokro in 5 s suho obliko bolezni. Mačke so zdravili z odmerkom 2,0 mg na kilogram telesne mase na 24 ur subkutano, 12 tednov. Terapijo so v primeru visoke koncentracije serumskih beljakovin podaljšali (5). Izbira odmerka in dolžina zdravljenja je temeljila na ugotovitvah prejšnjih študij (5, 77, 80). 26 mačk je zaključilo zdravljenje, vendar se je pri osmih mačkah bolezen kasneje ponovila. Mačke, ki so ponovno zdravili z višjim odmerkom, so se na zdravljenje uspešno odzvale in so med raziskavo ostale zdrave. Pri mačkah, ki so jih zdravili s prvotnim odmerkom, je prišlo do ponovnega recidiva, zato so pri zdravljenju druge ponovitve bolezni uporabili višje odmerke. Na zvišanje odmerka so se dobro odzvale in

ostale zdrave, z izjemo ene mačke, ki so jo zaradi slabe klinične slike evtanazirali (5). Obe študiji sta preučevali učinkovitost zdravila za parenteralno uporabo in nista vključili mačk z nevrološki in očesni znaki zaradi dvomov o prehodnosti zdravila skozi krvno-možgansko oziroma krvno-očesno bariero (5, 77). S kasnejšimi raziskavami so ugotovili, da so za uspešno zdravljenje nevrološke in očesne oblike potrebni višji odmerki zdravila (31, 61, 78, 81).

Pri pregledu literature smo ugotovili, da so v večini študij (6, 31, 30, 61, 76, 78, 79) uporabljali 12-tedenski protokol za zdravljenje FIP-a po zgledu raziskave Pedersena in sod. (2019). Določene študije, ki so uporabile krajše protokole zdravljenja, nakazujejo, da bi lahko bilo krajše obdobje terapije prav tako učinkovito (77, 82).

Prva raziskava o uspešni terapiji FIP-a s peroralno obliko GS-441524 je bila objavljena leta 2020 (81). Tej so kasneje sledile številne študije, ki so to potrdile (30, 31, 64, 23). Takšna oblika zdravljenja je za žival in lastnika manj stresna v primerjavi z bolečimi subkutanimi injekcijami (4).

Med zdravljenjem je priporočljivo spremljati telesno maso in krvno sliko mačk na vsake štiri tedne (4, 61). Pridobivanje telesne mase je najenostavnejši pokazatelj uspešnega zdravljenja. Krvni parametri, s katerimi spremljamo uspešnost terapije, so hematokrit, levkociti, celokupne serumske beljakovine, globulini, albumini in razmerje A/G (5).

V raziskavi Pedersena in sod. (2019) 5/31 mačk ni zaključilo zdravljenja, kar nakazuje na 80 % stopnjo preživetja (5). Do podobnih ugotovitev so prišli Katayama in sod. (2023), ki so preučevali učinkovitost peroralne oblike zdravila GS-441524. V njihovi raziskavi je zdravljenje zaključilo 137/161 (85,1 %) mačk z mešano obliko in 153/163 (93,9 %) mačk s suho obliko bolezni (30). Kljub temu da je GS-441524 zelo učinkovito zdravilo, pride pri približno 10 % mačk med ali po zdravljenju do ponovitve bolezni (6, 18). Neuspešno zdravljenje je lahko posledica nezadostne čistosti ali koncentracije zdravila, nepravilnih odmerkov ali razvoja rezistence (4).

Uporaba nelicenciranih preparatov je vzbudila številne dvome o njihovi kvaliteti, čistosti in koncentraciji (4). Dve raziskovalni skupini sta pred kratkim ocenjevali kakovost širokega nabora izdelkov, ki naj bi vsebovali GS-441524. Ugotovili so, da so vsi parenteralni izdelki, ki

so jih preučili, vsebovali učinkovino GS-441524 v oglaševanih oziroma višjih koncentracijah, medtem ko so peroralni izdelki kazali bolj spremenljive koncentracije (83, 84).

2.7.1.3 Molnupiravir

Molnupiravir je prav tako nukleozidni analog, ki se je v Evropski uniji uporabljal za zdravljenje ljudi z blago do zmerno obliko bolezni COVID-19 (85, 86). Pri ljudeh so ugotovili, da je možnost za razvoj rezistence proti molnupiravirju pri SARS-CoV-2 zelo nizka (86). Učinkovina ima za zdravljenje FIP-a velik potencial zaradi možnosti peroralnega zdravljenja in zlasti kot t. i. zdravilo drugega izbora v primeru neuspeha z GS-441524. Opisani neželeni stranski učinki pri uporabi molnupiravirja pri mačkah so lahko huda levkopenija, povešeni uhlji in polomljeni brki. Priporočljivo zdravljenje do klinične remisije praviloma traja 12 tednov (87).

2.7.1.4 GC376

GC376 je zaviralec virusne proteaze 3CL (88). Pedersen in sod. (2018) so preučevali učinkovitost GC376 pri 20 mačkah z mokro in suho obliko FIP-a. 19 mačk se je prvotno uspešno odzvalo na terapijo, vendar se je v nekaj tednih po koncu zdravljenja bolezen ponovila. Večina mačk, pri katerih je prišlo do recidiva, je razvila nevrološko obliko bolezni. Od tega se 13 mačk na ponovno zdravljenje ni odzvalo (80). Kljub poročilom o razvoju rezistence (89, 90) ima GC376 potencial za uspešno zdravljenje FIP-a v kombinaciji z drugimi protivirusnimi zdravili (89). Opisani stranski učinki uporabe GC376 so pekoč občutek na mestu aplikacije in nepravilen razvoj oziroma nepravilno izrastli stalni zobje pri mačkah, ki so bile zdravljene pred 18. tednom starosti (80). GC376 trenutno ni licenciran za zdravljenje mačk s FIP-om (4).

2.7.2 Podporna terapija

Podporna terapija pri zdravljenju FIP-a vključuje intravensko tekočinsko terapijo, spodbujevalce apetita, antiemetike in analgezijo. Dodajo se lahko tudi vitamin B12, gabapentin in steroidi (4).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBOR PACIENTOV

Raziskava je bila zasnovana kot retrospektivna študija, v kateri smo uporabili klinične in laboratorijske podatke pacientov Klinike za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani ter ostanke vzorcev krvi, ki so bili odvzeti za potrebe diagnostike in klinični nadzor zdravljenja med letoma 2020 in 2024. Postopki raziskave so potekali v skladu z veljavno slovensko zakonodajo na področju veterinarstva (91).

V raziskavo smo vključili vzorce 35 lastniških mačk, 23 z mokro in 12 s suho obliko FIP-a, pri katerih je diagnozo potrdil veterinar in je v skladu s smernicami Evropskega svetovalega odbora o mačjih boleznih (ABCD, angl. European Advisory Board on Cat Diseases). Diagnoza je temeljila na značilnih kliničnih znakih in rezultatih diagnostičnih preiskav (hematološke in biokemijske preiskave krvi, citološka preiskava izlivov) ter detekciji FCoV v izlivih oziroma aspiratih prizadetih organov (vranica, bezgavke) s komercialno dostopno metodo RT-PCR (FIP virus RealPCR™, IDEXX laboratory, Nemčija).

V času raziskave licencirano protivirusno zdravilo, ki vsebuje adenozijski nukleozidni analog GS-441524, ni bilo na voljo v Evropski uniji, zato je zdravljenje potekalo z nelicenciranim, komercialno dostopnim zdravilom, ki vsebuje GS-441524 in so ga pridobili lastniki sami (angl. »Crowd-sourced therapy«, 6).

32/35 mačk je prejelo zdravilo GS-441524 najmanj 12 tednov. Tri mačke niso bile zdravljene, zato smo lahko njihove parametre vključili le v skupino mačk pred zdravljenjem za statistično primerjavo s kontrolno skupino. Mačke smo imeli za ozdravljene, če v 12-tedenski dobi opazovanja niso imele recidiva. Med zdravljenjem smo stanje mačk spremljali z mesečnimi kliničnimi pregledi in preiskavami krvi. V kontrolno skupino je bilo vključenih 28 zdravih mačk, ki so bile po starosti primerljive s skupino pacientov.

3.2 KLINIČNI PODATKI

Pri mačkah s FIP-om smo zbrali naslednje klinične podatke: telesna masa pred in po zdravljenju, starost, spol, status sterilizacije/kastracije, klinični znaki pri prvem obisku, mokra ali suha oblika, prisotnost očesnih in/ali nevroloških znakov ter izid zdravljenja.

3.3 ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV KRVI

Pri zdravljenih mačkah smo po priporočenem protokolu za zdravljenje FIP-a z zdravilom GS-441524 opravili klinični pregled z odvzemom krvi iz *v. cephalice antebrachii* ali *v. jugularis* pred začetkom zdravljenja in 4, 8 in 12 tednov po začetku zdravljenja. Za hematološke preiskave smo odvzeli vzorce krvi v 0,5 mL epruvete z antikoagulantom K3EDTA (BD Microtainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA). Vzorce krvi za pridobitev seruma smo odvzeli v 4 mL epruvete s separacijskim gelom in dodatkom aktivatorja koagulacije (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmunster, Avstrija). Vzorce smo pustili stati na sobni temperaturi najmanj 20 minut, da so skoagulirali, in jih nato 10 minut centrifugirali pri $1300 \times g$. Ostanke vzorcev seruma 19 mačk, za katere smo pridobili soglasje lastnikov, da jih lahko uporabimo za nadaljnje raziskave, smo nato razdelili na več delov in jih shranili pri temperaturi $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ za nadaljnje preiskave.

Pri zdravih mačkah smo v okviru preventivnega kontrolnega pregleda določili izbrane hematološke (celotna krvna slika z diferencialno belo krvno sliko) ter biokemijske parametre (serumska koncentracija sečnine in kreatinina, serumska aktivnost alkalne fosfataze in ALT). Preostanek seruma petih mačk smo s soglasjem lastnikov shranili po že prej opisanem postopku z namenom določanja koncentracije citokinov ter proteinov akutne faze vnetja.

3.4 HEMATOLOŠKE PREISKAVE IN HEMATOLOŠKI MARKERJI VNETJA

Hematološke preiskave smo izvajali v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Pri vseh mačkah smo določili celotno krvno sliko in diferencialno belo krvno sliko z avtomatskim hematološkim analizatorjem ADVIA 120 (Siemens, Nemčija), ki deluje na principu pretočne citometrije z lasersko svetlobo in je namenjen za uporabo v veterinarski medicini. Iz rezultatov hematoloških preiskav, tj. koncentracij posameznih vrst levkocitov in trombocitov, smo izračunali razmerja NLR, LMR in TLR. Dodatno smo določili še SII, ki smo ga izračunali kot koncentracija nevtrofilnih granulocitov \times koncentracija trombocitov/koncentracija limfocitov. Ker referenčne vrednosti za hematološke markerje vnetja pri mačkah niso na voljo, smo enaka razmerja izračunali tudi pri 28 zdravih mačkah, vključenih v kontrolno skupino.

3.5 BIOKEMIJSKE PREISKAVE

Na vsakem kontrolnem pregledu je veterinar glede na klinično sliko živali izbral določene biokemijske parametre za analizo. Rutinska biokemijska preiskava je vključevala kontrolo serumske sečnine, kreatinina, serumskih celokupnih beljakovin in albumina ter aktivnost ALT. Poleg tega smo pri manjšem številu mačk izvedli še elektroforezo serumskih beljakovin ter merjenje koncentracije bilirubina. Vse biokemijske parametre smo določali v komercialnem laboratoriju (IDEXX laboratoriji, Nemčija) in jih primerjali z referenčnimi vrednostmi laboratorija IDEXX.

Retrospektivno smo merili tudi aktivnost LDH v shranjenih zamrznjenih vzorcih seruma z uporabo avtomatskega biokemijskega analizatorja RX Daytona+ (Randox, Crumlin, Združeno Kraljestvo), ki deluje na principu spektrofotometrije. Uporabili smo reagenčni komplet Randox (Ref. št.: LD 3842; Lactate Dehydrogenase, L-lactate→pyruvate; Randox, Crumlin, Združeno Kraljestvo). Meritve smo opravili v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

3.6 CITOKINI IN PROTEINI AKUTNE FAZE VNETJA

Vzorci 8/19 mačk so bili primerni za merjenje koncentracije citokinov in proteinov akutne faze vnetja pred in po zdravljenju. Pri ostalih mačkah merjenje ni bilo mogoče zaradi manjkajočih vzorcev bodisi pred ali po terapiji ali zaradi premajhne količine shranjenega seruma. Meritve smo izvajali v laboratoriju Enote za fiziologijo in patološko fiziologijo Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Koncentracijo citokinov in proteinov akutne faze vnetja smo določili tudi pri petih mačkah v kontrolni skupini, ki smo jih glede na anamnestične podatke, klinični pregled in rezultate hematoloških in biokemijskih preiskav imeli za zdrave.

Za določanje koncentracije citokinov in proteinov akutne faze vnetja smo uporabili vrstno specifične, komercialno dostopne kvantitativne sendvič ELISA teste. Izmerili smo koncentracije petih izbranih serumskih parametrov: IL-6, TNF- α , IL-1 β , feritin (Cat IL-6 ELISA kit, Cat. No.: MBS284478; Cat TNF- α ELISA kit, Cat. No.: MBS1602676; Cat IL-1 β kit, Cat. No.: MBS9319075; Cat Ferritin ELISA kit, Cat. No.: MBS096404; vsi Mybiosource, ZDA) in haptoglobin (Feline and Canine Haptoglobin ELISA kit, Cat. No.: TE1033, Teco,

Švica). ELISA teste smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Standarde, ki smo jih uporabili za izdelavo umeritvene krivulje, smo pripravili v šestih različnih koncentracijah za vsak komplet posebej in v skladu s priporočili proizvajalca glede navedene občutljivosti za vsak parameter. Vse testne vzorce, standarde in kontrole kakovosti smo analizirali v dvojnikih po navodilih proizvajalca. Optične gostote smo izmerili pri 450 nm s čitalnikom mikroplošč Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in izračunali povprečno absorbanco obeh meritev vsakega vzorca. Koncentracijo vzorcev smo določili z najprimernejšo standardno krivuljo.

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Primerjali smo parametre pred in po zaključku zdravljenja. Za statistično obdelavo smo uporabili komercialno dostopen statistični program (IBM SPSS 29, Chicago, Illinois, ZDA). Za ugotavljanje normalne porazdelitve rezultatov smo uporabili Shapiro Wilkov test. Na podlagi rezultatov smo za primerjavo podatkov uporabili parametrične oziroma neparametrične teste.

Primerjali smo vrednosti hematoloških preiskav, citokinov in proteinov akutne faze vnetja pred zdravljenjem (vključno z vrednostmi mačk, ki niso bile zdravljene in so bile na voljo) z vrednostmi kontrolne skupine. Prav tako smo s kontrolno skupino primerjali vrednosti teh parametrov po zdravljenju. Pri parametrih, pri katerih smo imeli na voljo rezultate pred in po zdravljenju za isto mačko, smo opravili primerjave vrednosti pred in po zdravljenju za ugotavljanje učinka zdravljenja. Poleg tega smo primerjali tudi vrednosti pred in po zdravljenju med mačkami z mokro in suho obliko FIP-a, tistimi z in brez nevroloških znakov ter tistimi z in brez očesnih znakov.

Vrednosti biokemijskih preiskav pred in po zdravljenju smo primerjali le pri izbranih parametrih, pri katerih smo imeli na voljo rezultate pred in po zdravljenju za isto mačko, za ugotavljanje učinka zdravljenja.

Za ugotavljanje statistično značilnih razlik v izmerjenih parametrih med mačkami s FIP-om in kontrolno skupino pred in po zdravljenju, med mačkami z mokro in suho obliko FIP-a, med mačkami z in brez očesnih znakov ter med mačkami z in brez nevroloških znakov smo v primeru normalne porazdelitve podatkov uporabili neodvisni t-test, v primeru nenormalne

porazdelitve pa Mann-Whitneyev U test. Slednjega smo uporabili tudi za ugotavljanje statistično pomembne razlike v telesni masi med mladimi in odraslimi mačkami. Za mačke s FIP-om smo za primerjavo parametrov pred in po zdravljenju uporabili parni t-test za normalno porazdeljene podatke in Wilcoxon test predznačenih rangov za nenormalno porazdeljene podatke. Razlike smo ovrednotili kot statistično pomembne pri vrednosti $p < 0,05$.

Povezave med merjenimi parametri smo določali z neparametričnim Spearmanovim koeficientom korelacije in jih ovrednotili kot statistično značilne pri vrednosti $p \leq 0,05$.

V nadaljevanju so rezultati posameznih parametrov predstavljeni kot povprečje in standardni odklon v primeru normalne porazdelitve podatkov oziroma kot mediana vrednost in interkvartilni razmik (IQR, angl. Interquartile range; interval od 25. do 75. percentila) v primeru nenormalne porazdelitve.

4 REZULTATI

4.1 OPISNI PODATKI MAČK

V raziskavo smo vključili vzorce 35 lastniških mačk, od tega je bilo 14 samic in 21 samcev, s povprečno starostjo 11 mesecev (IQR: 10,0–23,8 mesecev). Pri 23 (65,7 %) mačkah smo potrdili mokro obliko, pri 12 (34,2 %) mačkah pa suho obliko FIP-a.

Med njimi so bili predstavniki različnih pasem, in sicer: domača kratkodlaka/dolgodlaka mačka (n = 16; 45,7 %), britanska kratkodlaka/dolgodlaka mačka (n = 11; 31,4 %), maine coon (n = 4; 11,4 %), ragdoll (n = 1; 2,9 %), bengalska mačka (n = 1; 2,9 %), sibirska mačka (n = 1; 2,9 %) in perzijska mačka (n = 1; 2,9 %).

V kontrolno skupino smo vključili 28 zdravih mačk, od tega 10 samic in 18 samcev, s povprečno starostjo 16,5 mesecev (IQR: 10,0–23,8 mesecev). Čeprav bile mačke v kontrolni skupini 5,5 mesecev starejše, starostna razlika ni bila značilna ($p = 0,065$).

8/35 (22,8 %) mačk je imelo nevrološke znake, ki so se največkrat kazali kot napadi, ataksija in inkontinenca. 10/35 (28,5 %) mačk je imelo očesne znake, kot so anteriorni uveitis, blefarospazem, fotofobija, konjunktivitis, mioza, pozitivni flare in nizek očesni tlak.

32/35 mačk je bilo zdravljenih z zdravilom GS-441524. 29/32 zdravljenih mačk smo šteli za ozdravljene po zaključku enega ciklusa zdravljenja, saj v času 12 tednov dobe opazovanja po zaključku ni prišlo do ponovitve bolezni. En maček je zaradi napredovale bolezni in posledično kritičnega kliničnega stanja po treh dneh zdravljenja poginil. Pri 2/32 mačk je prišlo do recidiva, in sicer pri prvem 90, pri drugem pa 30 dni po zaključku terapije. Oba mačka sta bila ponovno zdravljena z višjim odmerkom istega zdravila najmanj 12 tednov; v času 12 tednov dobe opazovanja po zaključku drugega ciklusa zdravljenja ni prišlo do ponovnega recidiva. Njune rezultate smo uporabili dvakrat neodvisno v statistični analizi.

Pri vseh 29 ozdravljenih mačkah smo imeli na voljo podatke o njihovi telesni masi pred in po zdravljenju. Telesna masa pred zdravljenjem je bila značilno nižja v primerjavi s starostno primerljivo kontrolno skupino ($p = 0,010$). Po zdravljenju se je značilno povešala (Tabela 1) in je bila primerljiva s telesno maso kontrolne skupine mačk ($p = 0,192$). Primerjali smo tudi dvig

telesne mase ločeno v dveh skupinah, in sicer pri mačkah, mlajših in starejših od enega leta starosti. Dvig telesne mase je bil statistično značilen in neodvisen od starosti mačk.

Tabela 1: Telesna masa pri zdravljenih mačkah pred in po zdravljenju FIP-a in kontrolni skupini mačk

Table 1: Weight in treated and control cats before and after treatment of FIP

Telesna masa (kg)	Telesna masa pred zdravljenjem (kg) Mediana; IQR	Telesna masa po zdravljenju (kg) Mediana; IQR	<i>p</i>
Vse mačke s FIP-om; n = 29	2,85; 2,38–4,00	4,50; 3,80–5,03	< 0,001
Mačke s FIP-om < 1 leto; n = 16	2,55; 1,83–3,05	4,18; 3,19–4,65	< 0,001
Mačke s FIP-om > 1 leto; n = 13	3,50; 3,01–4,35	4,55; 4,00–5,38	0,001
Kontrolna skupina; n = 22	3,90; 3,53–4,62*		

* statistično značilna razlika v telesni masi kontrolne skupine mačk ($p = 0,010$) v primerjavi s skupino vseh mačk s FIP-om pred zdravljenjem; $p < 0,05$ (krepko), statistično značilna razlika pred in po zdravljenju; IQR, interkvartilni razmik (interval od 25. do 75. percentila); n = število vzorcev, vključenih v statistično analizo

* significant difference of weight in control group cats ($p = 0,010$) compared to the group of all FIP cats before treatment; $p < 0,05$ (bold), significant difference before vs after treatment; IQR, 25th – 75th percentile; n = number of data included in the statistical analysis

4.2 HEMATOLOŠKI PARAMETRI IN HEMATOLOŠKI MARKERJI VNETJA

Rezultati osnovnih hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pri skupini mačk pred in po zdravljenju in kontrolni skupini mačk so prikazani v Tabeli 2. Osnovne hematološke preiskave so pri večini mačk s FIP-om pokazale za bolezen značilno levkocitozo z nevtrofilijo, limfopenijo ter blago anemijo. Vrednosti hematoloških parametrov, z izjemo koncentracije monocitov in trombocitov, se statistično značilno razlikujejo med zdravimi mačkami in mačkami s FIP-om. Po zaključenem zdravljenju so bile vrednosti primerljive s kontrolno skupino, z izjemo koncentracije trombocitov, ki je ostala značilno višja. Ko smo primerjali hematološke markerje vnetja, smo ugotovili, da so imele živali s FIP-om značilno

višje vrednosti NLR, SII, TLR ter značilno nižjo vrednost LMR v primerjavi s kontrolno skupino. Po zdravljenju razlike v vrednostih NLR, SII in TLR niso bile več statistično značilne v primerjavi s kontrolno skupino.

Tabela 2: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri skupini mačk pred in po zdravljenju FIP-a in kontrolni skupini mačk

Table 2: Hematological and hemogram-derived inflammatory markers in healthy cats and FIP cats before and after treatment

Parameter	Zdrave mačke	Mačke s FIP-om			
		Pred zdravljenjem	p^a	Po zdravljenju	p^b
LEVKO ($\times 10^9/L$)	n = 28 8,80; 7,65–12,68	n = 36 14,57; 9,07–20,76	0,006	n = 30 10,60; 8,93–12,10	0,225
ERI ^c ($\times 10^{12}/L$)	n = 28 9,38 \pm 1,56	n = 36 7,15 \pm 1,90	< 0,001	n = 30 9,94 \pm 1,16	0,065
HT ^c (L/L)	n = 28 0,413 \pm 0,059	n = 35 0,279 \pm 0,067	< 0,001	n = 30 0,394 \pm 0,051	0,131
HGB ^c (g/L)	n = 28 127,6 \pm 16,1	n = 36 91,9 \pm 22,3	< 0,001	n = 30 131,2 \pm 14,0	0,362
NEVTRO ($\times 10^9/L$)	n = 28 4,58; 2,74–7,23	n = 36 12,03; 8,26–18,17	< 0,001	n = 30 4,83; 4,17–6,05	0,560
LIMFO ($\times 10^9/L$)	n = 28 3,24; 2,68–4,26	n = 36 1,55; 1,05–2,74	< 0,001	n = 30 3,98; 2,91–6,09	0,102
MONO ($\times 10^9/L$)	n = 28 0,290; 0,190–0,608	n = 36 0,390; 0,150–0,680	0,839	n = 30 0,210; 0,130–0,308	0,072
TROMBO ($\times 10^9/L$)	n = 28 263; 221–333	n = 27 258; 168–346	0,613	n = 29 407; 287–435	0,002
NLR	n = 28 1,47; 0,82–2,45	n = 36 7,43; 3,95–11,13	< 0,001	n = 30 1,16; 0,78–1,58	0,234

LMR	n = 28 10,50; 6,41–15,95	n = 34 6,01; 1,71–12,70	0,014	n = 29 18,50; 14,09–26,93	0,001
TLR	n = 28 74,9; 57,8–128,6	n = 27 156,3; 94,2–238,5	0,007	n = 29 88,0; 62,1–126,9	0,737
SII (x 10 ⁹ /L)	n = 28 444,5; 185,4–652,4	n = 27 2265,7; 869,3–3158,4	< 0,001	n = 29 431,5; 264,2–722,6	0,503

^a primerjava kontrolne skupine mačk in mačk s FIP-om pred zdravljenjem, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^b primerjava kontrolne skupine mačk in mačk s FIP-om po zdravljenju, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^c vrednosti podane kot povprečje \pm standardni odklon, ostale vrednosti so podane kot mediana (srednja vrednost) in IQR, interkvartilni razmik (interval od 25. do 75. percentila); LEVKO, koncentracija levkocitov; ERI, koncentracija eritrocitov; HGB, koncentracija hemoglobina; HT, hematokrit; NEVTRO, koncentracija nevtrofilnih granulocitov; LIMFO, koncentracija limfocitov; MONO, koncentracija monocitov; TROMBO, koncentracija trombocitov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; LMR, razmerje med koncentracijo limfocitov in monocitov; TLR, razmerje med koncentracijo trombocitov in limfocitov; SII, sistemski imunsko-vnetni indeks; n = število vzorcev, vključenih v statistično analizo

^a control vs FIP before treatment, significant difference, $p < 0,05$ (bold); ^b control vs FIP after treatment, significant difference, $p < 0,05$ (bold); ^c values reported as mean \pm standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin concentration; HCT, hematocrit; NEUT, neutrophil concentration; LYMPH, lymphocyte concentration; MONO, monocyte concentration; PLT, platelet concentration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic immune-inflammatory index; n = number of data included in the statistical analysis

Pri primerjavi izbranih hematoloških parametrov pred in po zdravljenju smo po zdravljenju ugotovili značilen dvig koncentracije eritrocitov, hemoglobina, limfocitov in hematokrita ter padec koncentracije nevtrofilnih granulocitov. Spremembe v vseh navedenih parametrih so bile statistično značilne. Analiza bele krvne slike je pokazala manj izrazit, vendar še vedno statistično značilen padec koncentracije levkocitov ($p = 0,047$). Prav tako je zdravljenje imelo velik učinek na hematološke markerje vnetja s statistično značilnimi razlikami med vrednostmi pred in po zdravljenju (Tabela 3).

Tabela 3: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pred in po zdravljenju FIP-a

Table 3: Hematological parameters and hemogram-derived inflammatory markers before and after treatment of FIP

Hematološki parametri	Referenčne vrednosti ^a	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	<i>p</i> ^b
LEVKO (x10 ⁹ /L); n = 30	6,3–19,6	11,50; 8,43–18,60	10,60; 8,93–12,10	0,047
ERI ^c (x10 ¹² /L); n = 30	6,0–10,1	7,11 ± 1,57	9,94 ± 1,16	< 0,001
HT ^c (L/L); n = 29	0,28–0,47	0,276 ± 0,059	0,394 ± 0,051	< 0,001
HGB ^c (g/L); n = 30	81–142	91,1 ± 20,4	131,2 ± 14,0	< 0,001
NEVTRO (x 10 ⁹ /L); n = 30	3,0–13,4	10,94; 5,81–17,17	4,83; 4,17–6,05	< 0,001
LIMFO (x 10 ⁹ /L); n = 30	2,0–7,2	1,48; 1,01–2,48	3,98; 2,91–6,09	< 0,001
MONO (x 10 ⁹ /L); n = 30	0–1,0	0,390; 0,143–0,643	0,210; 0,130–0,308	0,016
TROMBO (x 10 ⁹ /L); n = 23	156,4–626,4	248; 163–346	400; 283–432	0,006
NLR; n = 30	n.o.	7,43; 4,03–10,28	1,16; 0,78–1,58	< 0,001
LMR; n = 27	n.o.	6,33; 1,75–12,25	18,50; 14,19–26,35	< 0,001
TLR; n = 23	n.o.	144,2; 92,1–246,3	91,7; 67,4–120,5	0,013
SII (x 10 ⁹ /L); n = 23	n.o.	2160,4; 869,3–3158,4	431,5; 247,5–749,0	< 0,001

^a lastne referenčne vrednosti Diagnostičnega laboratorija Klinike za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani;

^b primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pred in po zdravljenju FIP-a, značilna razlika, *p* < 0,05 (krepko); ^c vrednosti podane kot povprečje ± standardni odklon, ostale vrednosti so podane kot mediana (srednja vrednost) in IQR, interkvartilni razmik (interval od 25. do 75. percentila); LEVKO, koncentracija levkocitov; ERI, koncentracija eritrocitov; HGB, koncentracija hemoglobina; HT, hematokrit; NEVTRO, koncentracija nevtrofilnih granulocitov; LIMFO, koncentracija limfocitov; MONO, koncentracija monocitov; TROMBO, koncentracija trombocitov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; LMR, razmerje med koncentracijo limfocitov in monocitov; TLR, razmerje med koncentracijo trombocitov in limfocitov; SII, sistemski imunsko-vnetni indeks; n = število vzorcev, vključenih v statistično analizo; n. o. = ne obstaja

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2024. Raziskovalna naloga.

^a reference values of the Diagnostic laboratory at Small Animal Clinic, Veterinary Faculty, University of Ljubljana;^b hematological parameters and hemogram-derived inflammatory markers before vs after treatment of FIP, significant difference, $p < 0,05$ (bold), ^c values reported as mean \pm standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin concentration; HCT, hematocrit; NEUT, neutrophil concentration; LYMPH, lymphocyte concentration; MONO, monocyte concentration; PLT, platelet concentration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic immune-inflammatory index; n = number of data included in the statistical analysis; n.o. = not available

Hematološke parametre in hematološke markerje vnetja smo primerjali tudi med mokro in suho obliko FIP-a pred in po zdravljenju (Tabela 4). Statistična analiza je pokazala, da sta bili vrednosti NLR in SII pred terapijo značilno višji pri mokri obliki v primerjavi s suho obliko FIP-a. Ugotovili smo tudi bistveno nižjo, vendar neznačilno ($p = 0,052$) koncentracijo limfocitov pri mokri obliki FIP-a. Po zaključku zdravljenja nismo ugotovili statistično značilnih razlik hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja med mokro in suho obliko FIP-a.

Tabela 4: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri mačkah s suho in mačkah z mokro obliko FIP-a pred in po zdravljenju

Table 4: Hematological and hemogram-derived inflammatory markers in cats with wet and cats with dry form of FIP before and after treatment

Parameter	Pred zdravljenjem		p^a	Po zdravljenju		p^b
	Mokra oblika	Suha oblika		Mokra oblika	Suha oblika	
LEVKO ($\times 10^9/L$)	n = 24 14,82; 9,07–20,73	n = 12 12,71; 7,87–23,06	0,893	n = 19 9,50; 7,50–12,10	n = 11 11,81; 10,0–13,70	0,081
ERI ^c ($\times 10^{12}/L$)	n = 24 7,45 \pm 1,95	n = 12 6,57 \pm 1,73	0,298	n = 19 9,92 \pm 1,24	n = 11 9,96 \pm 1,05	0,683
HT ^c (L/L)	n = 24 0,288 \pm 0,073	n = 11 0,258 \pm 0,048	0,522	n = 19 0,384 \pm 0,050	n = 11 0,410 \pm 0,049	0,189
HGB ^c (g/L)	n = 24 95,2 \pm 24,0	n = 12 85,3 \pm 17,4	0,470	n = 19 130,4 \pm 16,6	n = 11 132,5 \pm 8,4	0,464
NEVTRO ($\times 10^9/L$)	n = 24 13,16; 6,26–16,57	n = 12 10,27; 5,86–19,23	0,880	n = 19 4,60; 4,09–5,40	n = 11 5,79; 4,20–7,40	0,107

LIMFO (x 10 ⁹ /L)	n = 24 1,23; 1,02–2,20	n = 12 2,40; 1,31–4,69	0,052	n = 19 3,35; 2,91–4,80	n = 11 5,02; 2,90–7,0	0,505
MONO (x 10 ⁹ /L)	n = 24 0,300; 0,120–0,678	n = 12 0,510; 0,188–0,703	0,275	n = 19 0,200; 0,140–0,250	n = 11 0,270; 0,100–0,350	0,389
TROMBO (x 10 ⁹ /L)	n = 18 261; 205–357	n = 9 220; 165–391	0,758	n = 18 404; 261–431	n = 11 417; 343–496	0,271
NLR	n = 24 8,90; 4,63–14,55	n = 12 4,98; 2,37–8,39	0,044	n = 19 1,16; 0,92–1,53	n = 11 1,16; 0,65–2,55	0,796
LMR	n = 22 4,97; 1,56–12,70	n = 12 6,0; 2,01–12,70	0,829	n = 18 17,55; 13,46–26,68	n = 11 19,58; 15,81–27,50	0,559
TLR	n = 18 177,0; 120,4–243,8	n = 9 117,8; 49,3–201,3	0,064	n = 18 91,0; 68,2–123,7	n = 11 87,6; 55,1–138,1	0,893
SII (x 10 ⁹ /L)	n = 18 2719,4; 1190,0–3971,5	n = 9 1056,5; 701,5–1804,9	0,045	n = 18 431,5; 282,5–636,5	n = 11 508,1; 247,5–869,7	0,621

^a primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pri mačkah z mokro in suho obliko FIP-a pred zdravljenjem, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^b primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pri mačkah z mokro in suho obliko FIP-a po zdravljenju, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^c vrednosti podane kot povprečje \pm standardni odklon, ostale vrednosti so podane kot mediana (srednja vrednost) in IQR, interkvartilni razmik (interval od 25. do 75. percentila); LEVKO, koncentracija levkocitov; ERI, koncentracija eritrocitov; HGB, koncentracija hemoglobina; HT, hematokrit; NEVTRO, koncentracija nevtrofilnih granulocitov; LIMFO, koncentracija limfocitov; MONO, koncentracija monocitov; TROMBO, koncentracija trombocitov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; LMR, razmerje med koncentracijo limfocitov in monocitov; TLR, razmerje med koncentracijo trombocitov in limfocitov; SII, sistemski imunsko-vnetni indeks; n = število vzorcev, vključenih v statistično analizo

^a hematological parameters and hemogram-derived inflammatory markers in cats with wet vs dry form of FIP before treatment, significant difference, $p < 0,05$ (bold); ^b hematological parameters and hemogram-derived inflammatory markers in cats with wet vs dry form of FIP after treatment, significant difference, $p < 0,05$ (bold); values reported as mean \pm standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin concentration; HCT, hematocrit; NEUT, neutrophil concentration; LYMPH, lymphocyte concentration; MONO, monocyte concentration; PLT, platelet concentration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte

ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic immune-inflammatory index; n = number of data included in the statistical analysis

Primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja med mačkami glede na prisotnost očesnih znakov (Tabela 5) je pokazala značilno višjo koncentracijo limfocitov po terapiji pri mačkah z očesnimi znaki. Poleg tega smo ugotovili, da sta vrednosti SII in TLR po terapiji značilno višji pri mačkah z očesnimi znaki.

Tabela 5: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri mačkah z in brez očesnih znakov pred in po zdravljenju FIP-a

Table 5: Hematological and hemogram-derived inflammatory markers in cats with and without ocular clinical signs before and after treatment of FIP

Parameter	Pred zdravljenjem		p^a	Po zdravljenju		p^b
	Očesni znaki	Brez očesnih znakov		Očesni znaki	Brez očesnih znakov	
LEVKO ($\times 10^9/L$)	n = 10 12,04; 8,61–16,27	n = 26 14,82; 9,18–22,22	0,417	n = 9 10,0; 8,75–11,61	n = 21 10,70; 8,85–13,93	0,402
ERI ^c ($\times 10^{12}/L$)	n = 10 6,28 \pm 1,75	n = 26 7,49 \pm 1,88	0,133	n = 9 9,90 \pm 1,07	n = 21 9,95 \pm 1,22	0,751
HT ^c (L/L)	n = 10 0,245 \pm 0,044	n = 25 0,292 \pm 0,070	0,047	n = 9 0,384 \pm 0,035	n = 21 0,398 \pm 0,056	0,541
HGB ^c (g/L)	n = 10 85,0 \pm 21,7	n = 26 94,5 \pm 22,3	0,396	n = 9 129,3 \pm 9,1	n = 21 132,0 \pm 15,8	0,634
NEVTRO ($\times 10^9/L$)	n = 10 10,27; 6,91–14,87	n = 26 13,35; 5,81–19,45	0,491	n = 9 5,79; 4,31–7,10	n = 21 4,60; 4,15–5,60	0,182
LIMFO ($\times 10^9/L$)	n = 10 1,73; 1,08–3,26	n = 26 1,55; 1,03–2,89	0,621	n = 9 2,90; 1,83–4,0	n = 21 4,33; 3,13–7,10	0,005
MONO ($\times 10^9/L$)	n = 10 0,510; 0,150–0,70	n = 26 0,385; 0,118–0,698	0,548	n = 9 0,250; 0,120–0,325	n = 21 0,210; 0,145–0,305	0,982
TROMBO ($\times 10^9/L$)	n = 7 234; 168–389	n = 20 261; 177–346	0,956	n = 8 417; 278–482	n = 21 400; 287–432	0,591

NLR	n = 10 5,97; 3,50–8,48	n = 26 8,43; 3,91–12,86	0,306	n = 9 1,75; 0,88–3,56	n = 21 1,02; 0,77–1,50	0,052
LMR	n = 10 5,30; 1,81–14,12	n = 24 6,47; 1,62–11,86	0,940	n = 9 18,43; 6,87–31,10	n = 20 19,04; 14,19–25,76	0,509
TLR	n = 7 156,3; 117,8–210,8	n = 20 158,1; 92,6–244,4	0,868	n = 8 128,2; 87,7–197,5	n = 21 84,8; 53,0–108,2	0,022
SII (x 10 ⁹ /L)	n = 7 1293,2; 948,5–2351,3	n = 20 2554,5; 650,7–3827,6	0,268	n = 8 834,6; 483,3–1279,7	n = 21 412,9; 249,3–584,8	0,010

^a primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pri mačkah z in brez očesnih znakov pred zdravljenjem FIP-a, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^b primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pri mačkah z in brez očesnih znakov po zdravljenju FIP-a, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^c vrednosti podane kot povprečje \pm standardni odklon, ostale vrednosti so podane kot mediana (srednja vrednost) in IQR, interkvartilni razmik (interval od 25. do 75. percentila); LEVKO, koncentracija levkocitov; ERI, koncentracija eritrocitov; HGB, koncentracija hemoglobina; HT, hematokrit; NEVTRO, koncentracija nevtrofilnih granulocitov; LIMFO, koncentracija limfocitov; MONO, koncentracija monocitov; TROMBO, koncentracija trombocitov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; LMR, razmerje med koncentracijo limfocitov in monocitov; TLR, razmerje med koncentracijo trombocitov in limfocitov; SII, sistemski imunsko-vnetni indeks; n = število vzorcev, vključenih v statistično analizo

^a hematological and hemogram-derived inflammatory markers in cats with vs without ocular clinical signs before treatment of FIP, significant difference, $p < 0,05$ (bold); ^b hematological and hemogram-derived inflammatory markers in cats with vs without ocular clinical signs after treatment of FIP, significant difference, $p < 0,05$ (bold), ^c values reported as mean \pm standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin concentraton; HCT, hematocrit; NEUT, neutrophil concentration; LYMPH, lymphocyte concentration; MONO, monocyte concentration; PLT, platelet concentration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic immune-inflammatory index; n = number of data included in the statistical analysis

Pri primerjavi hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja med mačkami glede na prisotnost nevroloških znakov (Tabela 6) nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

Tabela 6: Hematološki parametri in hematološki markerji vnetja pri mačkah z in brez nevroloških znakov pred in po zdravljenju FIP-a

Table 6: Hematological and hemogram-derived inflammatory markers in cats with and without neurological clinical signs before and after treatment of FIP

Parameter	Pred zdravljenjem		p^a	Po zdravljenju		p^b
	Nevrološki znaki	Brez nevroloških znakov		Nevrološki znaki	Brez nevroloških znakov	
LEVKO ($\times 10^9/L$)	n = 7 15,39; 9,60–18,67	n = 29 14,47; 8,93–21,79	0,826	n = 6 9,75; 9,14–11,20	n = 24 10,90; 8,78–13,30	0,500
ERI ^c ($\times 10^{12}/L$)	n = 7 5,94 \pm 2,07	n = 29 7,45 \pm 1,77	0,101	n = 6 9,77 \pm 0,77	n = 24 9,98 \pm 1,25	0,697
HT ^c (L/L)	n = 7 0,239 \pm 0,054	n = 28 0,289 \pm 0,067	0,108	n = 6 0,387 \pm 0,035	n = 24 0,396 \pm 0,054	0,678
HGB ^c (g/L)	n = 7 77,4 \pm 19,4	n = 29 95,3 \pm 21,8	0,089	n = 6 133,2 \pm 8,0	n = 24 130,7 \pm 15,2	0,451
NEVTRO ($\times 10^9/L$)	n = 7 13,80; 7,60–18,67	n = 29 10,98; 5,76–17,84	0,689	n = 6 4,92; 3,22–6,81	n = 24 4,83; 4,22–6,55	0,775
LIMFO ($\times 10^9/L$)	n = 7 1,90; 1,29–4,94	n = 29 1,35; 1,03–2,73	0,348	n = 6 3,35; 1,63–5,52	n = 24 4,25; 2,92–6,36	0,325
MONO ($\times 10^9/L$)	n = 7 0,300; 0,150–0,650	n = 29 0,390; 0,135–0,705	0,779	n = 6 0,195; 0,090–0,283	n = 24 0,215; 0,153–0,323	0,392
TROMBO ($\times 10^9/L$)	n = 5 457; 165–466	n = 22 253; 199–325	0,289	n = 6 425; 343–572	n = 23 400; 283–431	0,282
NLR	n = 7 7,26; 2,28–9,47	n = 29 7,60; 3,99–11,90	0,536	n = 6 1,50; 0,56–4,29	n = 24 1,12; 0,82–1,53	0,407
LMR	n = 7 6,33; 1,98–17,60	n = 27 4,91; 1,57–10,67	0,456	n = 6 18,91; 12,97–38,13	n = 23 18,43; 13,98–26,35	0,872
TLR	n = 5	n = 22	0,454	n = 6	n = 23	0,162

	246,3; 90,7–288,3	150,2; 93,7–216,8		127,4; 76,1–245,9	87,6; 56,8–118,3	
SII (x 10 ⁹ /L)	n = 5 1344,0; 1002,5–3863,8	n = 22 2308,5; 763,4–2949,9	0,708	n = 6 668,3; 231,1 – 1850,1	n = 23 431,5; 266,3 – 648,4	0,389

^a primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pri mačkah z in brez nevroloških znakov pred zdravljenjem FIP-a, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^b primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja pri mačkah z in brez nevroloških znakov po zdravljenju FIP-a, značilna razlika, $p < 0,05$ (krepko); ^c vrednosti podane kot povprečje \pm standardni odklon, ostale vrednosti so podane kot mediana (srednja vrednost) in IQR, interkvartilni razmik (interval od 25. do 75. percentila); LEVKO, koncentracija levkocitov; ERI, koncentracija eritrocitov; HGB, koncentracija hemoglobina; HT, hematokrit; NEVTRO, koncentracija nevtrofilnih granulocitov; LIMFO, koncentracija limfocitov; MONO, koncentracija monocitov; TROMBO, koncentracija trombocitov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; LMR, razmerje med koncentracijo limfocitov in monocitov; TLR, razmerje med koncentracijo trombocitov in limfocitov; SII, sistemski imunsko-vnetni indeks; n = število vzorcev, vključenih v statistično analizo

^a hematological and hemogram-derived inflammatory markers in cats with vs without neurological clinical signs before treatment of FIP, significant difference, $p < 0,05$ (bold); ^b hematological and hemogram-derived inflammatory markers in cats with vs without neurological clinical signs after treatment of FIP, significant difference, $p < 0,05$ (bold); ^c values reported as mean \pm standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin concentration; HCT, hematocrit; NEUT, neutrophil concentration; LYMPH, lymphocyte concentration; MONO, monocyte concentration; PLT, platelet concentration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic immune-inflammatory index; n = number of data included in the statistical analysis

4.3 BIOKEMIJSKI PARAMETRI

V okviru diagnostike bolezni smo opravili biokemijske preiskave krvi pri mačkah pred zdravljenjem. Odstopanja, ki smo jih ugotovili, so bila hiperproteinemija s hiperglobulinemijo, hipalbuminemija, znižano razmerje A/G in hiperbilirubinemija (Tabela 7). Biokemijski parametri po zdravljenju niso bili na voljo za vse paciente, zato smo primerjavo parametrov pred in po zdravljenju opravili na manjšem vzorcu mačk. Večina biokemijskih parametrov je bila po zdravljenju znotraj meja referenčnih vrednosti: opazili smo značilno znižanje koncentracije celokupnih beljakovin in bilirubina ter znižanje absolutne in relativne koncentracije globulinov. Vrednosti albuminov, razmerja A/G in aktivnosti ALT so se po zdravljenju značilno povešale. Pri mačkah s FIP-om smo po terapiji ugotovili značilno nižje

vrednosti alfa-2 in gama globulinov v primerjavi s skupino mačk pred zdravljenjem. Pri ostalih frakcijah nismo opazili statistično značilnih razlik.

Tabela 7: Izbrani biokemijski parametri pred in po zdravljenju FIP-a ter njihove referenčne vrednosti

Table 7: Selected biochemical parameters before and after treatment of FIP and their reference values

Biokemijski parametri	Referenčne vrednosti ^a	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	<i>p</i>
CB ^b (g/L); n = 29	59–87	84,0 ± 15,6	72,9 ± 6,2	< 0,001
ALB ^b (g/L); n = 29	31–47	23,6 ± 6,3	36,7 ± 3,6	< 0,001
ALB ^b (%); n = 29	44,5–62,3	28,7 ± 8,9	50,6 ± 6,2	< 0,001
GLOB ^b (g/L); n = 29	28,0–51,0	60,1 ± 16,2	36,3 ± 7,0	< 0,001
GLOB ^b (%); n = 29	n.o.	70,9 ± 9,6	49,4 ± 6,4	< 0,001
A/G ^b ; n = 29	>0,57	0,433 ± 0,224	1,058 ± 0,265	< 0,001
Alfa-1 globulini (g/L); n = 7	1,6–5,2	1,8; 1,6–2,1	2,3; 2,0–2,5	0,176
Alfa-2 globulini (g/L); n = 7	4,0–12,8	8,4; 6,1–11,1	5,5; 4,6–7,4	0,018
Beta-1 globulini (g/L); n = 7	1,9–7,4	4,5; 3,8–5,1	5,2; 5,0–5,5	0,150
Beta-2 globulini (g/L); n = 7	2,0–8,5	7,0; 5,8–8,1	6,1; 5,0–6,7	0,128
Gama-globulini (g/L); n = 7	3,6–16,9	32,9; 19,0–47,6	12,7; 12,3–19,4	0,028
ALT (U/L); n = 28	27–110	39,0; 31,3–50,8	67,5; 50,0–80,0	< 0,001
Bilirubin (μmol/L); n = 25	0–6,8	8,00; 4,05–23,40	3,20; 2,60–3,80	< 0,001
LDH (U/L); n = 9	21–217	119,0; 80,5–152,5	110,0; 75,5–172,5	0,594

^a IDEXX laboratoriji; ^b vrednosti, podane kot povprečje ± standardni odklon, ostale vrednosti so podane kot mediana (srednja vrednost) in IQR, interkvartilni razmik (interval od 25. do 75. percentila); *p* < 0,05 (krepko), statistično značilna razlika pred in po zdravljenju; CB, koncentracija celokupnih beljakovin; ALB, albumini; GLOB, globulini; A/G, razmerje med albumini in globulini; ALT, alanin-aminotransferaza; n = število vzorcev vključenih v statistično analizo; n.o. = ne obstaja

^a IDEXX laboratories; ^b values reported as mean ± standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); *p* < 0,05 (bold), significant difference before vs after treatment; TP, total protein

concentration; ALB, albumin; GLOB, globulins; A/G, albumin-to-globulin ratio; ALT, alanine aminotransferase; n = number of data included in the statistical analysis; n.o. = not available

4.4 CITOKINI IN PROTEINI AKUTNE FAZE VNETJA

4.4.1 Tumorje nekrotizirajoči dejavnik- α

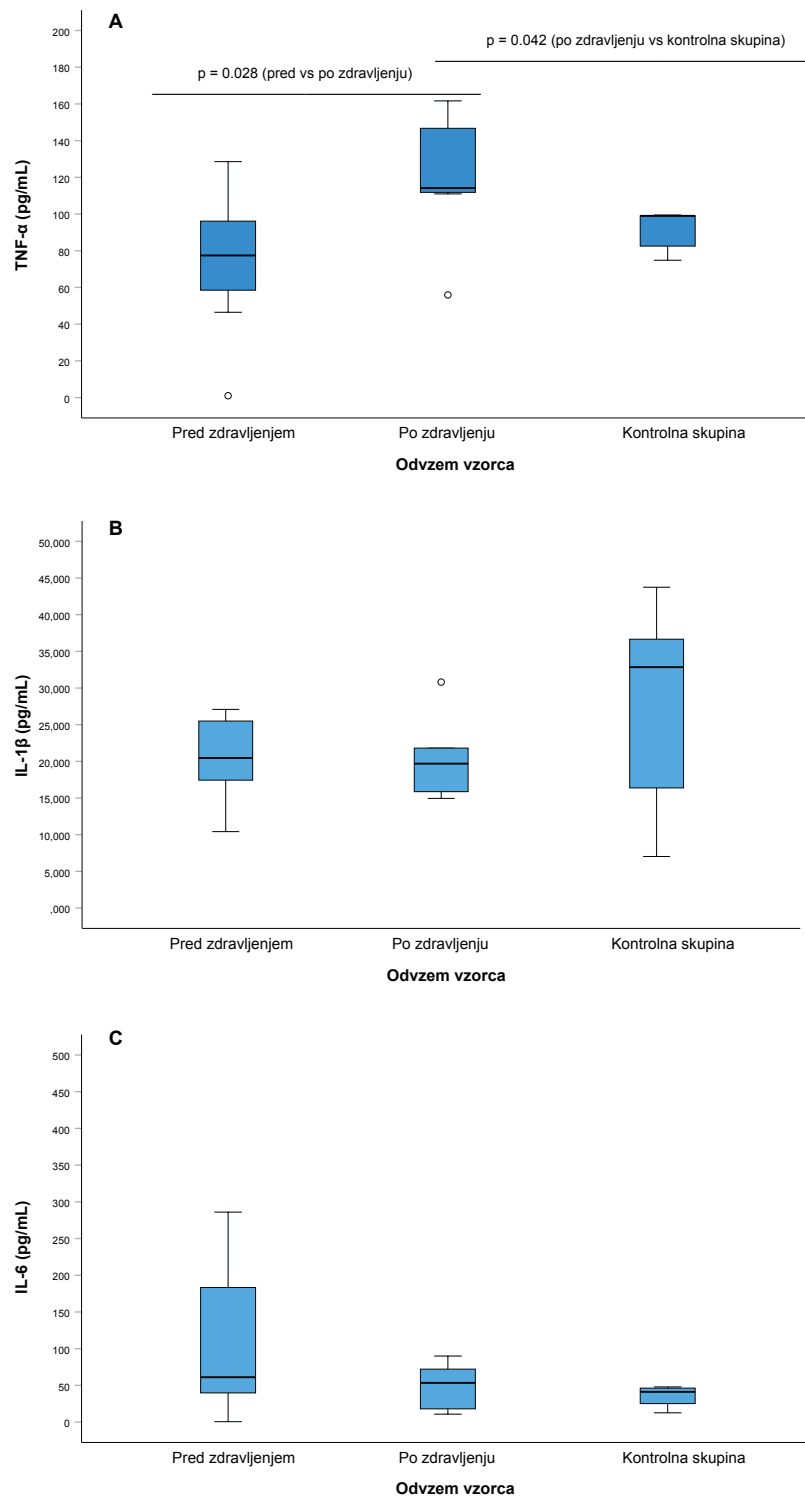
Koncentracija TNF- α (Slika 1A) se je po zdravljenju značilno povišala iz mediane koncentracije 77,4 pg/mL (IQR: 46,5–103,5 pg/mL) na 114,2 pg/ml (IQR: 111,0–158,4 pg/mL) ($p = 0,028$). Po zdravljenju so imele mačke značilno višje koncentracije TNF- α v primerjavi z zdravimi mačkami (99,0 pg/mL, IQR: 78,7–99,2 pg/mL; $p = 0,042$).

4.4.2 Interlevkin-1 β

Koncentracija IL-1 β (Slika 1B) se je po zdravljenju rahlo znižala iz mediane koncentracije 20,3 pg/mL (IQR: 13,9–26,3 pg/mL) na 19,7 pg/mL (IQR: 15,4–26,3 pg/mL). Pri primerjavi serumskih koncentracij IL-1 β nismo ugotovili značilnih razlik pri mačkah pred in po zdravljenju ter med mačkami s FIP-om in kontrolno skupino.

4.4.3 Interlevkin-6

Koncentracija IL-6 (Slika 1C) se je po terapiji znižala iz mediane koncentracije 61,1 pg/mL (IQR: 36,6–286,0 pg/mL) na 53,4 pg/mL (IQR: 11,2–90,0 pg/mL), toda razlika ni bila značilna ($p = 0,128$). Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji IL-6 pri mačkah pred in po zdravljenju ter med mačkami s FIP-om in kontrolno skupino.



Slika 1: Koncentracije tumorje nekrotizirajočega dejavnika-alfa (TNF- α) (A), interlevkina-1 β (IL-1 β) (B) in interlevkina-6 (IL-6) (C) pred in po zdravljenju FIP-a ter pri kontrolni skupini zdravih mačk

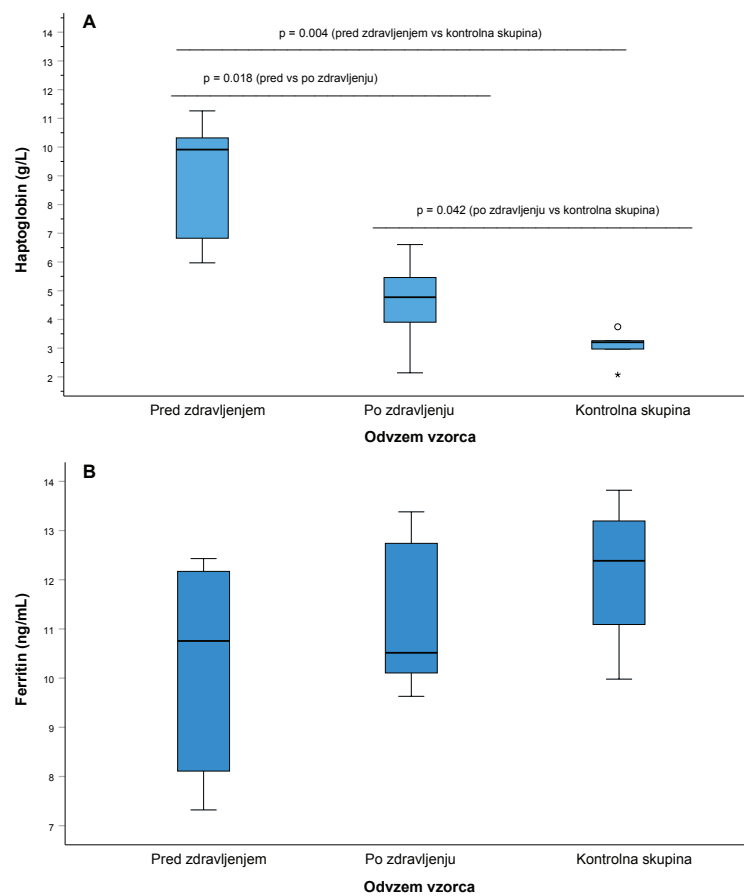
Figure 1: Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) (A), interleukin-1 β (IL-1 β) (B) and interleukin-6 (IL-6) (C) concentrations before and after FIP treatment and in the control group of healthy cats

4.4.4 Haptoglobin

Pri proteinih akutne faze vnetja smo opazili statistično značilne spremembe v koncentraciji haptoglobina po zdravljenju (Slika 2A). Njegova koncentracija se je značilno znižala ($p = 0,018$) iz 9,91 g/L (IQR: 6,41–10,53 g/L) na 4,77 g/L (IQR: 3,56–5,47). V primerjavi s kontrolno skupino, je bila koncentracija haptoglobina značilno višja tako pred ($p = 0,004$) kot po zdravljenju ($p = 0,042$). Koncentracija po zdravljenju se je približala koncentraciji kontrolne skupine (mediana: 3,21; IQR: 2,55–3,50 g/L), pri čemer je bila vrednost p na meji statistične značilnosti ($p = 0,042$).

4.4.5 Feritin

Koncentracija feritina pred in po zdravljenju (Slika 2B), 10,76 ng/mL (IQR: 8,05–12,30 ng/mL) in 10,52 ng/mL (IQR: 10,00–12,83 ng/mL), je bila nižja v primerjavi s kontrolno skupino (mediana: 12,39 ng/mL; IQR: 10,54–13,51 ng/mL), vendar spremembe niso dosegle statistične značilnosti pri nobeni izmed primerjav.



Slika 2: Koncentracije haptoglobina (A) in feritina (B) pred in po zdravljenju FIP-a ter pri kontrolni skupini zdravih mačk

Figure 2: Haptoglobin (A) and ferritin (B) concentration before and after FIP treatment and in the control group of healthy cats

4.5 POVEZAVE PARAMETROV PRED IN PO TERAPIJI

Ugotavljali smo tudi povezave med koncentracijo citokinov in proteinov akutne faze vnetja ter parametri diferencialne bele krvne slike in hematološkimi markerji vnetja. V Tabeli 8 in Tabeli 9 so prikazane le značilne povezave med parametri pred in po terapiji.

V skupini mačk pred zdravljenjem smo ugotovili značilno negativno povezavo med hematokritom in koncentracijo haptoglobina ter hematokritom in koncentracijo feritina. Negativna povezava med koncentracijo IL-1 β in hematokritom je bila na meji statistične značilnosti ($p = 0,052$). Pri TNF- α in IL-6 nismo ugotovili nobenih značilnih povezav.

Tabela 8: Značilne ($p \leq 0,05$) povezave izmerjenih parametrov pri mačkah s FIP-om pred zdravljenjemTable 8: Significant ($p \leq 0,05$) correlations between measured parameters in cats with FIP before treatment

Mačke pred zdravljenjem	Hematokrit (L/L)	IL-1 β (pg/mL)
Haptoglobin (g/L)	$\rho = -0,695$ p = 0,038	
Feritin (ng/mL)	$\rho = -0,778$ p = 0,023	$\rho = 0,841$ p = 0,036

ρ – Spearmanov koeficient; IL-1 β – interlevkin-1 β

ρ – Spearman's coefficient; IL-1 β – Interleukin-1 β

Po zdravljenju smo ugotovili značilno pozitivno povezavo med hematokritom in koncentracijo haptoglobina, značilno negativno povezavo med koncentracijo trombocitov in haptoglobina, značilno pozitivno povezavo med koncentracijo monocitov in IL-1 β , značilno pozitivno povezavo med vrednostjo NLR in koncentracijo TNF- α ter značilno negativno povezavo med vrednostjo LMR in koncentracijo TNF- α . Pri feritinu in IL-6 nismo ugotovili nobenih značilnih povezav.

Tabela 9: Značilne ($p \leq 0,05$) povezave izmerjenih parametrov pri mačkah s FIP-om po zdravljenjuTable 9: Significant ($p \leq 0,05$) correlations between measured parameters in cats with FIP after treatment

Mačke po zdravljenju	Hematokrit (L/L)	Trombociti ($\times 10^9/L$)	Monociti ($\times 10^9/L$)	NLR	LMR
Haptoglobin (g/L)	$\rho = 0,857$ p = 0,014	$\rho = -0,857$ p = 0,014			
IL-1 β (pg/mL)			$\rho = 0,943$ p = 0,005		
TNF- α (pg/mL)				$\rho = 0,821$ p = 0,023	$\rho = -0,821$ p = 0,023

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2024. Raziskovalna naloga.

r – Spearmanov koeficient; TNF- α – tumorje nekrotizirajoči dejavnik-alfa; IL-1 β – interlevkin-1 β ; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; LMR, razmerje med koncentracijo limfocitov in monocitov

r – Spearman's coefficient; TNF- α – Tumor Necrosis Factor-alpha; IL-1 β – Interleukin – 1 β ; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio

5 RAZPRAVA

V okviru naše raziskave smo s klinično uspešnim zdravljenjem mačk s FIP-om z GS-441524 dosegli normalizacijo večine hematoloških in biokemijskih parametrov ter hematoloških markerjev vnetja, ki so v času diagnoze izstopali iz meja referenčnih vrednosti, ter ugotovili pomembne spremembe v koncentraciji nekaterih citokinov in proteinov akutne faze vnetja po klinični remisiji bolezni.

FIP se pogosteje pojavlja pri pasemskih mačkah (10, 16, 17, 18). Različne študije opisujejo predispozicije pri pasmah, kot so britanska, bengalska, birmanska, himalajska, abesinska, ragdoll in rex pasme (10, 16, 18). Taylor in sod. (2023) so v raziskavi, v katero so vključili 306 mačk s FIP-om, ugotovili, da je bilo kar 2/3 mačk pasemskih. Tri najpogostejše pasme v njihovi raziskavi so bile britanska kratkodlaka mačka (57/192; 29,7 %), ragdoll (32/192; 16,6 %) in maine coon (15/192; 7,8 %). V naši raziskavi so prav tako prevladovale pasemske mačke (n = 19; 54,3 %), med katerimi je bilo največ britanskih kratkodlakih in dolgodlakih mačk ter mačk pasme maine coon. Za FIP je značilno, da se pojavlja pri mladih mačkah (4, 10, 14), najpogosteje pri starosti od treh mesecev do dveh let (14), kar smo potrdili tudi v naši raziskavi. Izračunana povprečna starost mačk s FIP-om v naši raziskavi je bila 11 mesecev.

Poleg starosti in pasme številne študije poročajo o večjem tveganju za razvoj FIP-a pri samcih (10, 61, 92). Spolno predispozicijo pripisujejo negativnemu učinku androgenov na imunski sistem. Poleg tega v raziskavi Hu in sod. poročajo o večji prevalenci FIP-a pri intaktnih mačkah ne glede na spol (92). V naši študiji je bilo 21/35 (60 %) mačk samcev, od tega je bilo zgolj 6/35 (17,1 %) mačk intaktnih, vendar je naš vzorec premajhen, da bi lahko na podlagi tega delali zaključke.

Specifična protivirusna terapija z GS-441524 se je izkazala kot uspešna pri zdravljenju mačk s FIP-om. Številne raziskave poročajo o 80–94 % stopnji remisije, nekatere dosegajo celo 100 % stopnjo uspešnosti (5, 6, 8, 18, 30, 31, 61, 82, 93). V najboljšejši, trenutno objavljeni raziskavi, v katero so vključili preko 300 mačk, je do recidiva prišlo pri približno 10 % mačk (18), kar se sklada z rezultati naše raziskave, v kateri je do recidiva prišlo pri 2/31 (6,4 %) preživelih mačk. Oba pacienta smo ponovno zdravili z GS-441524. Na ponovno zdravljenje sta se uspešno odzvala in ostala asimptomatska do danes, to je približno leto in pol kasneje. Ena od mačk z recidivom je bila mačka pasme ragdoll. Green in sod. (2023) v svoji raziskavi

poročajo o slabem odzivu na zdravljenje pri mačkah te pasme, in sicer opisujejo zapoznel odziv na terapijo in ponovitev bolezni pri vseh treh mačkah pasme ragdoll, pri čemer so 2/3 mačk zaradi slabe klinične slike morali evtanazirati (61). Število mačk pasme ragdoll je v omenjeni in naši študiji premajhno za statistično analizo, vendar pa nakazuje, da bi bilo v prihodnosti smiselno raziskati potencialne pasemsko specifične odzive na terapijo.

Dvig v telesni masi zdravljenih mačk je pogosto opisan izid pri uspešni terapiji FIP-a (76, 79). To smo potrdili tudi v naši raziskavi, pri čemer pridobitev telesne mase ni bila povezana z morebitno akumulacijo tekočine v telesnih votlinah, saj so pri vseh vključenih mačkah izlivi izzveneli znotraj prvega meseca zdravljenja. FIP običajno prizadene mlajše živali, zato je bilo pomembno določiti, ali je dvig telesne mase posledica rasti. To smo ocenili tako, da smo mačke razdelili v dve podkategoriji glede na njihovo starost (mačke, mlajše od enega leta starosti, in mačke, starejše od enega leta starosti), pri čemer smo ugotovili, da je bilo povečanje telesne mase značilno v obeh starostnih skupinah. Redno tehtanje mačk med zdravljenjem FIP-a je potrebno zaradi prilagajanja odmerkov zdravil, hkrati pa predstavlja enostavno in neinvazivno metodo za spremljanje uspešnosti terapije.

V naši raziskavi smo se osredotočili predvsem na ocenjevanje izbranih klinično-patoloških parametrov s poudarkom na vnetnih parametrih, pri čemer nas je zanimala povezava med izbranimi krvnimi parametri in kliničnim odzivom. Rutinske laboratorijske preiskave so pri bolnih mačkah v času diagnoze pokazale že prej opisane tipične klinično-patološke spremembe, povezane s FIP-om (4, 8, 18, 23, 45, 61, 82). Odstopanja v krvni sliki, ki smo jih ugotovili pri mačkah s FIP-om, so levkocitoza z limfopenijo in nevtrofilijo ter anemija. Spremembe v krvni sliki so posledica izrazitega sistemskega vnetnega odziva, značilnega za FIP (25).

Zdravljenje je vplivalo na večino hematoloških in biokemijskih parametrov tako, da so bile njihove vrednosti po terapiji znotraj referenčnih območij oziroma se niso značilno razlikovale od vrednosti kontrolne skupine zdravih mačk. Tudi druge študije, ki so uporabljale različne pristope k zdravljenju FIP-a, bodisi s parenteralno ali peroralno aplikacijo GS-441524 ali remdesivirja, so prišle do podobnih opažanj (8, 18, 61, 76, 79, 82, 93). Vendar pa se je v nasprotju z našo raziskavo večina predhodnih študij opirala le na opisno statistiko klinično-patoloških sprememb med zdravljenjem, brez uporabe statističnih metod za primerjavo izmerjenih parametrov ali pa so primerjali veliko manjši nabor laboratorijskih parametrov.

Pri mačkah s FIP-om je anemija opisana kot eden od najpogostejših laboratorijskih odstopanj. Anemijo (vrednost hematokrita pod 0,28 L/L) smo zaznali pri 20/35 (57 %) mačk s FIP-om. Poleg tega smo potrdili, da se tipično pojavlja blaga oblika anemije, saj je bila mediana vrednost hematokrita 0,279 L/L, kar sovпада z rezultati drugih raziskav (18, 45). Mediana koncentracija eritrocitov in hemoglobina je bila pri mačkah s FIP-om značilno nižja v primerjavi s kontrolno skupino, vendar je ostala znotraj referenčnih vrednosti Diagnostičnega laboratorija Klinike za male živali Univerze v Ljubljani. Po terapiji so bile vrednosti hematokrita in koncentracije eritrocitov in hemoglobina primerljive s kontrolno skupino. Če predpostavljamo, da gre pri teh pacientih za anemijo, povzročeno z vnetjem, je normalizacija hematokrita po uspešnem zdravljenju pričakovana.

Sprememba v koncentraciji trombocitov in monocitov pri mačkah s FIP-om ni pogosto hematološko odstopanje (43, 45). Mediana koncentracija trombocitov je bila v naši raziskavi $248 \times 10^9/L$, kar je v skladu z rezultati Riemer in sod. (2016), ki so ugotovili mediano koncentracijo trombocitov pri mačkah s FIP-om $240 \times 10^9/L$. Poleg tega so zaznali trombocitopenijo pri 27,8 % mačk (45). Do podobnih rezultatov so prišli tudi s študijami pri ljudeh, kjer so ugotovili, da se trombocitopenija pojavi pri 24,9–36,2 % ljudi s COVID-19 (94, 95) in je negativen prognostični dejavnik (94). V naši raziskavi nismo ugotovili statistično značilne razlike v koncentraciji trombocitov in monocitov med mačkami s FIP-om in zdravimi mačkami. Kljub temu pa smo pokazali, da se koncentracija trombocitov med zdravljenjem značilno zviša, koncentracija monocitov pa značilno zniža. Do podobnih ugotovitev so prišli Krentz in sod. (2022), ki so spremljali dinamiko laboratorijskih parametrov pri mačku, ki je bil zdravljen z GS-441524 (93). Na podlagi teh rezultatov bi bilo smiselno ta dva parametra v prihodnje vključiti v raziskave prognostičnih dejavnikov za zdravljenje FIP-a.

Citokini, ki se sprostijo med vnetjem, stimulirajo os hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza, kar ima za posledico spremembo v populaciji levkocitov. Limfopenija je pogosta najdba pri mačkah s FIP-om (45, 21) in je negativni prognostični dejavnik (21). Povečana apoptoza B in T limfocitov je posledica povečanega izražanja TNF- α (47, 96). V naši raziskavi smo limfopenijo (vrednost limfocitov pod $2,0 \times 10^9/L$) ugotovili pri 22/36 (61,1 %) mačkah. Limfopenija naj bi bila izrazitejša pri mačkah z mokro obliko zaradi perivaskularne migracije limfocitov kot posledica vaskulitisa (45). V naši raziskavi nismo ugotovili statistično značilne razlike v koncentraciji limfocitov med mokro in suho obliko FIP-a, kar je v skladu z rezultati

raziskave Sparkes in sod. (1991), vendar je treba omeniti, da se je razlika približala pragu statistične značilnosti ($p = 0,052$). Po terapiji se je koncentracija limfocitov značilno povišala in poenotila s skupino zdravih živali. Limfocitoza po zdravljenju je bila predhodno že opisana (8, 77). Zwicklbauer in sod. (2023) so ugotovili blago do zmerno limfocitozo pri 77,7 % ozdravljenih mačk in predpostavljajo, da bi limfocitoza po terapiji lahko bila pozitiven prognostični dejavnik za ozdravitev (8). V naši študiji smo ugotovili limfocitozo pri 50 % ozdravljenih mačk, od tega je imelo blago limfocitozo ($4-7,9 \times 10^9/L$; 8) 12/30 (40 %) mačk, zmerno limfocitozo ($8-15 \times 10^9/L$; 8) pa 3/30 (10 %) mačk. Predpostavlja se, da bi limfocitoza lahko bila posledica antigenske stimulacije ali vznemirjenja (31). Čeprav smo v naši raziskavi zaznali bistveno nižji odstotek mačk z limfocitozo po zdravljenju, je bila velika večina mačk (96 %) ozdravljenih in v dolgotrajni remisiji. Na podlagi tega lahko sklepamo, da limfocitoza ni edini prognostični dejavnik in da imajo tudi mačke, pri katerih ne pride do limfocitoze, lahko odlično prognozo. Zanimiva ugotovitev naše raziskave je tudi ta, da je bil porast koncentracije limfocitov pri mačkah z očesnimi znaki po terapiji manj izražen, kar lahko kaže na slabšo prognozo pri teh mačkah. Tudi Taylor in sod. (2023) so ugotovili, da je do recidivov največkrat prišlo pri mačkah z očesnimi znaki (21,7 %; 18).

Hematološki markerji vnetja pri mačkah s FIP-om do sedaj še niso bili preučevani, zato smo v naši raziskavi želeli ugotoviti uporabnost parametrov pri diagnostiki bolezni in spremljanju mačk med terapijo. Vrednosti NLR, TLR, LMR in SII so preprosto dostopne in se zlahka izračunajo iz koncentracije različnih krvnih celic iz celotne krvne slike in diferencialne bele krvne slike, ki jih rutinsko določamo pri pregledu živali. Hematološki markerji vnetja so se že izkazali kot prognostični in/ali diagnostični parametri pri nekaterih neoplastičnih in vnetnih boleznih pri mačkah (50, 56, 57, 97).

Ugotovili smo, da imajo mačke s FIP-om značilno višje vrednosti NLR, TLR in SII ter nižje vrednosti LMR v primerjavi z zdravimi mačkami. Po terapiji so se vrednosti parametrov uravnale s kontrolno skupino, z izjemo LMR, ki se je značilno povišal, kar je verjetno posledica izrazitega dviga koncentracije limfocitov. Izbrani parametri so se v naši raziskavi z uspešnim zdravljenjem normalizirali oziroma poenotili s skupino zdravih živali, kar kaže na možnost uporabe teh parametrov pri diagnosticiranju bolezni in spremljanju poteka zdravljenja.

Pomembna ugotovitev v naši raziskavi je bila tudi ta, da so imele mačke z mokro obliko FIP-a značilno višje vrednosti NLR in SII v primerjavi z mačkami s suho obliko, predvsem na račun

nižje koncentracije limfocitov pri mokri obliki. Za suho obliko velja, da ima bolj kroničen potek in tipično manj resno klinično prezentacijo, zato je koncentracija proteinov akutne faze vnetja večinoma nižja v primerjavi z mokro obliko (1, 30), kar se najverjetneje zrcali tudi v hematoloških markerjih vnetja.

Mediana vrednost NLR je bila pri zdravih mačkah 1,47, kar je podobno ugotovitvam Gori in sod. (2021), ki so pri 76 zdravih mačkah ugotovili mediano vrednost NLR 1,9 (58). Donato in sod. (2023) so ugotovili precej višje vrednosti hematoloških markerjev vnetja pri zdravih mačkah. Neskladja med našimi rezultati in rezultati Donata so lahko posledica razlik v velikosti vzorca, starosti vključenih mačk, metodologije (analizatorja) ali, najverjetneje, različnih diagnoz vključenih mačk. V raziskavi so namreč kot kontrolno skupino mačk brez vnetja uporabili živali brez sprememb v koncentraciji levkocitov, kar pa ne pomeni, da so bile to popolnoma zdrave mačke (59).

Opazili smo tudi, da so imele mačke z očesnimi znaki po terapiji značilno višje vrednosti TLR in SII. Mediana vrednost SII je bila po terapiji pri mačkah z očesnimi znaki $834,6 \times 10^9/L$, medtem ko je bila ta vrednost pri mačkah brez očesnih znakov $412,93 \times 10^9/L$ in se je tako poenotila s skupino zdravih mačk, pri katerih smo izračunali mediano vrednost SII $444,5 \times 10^9/L$. Ti rezultati nakazujejo, da je pri mačkah z očesnimi znaki po terapiji še vedno prisotno sistemsko vnetje, kar bi lahko bila posledica prenizkih odmerkov zdravila in posledično prenizke koncentracije učinkovine v očesni vodici ali slabše prehodnosti zdravila čez krvno-očesno bariero.

Pri ljudeh s COVID-19 opisujejo, da so vrednosti NLR, TLR in SII višje in vrednost LMR nižja pri bolnikih s hujšo klinično sliko in jih je mogoče uporabiti za napovedovanje prognoze (98). Tudi pri mačkah s FIP-om bi lahko ti parametri služili kot prognostični dejavniki, vendar zaradi premajhnega števila mačk z negativnim izidom v naši raziskavi statistično ovrednotenje ni bilo možno.

V okviru biokemijske preiskave krvi smo pri mačkah v času diagnoze ugotovili značilna odstopanja za FIP, kot so hiperproteinemija, hiperglobulinemija, hipoalbuminemija, nizko razmerje A/G in hiperbilirubinemija (4, 8, 18, 23, 45, 61, 82).

Hiperglobulinemija se po podatkih iz literature pojavi pri 89 % mačk s FIP-om (60). V naši raziskavi smo jo zaznali pri 19/29 (65,5 %) mačk. Po zdravljenju se je koncentracija globulinov znižala in vrnila v referenčne okvirje. Z elektroforezo serumskih beljakovin lahko ločimo globuline na več frakcij: alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 in gama globuline (70, 71). Za mačke s FIP-om je značilen zgodnji dvig v frakciji alfa-2 globulinov, ki jim sledi poliklonalni dvig gama globulinov (71). V naši raziskavi smo pri mačkah s FIP-om v skladu z literaturo potrdili dvig alfa-2 in gama globulinov, ki se je po zdravljenju normaliziralo. Pri ostalih frakcijah nismo opazili statistično značilnih sprememb.

Hiperglobulinemiji je lahko pridružena hipoalbuminemija in/ali hiperproteinemija (45, 60, 61), zaradi česar je razmerje A/G znižano (4, 61, 62). Razmerje A/G ima veliko diagnostično vrednost pri FIP-u (63). Pri 24/29 (82,8 %) mačk s FIP-om smo ugotovili razmerje A/G pod referenčnim območjem, s povprečno vrednostjo 0,433. S tem smo potrdili, da je razmerje A/G koristno diagnostično orodje, vendar le v kombinaciji s prisotnostjo kliničnih znakov in z drugimi diagnostičnimi testi. V naši raziskavi se je po terapiji razmerje A/G povišalo in doseglo povprečno vrednost 1,058.

Hiperproteinemijo smo v naši raziskavi zaznali pri 11/29 (37,9 %) mačk s FIP-om. Po zdravljenju se je koncentracija celokupnih beljakovin vrnila v meje referenčnih vrednosti.

Hiperbilirubinemija prevladuje predvsem pri mačkah z mokro obliko (45) in najverjetneje nastopi zaradi hemolize (4). V nekaterih raziskavah povezujejo naraščanje bilirubina z napredovanjem bolezni in opisujejo bilirubin kot možen negativni prognostični dejavnik (62, 64). V naši raziskavi smo hiperbilirubinemijo pred zdravljenjem ugotovili pri 15/25 (60 %) mačk. Po zdravljenju se je koncentracija bilirubina značilno znižala ($p < 0,001$) in je bila znotraj referenčnih vrednosti.

Glede na rezultate prejšnjih raziskav ima približno 30–40 % mačk s FIP-om povišano aktivnost ALT v času diagnoze, ki lahko traja do zaključka zdravljenja (61, 79, 93). V naši raziskavi smo ugotovili rahlo povišano aktivnost ALT pri le 3/35 (8 %) mačk s FIP-om. Najvišja vrednost, ki smo jo zaznali, je bila 178 U/L, kar je približno 50 % nad zgornjo referenčno mejo. Pri vseh treh mačkah so se vrednosti po zdravljenju normalizirale. Po zdravljenju smo ugotovili povišano aktivnost ALT pri štirih (11 %) mačkah. Vse štiri so imele pred zdravljenjem vrednosti ALT znotraj meja referenčnih vrednosti. Tri od njih so imele le manjša povišanja

(med 119 in 168 U/L, z referenčnim razponom od 27 do 110 U/L), medtem ko je četrta mačka pokazala 3-kratno povišanje nad zgornjo referenčno mejo. Pri tej mački je kasneje prišlo do recidiva, zaradi česar smo zdravljenje ponovili. Po zaključku zdravljenja je imela povišano aktivnost alkalne fosfataze (2-kratno povišanje) in aspartat-aminotransferaze (20 % nad zgornjo mejo referenčnega intervala), kar je trajalo vsaj 6 mesecev. Kljub temu je mačka po zaključku drugega ciklusa zdravljenja ostala asimptomatska in je eno leto kasneje še vedno v remisiji. V nekaterih raziskavah poročajo o manjših in reverzibilnih dvigih aktivnosti ALT pri bolnikih s COVID-19 po zdravljenju z remdesivirjem brez kakršnih koli drugih znakov poškodb jeter (65). Pri mačkah s FIP-om so v določenih študijah med zdravljenjem občasno opazili povišano aktivnost ALT (18, 31, 61), ki je bila izrazitejša pri zdravljenju z GS-441524 v primerjavi z monoterapijo z remdesivirjem (18). Natančen vzrok za morebitno hepatopatijo, povezano z dajanjem remdesivirja in GS-441524, še vedno ni popolnoma pojasnjen (61).

Številne študije v humani medicini so prišle do zaključkov, da je povišana aktivnost LDH slab prognostični dejavnik in znak višje mortalnosti pri ljudeh s COVID-19 (67, 68). Pri mačkah je prognostična vloga encima LDH opisana pri boleznih, kot je akutna ledvična poškodba in pri različnih malignih obolenjih (99, 100, 101). Aktivnost LDH v serumu mačk s FIP-om še ni bila preučevana, prav tako še ni dokazana njegova prognostična in/ali diagnostična vloga. V naši raziskavi mačke s FIP-om niso imele povišane povprečne aktivnosti LDH. Prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v aktivnosti LDH pred in po terapiji. Vendar pa je treba izpostaviti opažanje, da so tri mačke z negativnim izidom imele povišano aktivnost LDH pred zdravljenjem. Pri dveh, ki sta imeli recidiv, smo ugotovili približno 2-kratnik zgornje meje referenčnega intervala, pri mački z najhujšim kliničnim potekom, ki je nekaj dni po začetku zdravljenja poginila, pa približno 5-kratnik zgornje meje referenčnega intervala. Poleg tega smo pri mački pasme ragdoll, ki je imela recidiv, po prvem ciklu zdravljenja ugotovili še vedno rahlo povišano aktivnost LDH (222 U/L; 21–217 U/L), ki se je po drugem uspešnem ciklu zdravljenja normalizirala. Kljub tem ugotovitvam je bilo število mačk z negativnim izidom (recidivom ali poginom med terapijo) v naši študiji prenizko za statistično obdelavo, s katero bi lahko potrdili ali ovrgli možno vlogo LDH kot napovednega dejavnika izida bolezni pri mačkah s FIP-om. Menimo, da so zaradi opaženih razlik v aktivnosti LDH v času diagnoze med mačkami s pozitivnim in negativnim izidom bolezni potrebne nadaljnje raziskave tega encima kot možnega prognostičnega dejavnika pri mačkah s FIP-om.

Proteini akutne faze vnetja se v glavnem sintetizirajo v jetrih pod vplivom vnetnih citokinov kot del reakcije akutne faze, ki je zgodnja in nespecifična, a zelo kompleksna reakcija organizma na različne poškodbe (102). Pri mačkah, kjer je bila na voljo zadostna količina seruma, smo določili koncentracijo izbranih proteinov akutne faze vnetja in vnetnih citokinov pred in po terapiji.

Vpliv terapije z GS-441524 na koncentracijo haptoglobina do zdaj še ni bil raziskan, zato smo ga vključili v našo raziskavo. Zanimala nas je tudi vloga feritina, saj se je izkazal kot dober prognostični dejavnik pri ljudeh s COVID-19 (7, 41).

Haptoglobin je zmerno povišan protein akutne faze vnetja, za katerega je značilen počasen dvig koncentracije. Služi kot natančen napovedovalec kroničnih ali dlje časa potekajočih vnetnih bolezni (103). V naši raziskavi smo ugotovili, da je koncentracija haptoglobina značilno višja pri mačkah s FIP-om v primerjavi z zdravimi mačkami. Po terapiji se je njegova koncentracija značilno znižala in je bila primerljiva s kontrolno skupino. Normalizacija haptoglobina po zdravljenju je nova ugotovitev, ki nakazuje, da bi haptoglobin lahko služil kot parameter za spremljanje poteka zdravljenja, skupaj s prej opisanimi AGP in SAA, ki izražata podobno dinamiko (18, 23, 30).

Pri pregledu literature smo ugotovili, da je objavljenih malo študij, ki so ugotovljale koncentracijo feritina pri mačkah (39, 40, 104, 105). Ottenjann in sod. (2006) so ugotovili, da vnetna bolezen povzroči dvig koncentracije feritina pri 63,2 % mačk (40). Pri psih poročajo o hiperferitinemiji pri psih z malignimi in vnetnimi obolenji (106, 107, 108). Raziskave pri ljudeh s COVID-19 kažejo, da je feritin primeren prognostični pokazatelj stopnje bolezni in da so visoke serumske koncentracije feritina povezane s krajšim časom preživetja (41, 109, 110). Pri mačkah s FIP-om vloga feritina še ni bila raziskana. Glede na ugotovitve zgoraj omenjenih študij smo pričakovali povišano koncentracijo feritina pri mačkah s FIP-om, vendar naši rezultati niso pokazali značilnih razlik v koncentraciji feritina med skupinama mačk s FIP-om in zdravo kontrolo. Ugotovili smo tudi, da zdravljenje ne vpliva na koncentracijo feritina v krvi. Naši rezultati nakazujejo, da feritin pri mačkah s FIP-om verjetno nima pomembne vloge v reakciji akutne faze. Ta je specifična za vsako živalsko vrsto, zato je težko primerjati ugotovitve pri mačkah z ugotovitvami pri ljudeh in psih. Za zanesljive zaključke o vlogi feritina pri mačkah s FIP-om so potrebne dodatne raziskave na večjem vzorcu mačk.

Zanimiva ugotovitev naše raziskave je, da pri mačkah s FIP-om vnetna proteina haptoglobin in feritin značilno negativno korelirata s hematokritom. To pomeni, da sistemsko vnetje pri FIP-u povzroči tako povišanje vnetnih proteinov kot tudi anemijo. Do podobnih ugotovitev so prišli pri mačkah s kronično ledvično boleznijo (46, 111) in mačkah z gastrointestinalnim limfomom (112), kjer so ugotovili značilno negativno korelacijo med SAA in hematokritom.

Pri spremljanju koncentracije vnetnih citokinov med zdravljenjem FIP-a smo merili koncentracijo treh glavnih vnetnih citokinov pri mačkah, to so TNF- α , IL-6 in IL-1 β (113). Ti citokini sodijo tudi med najpomembnejše prognostične dejavnike pri COVID-19 (114). Safi in sod. (2017) so pri mačkah s koronavirusno okužbo preučevali omenjene citokine z uporabo različnih metod. Ugotovili so, da IL-1 β in IL-6 ni mogoče zaznati v serumu večine mačk s FIP-om, lahko pa se ju zazna v trebušnih izlivih, medtem ko so TNF- α detektirali tako v serumu kot v trebušnih izlivih (2).

TNF- α pomembno prispeva k vnetnemu odzivu ter ima pomembno vlogo v patogenezi FIP-a, saj povzroča limfopenijo (23, 47). Na podlagi tega smo pričakovali, da bo koncentracija tega citokina povišana pred terapijo, po terapiji pa se bo normalizirala. Rezultati naše raziskave so pokazali nasprotno, saj so se koncentracije TNF- α po zdravljenju značilno povišale. Naši rezultati so podobni rezultatom študij pri ljudeh s hudo obliko COVID-19, ki so bili zdravljeni s protivirusnimi zdravili, kot so favipiravir ali lopinavir/ritonavir (115). V njihovi raziskavi se koncentracija TNF- α v času diagnoze ni znatno razlikovala v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko se je po terapiji značilno povišala, zlasti pri bolnikih, ki so potrebovali intenzivno nego. Mortaz in sod. (2021) domnevajo, da so ti rezultati posledica nezmožnosti protivirusne terapije za zatiranje sistemskega vnetnega odziva, čeprav so s terapijo dosegli tako klinično izboljšanje kot izboljšanje drugih vnetnih parametrov, ki so povezani s COVID-19 (115).

Pri spremljanju koncentracije IL-1 β in IL-6 med zdravljenjem z GS-441524 smo v naši raziskavi ugotovili padec v njuni koncentraciji po zdravljenju, ki pa ni dosegel statistične značilnosti. Ugotovitve naše raziskave vsekakor odpirajo dodatna vprašanja glede učinka terapije na koncentracijo vnetnih citokinov in jih je zaradi majhnega števila vzorcev in metodologije treba interpretirati zelo previdno (ELISA).

Ugotovili smo tudi značilno pozitivno povezavo med TNF- α in NLR ter značilno negativno povezavo med TNF- α in LMR po zdravljenju. Kar pomeni, da se z naraščanjem koncentracije

TNF- α poviša tudi vrednost NLR, medtem ko se vrednost LMR zniža. Poleg tega smo ugotovili značilno pozitivno povezavo med koncentracijo IL-1 β in monocitov po terapiji.

Donato in sod. (2023) so v svoji raziskavi ugotovili značilno pozitivno povezavo med SAA ter vnetnima markerjema NLR in MLR pri mačkah z različnimi vnetnimi stanji (59). V naši raziskavi haptoglobin in feritin nista značilno korelirala z nobenim od hematoloških markerjev vnetja.

Naša študija ima nekaj pomanjkljivosti. Glavna omejitev je narava zdravljenja mačk s FIP-om, saj licenciran preparat, ki bi vseboval GS-441524, v Evropski uniji trenutno ne obstaja. Posledično ni mogoče ugotoviti natančne količine aktivne učinkovine, ki so jo mačke prejele. Obstajata dve nedavni raziskavi, ki sta ocenili kakovost širokega nabora izdelkov, ki naj bi vsebovali GS-441524. Vsi parenteralni izdelki, ki so jih preučili, so vsebovali učinkovino GS-441524 v oglaševanih oziroma celo višjih koncentracijah, medtem ko so peroralni izdelki kazali bolj spremenljive koncentracije (83, 84). Čeprav licenciran preparat GS-441524 trenutno ni na voljo v večini držav po svetu, visoka stopnja preživetja zdravljenih mačk v številnih raziskavah nakazuje, da mačke prejemajo omenjeno učinkovino. Druga omejitev je povezana z retrospektivno naravo študije, zaradi česar nismo imeli na voljo vseh izbranih parametrov za vsako zdravljeno mačko pred in po terapiji ter večjega števila vzorcev za določanje koncentracije citokinov in proteinov akutne faze vnetja.

6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov naše raziskovalne naloge smo prišli do sledečih sklepov:

- Pri mačkah s FIP-om smo ugotovili značilno višje vrednosti NLR, TLR, PLR in SII in značilno nižjo vrednost LMR v primerjavi z zdravimi mačkami.
- Pri mačkah s FIP-om smo ugotovili značilno višje koncentracije haptoglobina v primerjavi z zdravimi mačkami. Pri bolnih mačkah nismo ugotovili statistično značilnih razlik v koncentraciji feritina, IL-6, IL-1 β in TNF- α v primerjavi z zdravimi mačkami. Prav tako pri bolnih mačkah nismo ugotovili povišane aktivnosti LDH v primerjavi z zdravimi mačkami.
- Pri mačkah z mokro obliko FIP-a smo ugotovili bolj izrazit akutni vnetni odgovor, saj so imele značilno višje vrednosti NLR in SII v primerjavi z mačkami s suho obliko FIP-a. Primerjava hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja med mačkami glede na prisotnost očesnih znakov je pokazala statistično značilne razlike v koncentraciji limfocitov ter vrednostih TLR in SII po terapiji. Pri primerjavi hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja med mačkami glede na prisotnost nevroloških znakov nismo ugotovili statistično značilnih razlik.
- Dokazali smo, da je terapija z GS-441524 učinkovita pri zmanjšanju akutnega vnetnega odgovora, saj lahko z njo dosežemo normalizacijo hematoloških in biokemijskih parametrov. Ugotovili smo, da terapija značilno zniža koncentracijo haptoglobina in povzroči dvig koncentracije TNF- α . Nismo ugotovili značilnega padca v koncentraciji feritina, IL-6 in IL-1 β po terapiji.
- Pri mačkah s FIP-om smo pred zdravljenjem ugotovili značilno negativno povezavo med hematokritom in koncentracijo haptoglobina ter hematokritom in koncentracijo feritina. Po zdravljenju smo ugotovili značilne pozitivne povezave med hematokritom in koncentracijo haptoglobina, koncentracijo monocitov in IL-1 β , koncentracijo NLR in TNF- α ter značilne negativne povezave med koncentracijo trombocitov in haptoglobina ter koncentracijo LMR in TNF- α .
- Na podlagi naših meritev med zdravljenjem z GS-441524 pri mačkah s FIP-om menimo, da bi lahko izbrani hematološki markerji vnetja služili kot parametri za spremljanje učinka terapije.

- Zaradi opaženih razlik v aktivnosti LDH v času diagnoze med mačkami s pozitivnim in negativnim izidom bolezni so potrebne nadaljnje raziskave tega encima kot možnega prognostičnega dejavnika pri mačkah s FIP-om.
- Menimo, da so potrebne nadaljnje raziskave na večjem vzorcu mačk, ki bi merile koncentracijo hematoloških markerjev vnetja ter preučevale odziv citokinov in proteinov akutne faze vnetja med zdravljenjem FIP-a.

7 POVZETEK

Mačji infekcijski peritonitis (FIP) je pomembna infekcijska bolezen mačk, ki se razvije pri 10 % mačk, okuženih z mačjim koronavirusom (FCoV). Pojavlja se v dveh kliničnih oblikah, mokri in suhi. FIP je do nedavnega veljal za neozdravljivo bolezen s skoraj 100 % smrtnostjo, danes pa obstaja možnost učinkovitega zdravljenja bolezni s protivirusnimi zdravili, med katere sodi nukleozidni analog GS-441524 .

V naši raziskavi smo želeli določiti parametre, s katerimi bi lahko spremljali učinek nove terapije. Naši izbrani parametri raziskave so bili: razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov (NLR), limfocitov in monocitov (LMR), trombocitov in limfocitov (TLR), sistemski imunsko-vnetni indeks (SII), aktivnost encima laktat-dehidrogenaze (LDH), koncentracija treh glavnih mačjih proinflammatoryh citokinov (IL-6, IL-1 β in TNF- α) ter koncentracija proteinov akutne faze vnetja (haptoglobina in feritina). Želeli smo ugotoviti, ali si lahko z vrednostmi hematoloških markerjev vnetja NLR, TLR, LMR in SII ter koncentracijami citokinov, proteinov akutne faze vnetja in aktivnostjo LDH pred terapijo pomagamo pri postavitvi diagnoze FIP-a. Zanimala nas je tudi razlika v akutnem vnetnem odgovoru med mokro in suho obliko FIP-a in med mačkami glede na prisotnost očesnih in nevroloških kliničnih znakov.

V serumu mačk smo pred in po terapiji ovrednotili naslednje parametre: celotna krvna slika z diferencialno belo krvno sliko, izbrane biokemijske parametre (koncentracija serumske sečnine, kreatinina, celokupnih beljakovin in albumina, aktivnost ALT in LDH, elektroforeza serumskih beljakovin ter koncentracija bilirubina) in hematološke markerje vnetja (NLR, LMR, TLR in SII). S testom ELISA smo določili koncentracijo citokinov (TNF- α , IL-6 in IL-1 β) ter proteinov akutne faze vnetja (haptoglobina in feritina). Raziskava je bila zasnovana kot retrospektivna študija, v kateri smo uporabili klinične in laboratorijske podatke pacientov Klinike za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani ter ostanke vzorcev krvi, ki so bili odvzeti za potrebe diagnostike in klinični nadzor zdravljenja FIP-a med letoma 2020 in 2024. V raziskavo smo vključili vzorce in rezultate 35 lastniških mačk, 23 z mokro in 12 s suho obliko FIP-a. V času študije licencirano protivirusno zdravilo, ki vsebuje adenozijski nukleozidni analog GS-441524, ni bilo na voljo v Evropski uniji, zato je zdravljenje potekalo z nelicenciranim, komercialno dostopnim zdravilom, vsebujočim GS-441524, ki so ga pridobili lastniki sami. 32/35 mačk je prejelo zdravilo GS-441524 najmanj 12 tednov. Mačke smo

imeli za ozdravljene, če v 12-tedenski dobi opazovanja niso imele recidiva. Med zdravljenjem smo stanje mačk spremljali z mesečnimi kliničnimi pregledi in preiskavami krvi. V kontrolno skupino je bilo vključenih 28 zdravih mačk, ki so bile po starosti primerljive s skupino pacientov.

Z našo raziskovalno nalogo smo dokazali, da klinično uspešno zdravljenje FIP-a z GS-441524 pri mačkah povzroči pomembne spremembe pri večini izbranih klinično-patoloških parametrov. Pri bolnih mačkah smo ob diagnozi ugotovili že predhodno opisana hematološka in biokemijska odstopanja, značilna za FIP, kot so nevtrofilija z limfopenijo, anemija, hiperproteinemija, hiperglobulinemija, hipoalbuminemija, nizko razmerje A/G ter hiperbilirubinemija. Pri mačkah s FIP-om smo ugotovili značilno višje vrednosti NLR, TLR, PLR in SII in značilno nižje vrednosti LMR v primerjavi z zdravimi mačkami. Poleg tega smo ugotovili značilno višje koncentracije haptoglobina v primerjavi z zdravimi mačkami. Pri bolnih mačkah nismo ugotovili statistično značilnih razlik v koncentraciji feritina, IL-6, IL-1 β in TNF- α v primerjavi z zdravimi mačkami. Rezultati naše raziskave kažejo, da se haptoglobin normalizira z zdravljenjem FIP-a, in da se TNF- α po terapiji značilno poviša. V naši raziskavi mačke s FIP-om niso imele povišane povprečne vrednosti aktivnosti LDH, prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v aktivnosti LDH pred in po terapiji. Kljub temu pa so zaradi opaženih razlik v aktivnosti LDH v času diagnoze med mačkami s pozitivnim in negativnim izidom bolezni potrebne nadaljnje raziskave tega encima kot možnega prognostičnega dejavnika pri mačkah s FIP-om. Pri mačkah z mokro obliko smo ugotovili bolj izrazit akutni vnetni odgovor, saj so imele značilno višje vrednosti NLR in SII v primerjavi z mačkami s suho obliko FIP-a. Ugotovili smo statistično značilne razlike pri primerjavi hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja po terapiji glede na prisotnost očesnih znakov, medtem ko pri primerjavi hematoloških parametrov in hematoloških markerjev vnetja glede na prisotnost nevroloških znakov nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Pri mačkah s FIP-om smo pred zdravljenjem ugotovili značilno negativno povezavo med hematokritom in koncentracijo haptoglobina ter hematokritom in koncentracijo feritina. Po zdravljenju smo ugotovili statistično značilne pozitivne povezave med hematokritom in koncentracijo haptoglobina, koncentracijo monocitov in IL-1 β , koncentracijo NLR in TNF- α ter statistično značilne negativne povezave med koncentracijami trombocitov in haptoglobina ter med koncentracijami LMR in TNF- α .

Na podlagi naših rezultatov menimo, da bi lahko izbrani hematološki markerji vnetja služili kot preprosti, cenovno ugodni in hitro dostopni markerji za diagnostiko in spremljanje terapije FIP-a, kar bi lahko nadomestilo trenutno pogosteje uporabljene, vendar dražje in manj dostopne proteine akutne faze vnetja. Prvi smo dokazali, da hematološki markerji vnetja med zdravljenjem sledijo podobnemu vzorcu kot absolutne vrednosti parametrov hemograma in da se ti markerji značilno razlikujejo med mokro in suho obliko FIP-a kot tudi glede na prisotnost očesnih znakov. Menimo, da so potrebne nadaljnje raziskave na večjem vzorcu mačk, ki bi merile koncentracijo hematoloških markerjev vnetja in aktivnost LDH ter preučevale odziv citokinov in proteinov akutne faze vnetja med zdravljenjem FIP-a.

8 SUMMARY

Feline infectious peritonitis (FIP) is an important infectious disease of cats that develops in 10% of cats infected with the feline coronavirus (FCoV). It occurs in two clinical forms, wet and dry. Until recently, FIP was considered an incurable disease with a mortality rate of almost 100%, but today there is the possibility of effective treatment of the disease with antiviral drugs, including the nucleoside analogue GS-441524.

In our study, we wanted to determine the parameters that can be used to monitor the effect of the new therapy. Our selected research parameters were: neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte to monocyte ratio (LMR), platelet to lymphocyte ratio (PLR), systemic immune-inflammatory index (SII), lactate dehydrogenase (LDH), the concentration of the three main feline proinflammatory cytokines in cats, Interleukin-6 (IL-6), Interleukin (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF- α), and the concentration of acute phase proteins (haptoglobin and ferritin). We were interested in whether the values of the haemogram-derived inflammatory markers NLR, PLR, LMR and SII, as well as the concentrations of cytokines, acute-phase proteins and LDH activity before therapy could help to establish the diagnosis of FIP. We were also interested in the difference in the acute inflammatory response between the wet and dry form of FIP and between cats with and without ocular and neurological clinical signs.

The following parameters were analysed in the cats' serum before and after therapy: complete blood count with differential white blood cell count, selected biochemical parameters (serum urea and creatinine concentrations, total protein and albumin concentrations, ALT and LDH activity, serum protein electrophoresis and bilirubin concentration) and hemogram-derived inflammatory markers (NLR, LMR, TLR and SII). The ELISA test was used to determine the concentrations of cytokines and the concentrations of acute-phase proteins concentrations. The study was designed as a retrospective study in which we used the clinical and laboratory data of the patients of the Small Animal Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine and their remains of blood samples taken for the purpose of diagnosis and clinical control during the treatment of FIP between 2020 and 2024. We included samples and results from 35 client-owned cats, 23 with wet FIP and 12 with dry FIP. At the time of the study, a licensed antiviral drug containing the adenosine nucleoside analogue GS-441524 was not available in the European Union, so treatment was performed with an unlicensed, commercially available drug containing GS-441524 that was self-procured and crowd-sourced by the owners. 32/35 cats

received GS-441524 for at least 12 weeks. The cats were considered cured if they did not relapse during the 12-week observation period. During treatment, the cats' condition was monitored by monthly clinical examinations and blood tests. The control group consisted of 28 healthy cats, comparable in age to the patient group.

Our research has shown that clinically successful treatment of FIP with GS-441524 in cats leads to significant changes in most of the selected clinicopathological parameters. At the time of diagnosis, the previously described haematological and biochemical abnormalities characteristic of FIP were found in the diseased cats, such as neutrophilia with lymphopenia, anaemia, hyperproteinemia, hyperglobulinemia, hypoalbuminemia, low A/G ratio and hyperbilirubinaemia. We detected significantly higher values of NLR, TLR, PLR and SII and significantly lower values of LMR in cats with FIP compared to healthy cats. In addition, we found significantly higher concentrations of haptoglobin compared to healthy cats. We found no statistically significant differences in the concentration of ferritin, IL-6, IL-1 β and TNF- α in sick cats compared to healthy cats. The results of our study show that haptoglobin is normalised by treatment of FIP and that TNF- α is significantly increased after therapy. In our study, cats with FIP did not have elevated mean levels of LDH activity, nor did we find significant differences in LDH activity before and after therapy. Nevertheless, the observed differences in LDH activity at the time of diagnosis between cats with a positive and negative disease outcome warrant further investigation of this enzyme as a possible prognostic factor in cats with FIP. We found a more pronounced acute inflammatory response in cats with the wet form, as they had significantly higher values of NLR and SII compared to cats with the dry form of FIP. We found statistically significant differences when comparing haematological parameters and hemogram-derived inflammatory markers after therapy between cats with and without ocular signs, while we found no statistically significant differences when comparing haematological parameters and haemogram-derived inflammatory markers between cats with and without neurological signs. In cats with FIP, we found a characteristic negative correlation between haematocrit and haptoglobin concentration as well as haematocrit and ferritin concentration before treatment. After treatment, we found statistically significant positive correlations between haematocrit and haptoglobin concentration, monocytes and IL-1 β concentration, NLR and TNF- α concentration and statistically significant negative correlations between platelet and haptoglobin concentrations and between LMR and TNF- α concentrations.

9 ZAHVALE

Na začetku in kot najpomembneje se zahvaljujema mentorici doc. dr. Darji Pavlin za priložnost, odlično vodstvo ter predvsem za ves vloženi čas in trud pri izvedbi in pisanju raziskovalne naloge. Zelo sva hvaležni za izkazano zaupanje ter vse nasvete in znanje, ki so ključno pripomogli pri izdelavi te naloge ter nama bodo v pomoč tudi na najini nadaljnji poti.

Iskrena hvala tudi prof. dr. Alenki Nemeč Svete za vso pomoč pri laboratorijskem delu ter statistični obdelavi podatkov, za koristne nasvete in odzivnost. Zahvaljujema se ji tudi za natančen pregled naloge in napotke, kako jo izboljšati. Hvala tudi Aleksandru Jenku in Nuši Štrajhar za tehnično pomoč pri delu v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za male živali.

Posebna zahvala tudi asist. dr. Saši Koprivec za prijaznost, vodenje in strokovnost pri izvajanju testov ELISA. Zahvala tudi Katarini Babnik in Boštjanu Drolcu za pomoč pri delu v laboratoriju Inštituta za predklinične vede.

Hvala tudi asist. dr. Martini Krofič Žel za delitev podatkov, ki so nam pomagali pri oblikovanju kontrolne skupine in vsem zaposlenim na Kliniki za male živali, ki so sodelovali pri zbiranju in shranjevanju vzorcev in s tem prispevali k uresničitvi te raziskovalne naloge.

Zahvaljujema se tudi osebju knjižnice Veterinarske fakultete za pregled literature. Hvala dr. Mateji Gaber za lektoriranje.

Nazadnje se druga drugi zahvaljujema za sodelovanje in pomoč pri delu, ki je bilo na trenutke zahtevno, vendar tudi zelo zabavno.

Hvala vsem mačkam in njihovim lastnikom, ki so sodelovali v raziskavi.

Še enkrat se iz srca zahvaljujema vsem za pomoč, saj nama brez vas ne bi uspelo.

10 LITERATURA

1 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.

doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.008

2 Safi N, Haghani A, Ng SW, Selvarajah GT, Mustaffa-Kamal F, Omar AR. Expression profiles of immune mediators in feline Coronavirus-infected cells and clinical samples of feline Coronavirus-positive cats. *BMC Vet Res* 2017; 13(1): 92.

doi: 10.1186/s12917-017-1019-2

3 Addie DD, Curran S, Bellini F, et al. Oral Mutian®X stopped faecal feline coronavirus shedding by naturally infected cats. *Res Vet Sci* 2020; 130: 222–9.

doi: 10.1016/j.rvsc.2020.02.012

4 Tasker S, Addie DD, Egberink H, et al. Feline infectious peritonitis: European Advisory Board on Cat diseases guidelines. *Viruses* 2023; 15(9): 1847.

doi: 10.3390/v15091847

5 Pedersen NC, Perron M, Bannasch M, et al. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2019; 21(4): 271–81.

doi: 10.1177/1098612X19825701

6 Jones S, Novicoff W, Nadeau J, Evans S. Unlicensed GS-441524-like antiviral therapy can be effective for at-home treatment of feline infectious peritonitis. *Animals (Basel)* 2021; 11(8): 2257.

doi: 10.3390/ani11082257

7 Gallo Marin B, Aghagoli G, Lavine K, et al. Predictors of COVID-19 severity: a literature review. *Rev Med Virol* 2021; 31(1): 1–10.

doi: 10.1002/rmv.2146

8 Zwicklbauer K, Krentz D, Bergmann M, et al. Long-term follow-up of cats in complete remission after treatment of feline infectious peritonitis with oral GS-441524. *J Feline Med Surg* 2023; 25(8): 1098612X231183250.

doi: 10.1177/1098612X231183250

9 Jaimes JA, Millet JK, Stout AE, André NM, Whittaker GR. A tale of two viruses: the distinct spike glycoproteins of feline coronaviruses. *Viruses* 2020; 12(1): 83.

doi: 10.3390/v12010083

10 Pedersen NC, Sykes JE. Feline coronavirus infections. In: Sykes JE, ed. *Greene's Infectious diseases of the dog and cat*. 5th ed. St. Louis: Elsevier, 2023: 360–76.

11 Hostnik P. *Izbrana poglavja iz veterinarske virologije*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2008.

12 Thayer V, Gogolski S, Felten S, Hartmann K, Kennedy M, Olah GA. 2022 AAFP/EveryCat feline infectious peritonitis diagnosis guidelines. *J Feline Med Surg* 2022; 24(9): 905–33.

doi: 10.1177/1098612X221118761

13 Silva CS, Mullis LB, Pereira O Jr, et al. Human respiratory coronaviruses detected in patients with influenza-like illness in Arkansas, USA. *Virol Mycol* 2014; 2014(suppl. 2): 004.

doi: 10.4172/2161-0517.S2-004

14 Gao YY, Wang Q, Liang XY, et al. An updated review of feline coronavirus: mind the two biotypes. *Virus Res* 2023; 326: 199059.

doi: 10.1016/j.virusres.2023.199059

15 Healey EA, Andre NM, Miller AD, Whittaker GR, Berliner EA. Outbreak of feline infectious peritonitis (FIP) in shelter-housed cats: molecular analysis of the feline coronavirus S1/S2 cleavage site consistent with a 'circulating virulent-avirulent theory' of FIP pathogenesis. *JFMS Open Rep* 2022; 8(1): 20551169221074226.

doi: 10.1177/20551169221074226

16 Pesteanu-Somogyi LD, Radzai C, Pressler BM. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *J Feline Med Surg* 2006; 8(1): 1–5.

doi: 10.1016/j.jfms.2005.04.003

17 Rohrbach BW, Legendre AM, Baldwin CA, Lein DH, Reed WM, Wilson RB. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218(7): 1111–5.

doi: 10.2460/javma.2001.218.1111

18 Taylor SS, Coggins S, Barker EN, et al. Retrospective study and outcome of 307 cats with feline infectious peritonitis treated with legally sourced veterinary compounded preparations of remdesivir and GS-441524 (2020-2022). *J Feline Med Surg* 2023; 25(9): 1098612X231194460.

doi: 10.1177/1098612X231194460

19 Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J* 2014; 201(2): 133–41.

doi: 10.1016/j.tvjl.2014.04.016

20 Sherding RG. Feline infectious peritonitis (Feline coronavirus). In: Birchard, eds. *Saunders manual of small animal practice*. 3th ed. St. Louis: Elsevier, 2006: 132–43.

doi: 10.1016/B0-72-160422-6/50012-7

21 Paltrinieri S, Ponti W, Comazzi S, Giordano A, Poli G. Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96(3/4): 141–8.

doi: 10.1016/s0165-2427(03)00156-9

22 Dunham SP. Cytokines and anti-cytokine therapy: clinical potential for treatment of feline disease. *J Feline Med Surg* 1999; 1(1): 7–14.

doi: 10.1016/s1098-612x(99)90004-9

23 Addie DD, Silveira C, Aston C, et al. Alpha-1 acid glycoprotein reduction differentiated recovery from remission in a small cohort of cats treated for feline infectious peritonitis.

Viruses 2022; 14(4): 744.

doi: 10.3390/v14040744

24 Malbon AJ, Fonfara S, Meli ML, Hahn S, Egberink H, Kipar A. Feline infectious peritonitis as a systemic inflammatory disease: contribution of liver and heart to the pathogenesis.

Viruses 2019; 11(12): 1144.

doi: 10.3390/v11121144

25 Rossi G. Acute phase proteins in cats: diagnostic and prognostic role, future directions, and analytical challenges. *Vet Clin Pathol* 2023; 52(suppl. 1): 37–49.

doi: 10.1111/vcp.13238

26 Cho WC, Yip TT, Cheng WW, Au JS. Serum amyloid A is elevated in the serum of lung cancer patients with poor prognosis. *Br J Cancer* 2010; 102(12): 1731–5.

doi: 10.1038/sj.bjc.6605700

27 Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(suppl. 1): S78–82.

doi: 10.1681/asn.2004110961

28 Kimura M, Tomita Y, Imai T, et al. Significance of serum amyloid A on the prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92(8): 2072–5.

doi: 10.1002/1097-0142(20011015)92:8<2072::aid-cnrc1547>3.0.co;2-p

29 Tamamoto T, Ohno K, Takahashi M, Nakashima K, Fujino Y, Tsujimoto H. Serum amyloid A as a prognostic marker in cats with various diseases. *J Vet Diagn Invest* 2013; 25(3): 428–32.

doi: 10.1177/1040638713486112

30 Katayama M, Uemura Y. Prognostic prediction for therapeutic effects of mutian on 324 client-owned cats with feline infectious peritonitis based on clinical laboratory indicators and physical signs. *Vet Sci* 2023; 10(2): 136.

doi: 10.3390/vetsci10020136

31 Krentz D, Zenger K, Alberer M, et al. Curing cats with feline infectious peritonitis with an oral multi-component drug containing GS-441524. *Viruses* 2021; 13(11): 2228.

doi: 10.3390/v13112228

32 Hazuchova K, Held S, Neiger R. Usefulness of acute phase proteins in differentiating between feline infectious peritonitis and other diseases in cats with body cavity effusions. *J Feline Med Surg* 2017; 19(8): 809–16.

doi: 10.1177/1098612X16658925

33 Giori L, Giordano A, Giudice C, Grieco V, Paltrinieri S. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *J Small Anim Pract* 2011; 52(3): 152–7.

doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01042.x

34 Gouffaux M, Pastoret PP, Henroteaux M, Massip A. Feline infectious peritonitis. Proteins of plasma and ascitic fluid. *Vet Pathol* 1975; 12(5/6): 335–48.

doi: 10.1177/0300985875012005-00601

35 Duthie S, Eckersall PD, Addie DD, Lawrence CE, Jarrett O. Value of alpha 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Rec* 1997; 141(12): 299–303.

doi: 10.1136/vr.141.12.299

36 Vilhena H, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, Vieira L, Pastor J, Silvestre-Ferreira AC. Acute phase proteins response in cats naturally infected with *Hepatozoon felis* and *Babesia vogeli*. *Vet Clin Pathol* 2017; 46(1): 72–6.

doi: 10.1111/vcp.12451

37 Vilhena H, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, et al. Acute phase proteins response in cats naturally infected by hemotropic mycoplasmas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2018; 56: 1–5.

doi: 10.1016/j.cimid.2017.11.001

38 Polkowska I, Gołyńska M, Sobczyńska-Rak A, et al. Haptoglobin as a treatment monitoring factor in feline plasmacytic gingivostomatitis. *Pol J Vet Sci* 2018; 21(1): 167–74.

doi: 10.24425/119035

39 Andrews GA, Chavey PS, Smith JE. Enzyme-linked immunosorbent assay to measure serum ferritin and the relationship between serum ferritin and nonheme iron stores in cats. *Vet Pathol* 1994; 31(6): 674–8.

doi: 10.1177/030098589403100607

40 Ottenjann M, Weingart C, Arndt G, Kohn B. Characterization of the anemia of inflammatory disease in cats with abscesses, pyothorax, or fat necrosis. *J Vet Intern Med* 2006; 20(5): 1143–50.

doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[1143:cotaoi]2.0.co;2

41 Para O, Caruso L, Pestelli G et al. Ferritin as prognostic marker in COVID-19: the FerVid study. *Postgrad Med* 2022; 134(1): 58–63.

doi: 10.1080/00325481.2021.1990091

42 Komariah N, Salbiah S, Nugroho BAA, Suliati S, Widiantari AD, Murtiani F. Ferritin level as independent predictor of Covid-19: a cross sectional study. *J Prof Medika* 2022; 16(1): 55–9.

doi: 10.33533/jpm.v16i1.4183

43 Moyadee W, Tassanee J, Sittiruk R, Chaiwat B, Jatuporn R. Characteristic clinical signs and blood parameters in cats with feline infectious peritonitis. *Agr Nat Resour* 2019; 53(4) 433–8.

44 Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990–2002). *Aust Vet J* 2005; 83(11): 666–73.

doi: 10.1111/j.1751-0813.2005.tb13044.x

45 Riemer F, Kuehner KA, Ritz S, Sauter-Louis C, Hartmann K. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis--a retrospective study of 231 confirmed cases (2000-2010). *J Feline Med Surg* 2016; 18(4): 348–56.

doi: 10.1177/1098612X15586209

46 Javard R, Grimes C, Bau-Gaudreault L, Dunn M. Acute-phase proteins and iron status in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2017; 31(2): 457–64.

doi: 10.1111/jvim.14661

47 Takano T, Hohdatsu T, Hashida Y, Kaneko Y, Tanabe M, Koyama H. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2007; 119(2/4): 121–31.

doi: 10.1016/j.vetmic.2006.08.033

48 Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Feline infectious peritonitis: a review of clinicopathological changes in 65 cases, and a critical assessment of their diagnostic value. *Vet Rec* 1991; 129(10): 209–12.

doi: 10.1136/vr.129.10.209

49 Takano T, Azuma N, Satoh M, et al. Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Arch Virol* 2009; 154(5): 775–81.

doi: 10.1007/s00705-009-0371-3

50 Petrucci GN, Lobo L, Queiroga F, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic marker for feline mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol* 2021; 19(3): 482–91.

doi: 10.1111/vco.12686

51 Rejec A, Butinar J, Gawor J, Petelin M. Evaluation of complete blood count indices (NLR, PLR, MPV/PLT, and PLCRi) in healthy dogs, dogs with periodontitis, and dogs with oropharyngeal tumors as potential biomarkers of systemic inflammatory response. *J Vet Dent* 2017; 34(4): 231–40.
doi: 10.1177/0898756417731775

52 Skor O, Fuchs-Baumgartinger A, Tichy A, Kleiter M, Schwendenwein I. Pretreatment leukocyte ratios and concentrations as predictors of outcome in dogs with cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2017; 15(4): 1333–45.
doi: 10.1111/vco.12274

53 Hodgson N, Llewellyn EA, Schaeffer DJ. Utility and prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in dogs with septic peritonitis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2018; 54(6): 351–9.
doi: 10.5326/JAAHA-MS-6808

54 Pierini A, Gori E, Lippi I, Ceccherini G, Lubas G, Marchetti V. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, nucleated red blood cells and erythrocyte abnormalities in canine systemic inflammatory response syndrome. *Res Vet Sci* 2019; 126: 150–4.
doi: 10.1016/j.rvsc.2019.08.028

55 Fries RC, Kadotani S, Stack JP, Kruckman L, Wallace G. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Front Vet Sci* 2022; 9: 813524.
doi: 10.3389/fvets.2022.813524

56 Chiti LE, Martano M, Ferrari R, et al. Evaluation of leukocyte counts and neutrophil-to-lymphocyte ratio as predictors of local recurrence of feline injection site sarcoma after curative intent surgery. *Vet Comp Oncol* 2020; 18(1): 105–16.
doi: 10.1111/vco.12534

57 Neumann S. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in dogs and cats with acute pancreatitis. *Vet Clin Pathol* 2021; 50(1): 45–51.

doi: 10.1111/vcp.12979

58 Gori E, Pierini A, Lippi I, Lubas G, Marchetti V. Leukocytes ratios in feline systemic inflammatory response syndrome and sepsis: a retrospective analysis of 209 cases. *Animals (Basel)* 2021; 11(6): 1644.

doi: 10.3390/ani11061644

59 Donato G, Pennisi MG, Persichetti MF, Archer J, Masucci M. A retrospective comparative evaluation of selected blood cell ratios, acute phase proteins, and leukocyte changes suggestive of inflammation in cats. *Animals (Basel)* 2023; 13(16): 2579.

doi: 10.3390/ani13162579

60 Felten S, Hartmann K. Diagnosis of feline infectious peritonitis: a review of the current literature. *Viruses* 2019; 11(11): 1068.

doi: 10.3390/v11111068

61 Green J, Syme H, Tayler S. Thirty-two cats with effusive or non-effusive feline infectious peritonitis treated with a combination of remdesivir and GS-441524. *J Vet Intern Med* 2023; 37(5): 1784–93.

doi: 10.1111/jvim.16804

62 Tsai HY, Chueh LL, Lin CN, Su BL. Clinicopathological findings and disease staging of feline infectious peritonitis: 51 cases from 2003 to 2009 in Taiwan. *J Feline Med Surg* 2011; 13(2): 74–80.

doi: 10.1016/j.jfms.2010.09.014

63 Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, et al. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2003; 17(6): 781–90.

doi: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02515.x

64 Katayama M, Uemura Y. Therapeutic effects of Mutian® Xraphconn on 141 client-owned cats with feline infectious peritonitis predicted by total bilirubin levels. *Vet Sci* 2021; 8(12): 328.

doi: 10.3390/vetsci8120328

65 Zampino R, Mele F, Florio LL, et al. Liver injury in remdesivir-treated COVID-19 patients. *Hepato Int* 2020; 14(5): 881–3.

doi: 10.1007/s12072-020-10077-3

66 Farhana A, Lappin SL. Biochemistry, lactate dehydrogenase. In: Aboubakr S, eds. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/> (20. 4. 2024)

67 Fialek B, Pruc M, Smereka J, et al. Diagnostic value of lactate dehydrogenase in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Cardiol J* 2022; 29(5): 751–8.

doi: 10.5603/CJ.a2022.0056

68 Huang Y, Guo L, Chen J, et al. Serum lactate dehydrogenase level as a prognostic factor for COVID-19: a retrospective study based on a large sample size. *Front Med (Lausanne)* 2022; 8: 671667.

doi: 10.3389/fmed.2021.671667

69 Romanelli P, Paltrinieri S, Bonfanti U, Castaman MG, Monza E, Bertazzolo W. Utility of the ratio between lactate dehydrogenase (LDH) activity and total nucleated cell counts in effusions (LDH/TNCC Ratio) for the diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP). *Animals (Basel)* 2022; 12(17): 2262.

doi: 10.3390/ani12172262

70 Stranieri A, Giordano A, Bo S, Braghiroli C, Paltrinieri S. Frequency of electrophoretic changes consistent with feline infectious peritonitis in two different time periods (2004–2009 vs 2013–2014). *J Feline Med Surg* 2017; 19(8): 880–7.

doi: 10.1177/1098612X16664389

71 Taylor SS, Tappin SW, Dodkin SJ, Papasouliotis K, Casamian-Sorrosal D, Tasker S. Serum protein electrophoresis in 155 cats. *J Feline Med Surg* 2010; 12(8): 643–53.

doi: 10.1016/j.jfms.2010.03.018

72 Holst BS, Englund L, Palacios S, Renström L, Berndtsson LT. Prevalence of antibodies against feline coronavirus and *Chlamydomphila felis* in Swedish cats. *J Feline Med Surg* 2006; 8(3): 207–11.

doi: 10.1016/j.jfms.2005.12.004

73 El-Tholoth M, Hussein M, Mohammed D, et al. Serological investigation on the presence of feline coronavirus (FCoV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in domestic cats living with COVID-19 positive owners in the UAE, 2022. *Animals (Basel)* 2023; 13(3): 493.

doi: 10.3390/ani13030493

74 Kummrow M, Meli ML, Haessig M, et al. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(10): 1209–15.

doi: 10.1128/CDLI.12.10.1209-1215.2005

75 Pardo J, Shukla AM, Chamarthi G, Gupte A. The journey of remdesivir: from Ebola to COVID-19. *Drugs Context* 2020; 9: 2020–4–14.

doi: 10.7573/dic.2020-4-14

76 Cosaro E, Pires J, Castillo D, Murphy BG, Reagan KL. Efficacy of oral remdesivir compared to GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring effusive feline infectious peritonitis: a blinded, non-inferiority study. *Viruses* 2023; 15(8): 1680.

doi: 10.3390/v15081680

77 Murphy BG, Perron M, Murakami E, et al. The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies. *Vet Microbiol* 2018; 219: 226–33.

doi: 10.1016/j.vetmic.2018.04.026

78 Dickinson PJ, Bannasch M, Thomasy SM, et al. Antiviral treatment using the adenosine nucleoside analogue GS-441524 in cats with clinically diagnosed neurological feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2020; 34(4): 1587–93.

doi: 10.1111/jvim.15780

79 Coggins SJ, Norris JM, Malik R, et al. Outcomes of treatment of cats with or without transition to orally administered GS-441524. *J Vet Intern Med* 2023; 37(5): 1772–83.

doi: 10.1111/jvim.16803

80 Pedersen NC, Kim Y, Liu H, et al. Efficacy of a 3C-like protease inhibitor in treating various forms of acquired feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2018; 20(4): 378–92.

doi: 10.1177/1098612X17729626

81 Addie DD, Covell-Ritchie J, Jarrett O, Fosbery M. Rapid resolution of non-effusive feline infectious peritonitis uveitis with an oral adenosine nucleoside analogue and feline interferon omega. *Viruses* 2020; 12(11): 1216.

doi: 10.3390/v12111216

82 Yin Y, Li T, Wang C, et al. A retrospective study of clinical and laboratory features and treatment on cats highly suspected of feline infectious peritonitis in Wuhan, China. *Sci Rep* 2021; 11(1): 5208.

doi: 10.1038/s41598-021-84754-0

83 Kent AM, Guan S, Jacque N, Novicoff W, Evans SJM. Unlicensed antiviral products used for the at-home treatment of feline infectious peritonitis contain GS-441524 at significantly different amounts than advertised. *J Am Vet Med Assoc* 2024; 262(4): 489–97.

doi: 10.2460/javma.23.08.0466

84 Mulligan AJ, Browning ME. Quality assessment and characterization of unregulated antiviral drugs for feline infectious peritonitis: implications for treatment, safety, and efficacy. *Am J Vet Res* 2024; 85(3): 1–9.

doi: 10.2460/ajvr.23.10.0221

85 Painter WP, Holman W, Bush JA, et al. Human safety, tolerability, and pharmacokinetics of molnupiravir, a novel broad-spectrum oral antiviral agent with activity against SARS-CoV-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2021; 65(5): e02428–20.

doi: 10.1128/AAC.02428-20

86 Tian L, Pang Z, Li M, et al. Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19. *Front Immunol* 2022; 13: 855496.

doi: 10.3389/fimmu.2022.855496

87 Roy M, Jacque N, Novicoff W, Li E, Negash R, Evans SJM. Unlicensed molnupiravir is an effective rescue treatment following failure of unlicensed GS-441524-like therapy for cats with suspected feline infectious peritonitis. *Pathogens* 2022; 11(10): 1209.

doi: 10.3390/pathogens11101209

88 Kim Y, Mandadapu SR, Groutas WC, Chang KO. Potent inhibition of feline coronaviruses with peptidyl compounds targeting coronavirus 3C-like protease. *Antiviral Res* 2013; 97(2): 161–8.

doi: 10.1016/j.antiviral.2012.11.005

89 Jiao Z, Yan Y, Chen Y, et al. Adaptive mutation in the main protease cleavage site of feline coronavirus renders the virus more resistant to main protease inhibitors. *J Virol* 2022; 96(17): e0090722.

doi: 10.1128/jvi.00907-22

90 Perera KD, Rathnayake AD, Liu H, et al. Characterization of amino acid substitutions in feline coronavirus 3C-like protease from a cat with feline infectious peritonitis treated with a protease inhibitor. *Vet Microbiol* 2019; 237: 108398.

doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108398

91 Zakon o zaščiti živali. Ur List RS 2013; 23(38): 4455 (3. 5. 2013)

92 Hu T, Zhang H, Zhang X, Hong X, Zhang T. Prevalence and risk factors associated with feline infectious peritonitis (FIP) in mainland China between 2008 and 2023: a systematic review and meta-analysis. *Animals (Basel)* 2024; 14(8): 1220.

doi: 10.3390/ani14081220

93 Krentz D, Zwicklbauer K, Felten S, et al. Clinical follow-up and postmortem findings in a cat that was cured of feline infectious peritonitis with an oral antiviral drug containing GS-441524. *Viruses* 2022; 14(9): 2040.

doi: 10.3390/v14092040

94 Maquet J, Lafaurie M, Sommet A, Moulis G. Thrombocytopenia is independently associated with poor outcome in patients hospitalized for COVID-19. *Br J Haematol* 2020; 190(5): e276–e279.

doi: 10.1111/bjh.16950

95 Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; 382(18): 1708–20.

doi: 10.1056/NEJMoa2002032

96 Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J Virol* 1996; 70(12): 8977–83.

doi: 10.1128/JVI.70.12.8977-8983.1996

97 Tagawa M, Shimbo G, Miyahara K. Prognostic role of lymphocyte to monocyte ratio in feline high-grade lymphomas. *Can Vet J* 2021; 62(10): 1095–103.

98 Kosidło JW, Wolszczak-Biedrzycka B, Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Dorf J. Clinical significance and diagnostic utility of NLR, LMR, PLR and SII in the course of COVID-19: a literature review. *J Inflamm Res* 2023; 16: 539–62.

doi: 10.2147/JIR.S395331

99 Terragni R, Morselli-Labate AM, Vignoli M, Bottero E, Brunetti B, Saunders JH. Is serum total LDH evaluation able to differentiate between alimentary lymphoma and inflammatory bowel disease in a real world clinical setting? *PLoS One* 2016; 11(3): e0151641.

doi: 10.1371/journal.pone.0151641

100 Lee YJ, Chan JP, Hsu WL, Lin KW, Chang CC. Prognostic factors and a prognostic index for cats with acute kidney injury. *J Vet Intern Med* 2012; 26(3): 500–5.

doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00920.x

101 Naito E, Shimada R, Yuki M. Diagnostic utility of measuring lactate dehydrogenase levels and its isoenzyme activities for the evaluation of malignancy in feline pleural effusion and ascitic fluid. *Open Vet J* 2022; 12(5): 735–43.

doi: 10.5455/OVJ.2022.v12.i5.19

102 Kann RK, Seddon JM, Henning J, Meers J. Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Res Vet Sci* 2012; 93(2): 649–54.

doi: 10.1016/j.rvsc.2011.11.007

103 Love EK, Leibman NF, Ringold R, Lamb K. Serum haptoglobin concentrations in feline inflammatory bowel disease and small-cell alimentary lymphoma: a potential biomarker for feline chronic enteropathies. *J Feline Med Surg* 2021; 23(10): 959–64.

doi: 10.1177/1098612X21991448

104 Betting A, Schweighauser A, Francey T. Diagnostic value of reticulocyte indices for the assessment of the iron status of cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2022; 36(2): 619–28.

doi: 10.1111/jvim.16367

105 Hunt A, Jugan MC. Anemia, iron deficiency, and cobalamin deficiency in cats with chronic gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med* 2021; 35(1): 172–8.

doi: 10.1111/jvim.15962

106 Kazmierski KJ, Ogilvie GK, Fettman MJ, et al. Serum zinc, chromium, and iron concentrations in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *J Vet Intern Med* 2001; 15(6): 585–8.

doi: 10.1892/0891-6640(2001)015<0585:szcaic>2.3.co;2

107 Friedrichs KR, Thomas C, Plier M, Andrews GA, Chavey PS, Young KM. Evaluation of serum ferritin as a tumor marker for canine histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med* 2010; 24(4): 904–11.

doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0543.x

108 Ceron JJ, Pardo-Marin L, Wdowiak A, et al. Divergences between serum C-reactive protein and ferritin concentrations in canine pyometra. *BMC Vet Res* 2023; 19(1): 78.

doi: 10.1186/s12917-023-03630-3.

109 Ahmed S, Ansar Ahmed Z, Siddiqui I, Haroon Rashid N, Mansoor M, Jafri L. Evaluation of serum ferritin for prediction of severity and mortality in COVID-19- A cross sectional study. *Ann Med Surg (Lond)* 2021; 63: 102163.

doi: 10.1016/j.amsu.2021.02.009

110 Qeadan F, Tingey B, Gu LY, Packard AH, Erdei E, Saeed AI. Prognostic values of serum ferritin and D-dimer trajectory in patients with COVID-19. *Viruses* 2021; 13(3): 419.

doi: 10.3390/v13030419

111 Uva A, Cavalera MA, Gusatoia O, et al. Inflammatory status and chronic kidney disease in cats: old and new inflammatory markers-a pilot prospective study. *Animals (Basel)* 2023; 13(23): 3674.

doi: 10.3390/ani13233674

112 Akiyoshi M, Hisasue M, Neo S, Akiyoshi M. Serum amyloid A (SAA) concentration in cats with gastrointestinal lymphoma. *J Vet Med Sci* 2023; 85(8): 867–75.

doi: 10.1292/jvms.23-0043

113 Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 2010; 185(1): 23–7.

doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.009

114 Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* 2020; 26(10): 1636–43.

doi: 10.1038/s41591-020-1051-9

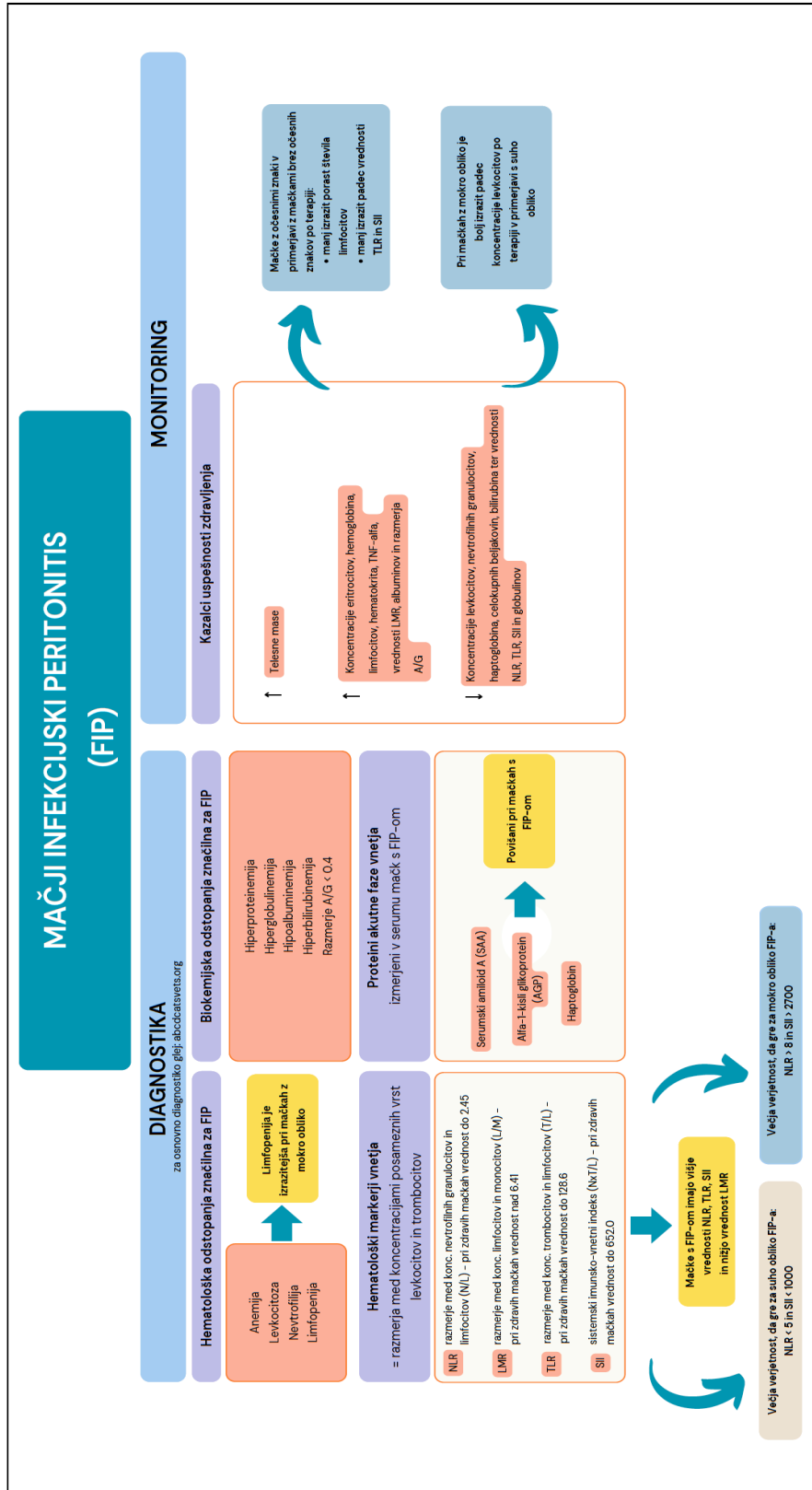
115 Mortaz E, Bassir A, Dalil Roofchayee N, et al. Serum cytokine levels of COVID-19 patients after 7 days of treatment with Favipiravir or Kaletra. *Int Immunopharmacol* 2021; 93: 107407.

doi: 10.1016/j.intimp.2021.107407

11 PRILOGE

Priloga 1: Algoritem za diagnostiko in monitoring FIP-a

Supplement 1: Algorithm for diagnostics and monitoring of FIP



Priloga 2: Darja Pavlin, Alenka Nemeč Svete, Lina Tršar, Marjeta Štrljč, Nataša Tozon, Comparison of selected hematology markers in cats with FIP before and after therapy. Prispevek sprejet za predstavitev na simpoziju ISCAID (International Society for Companion Animal Infectious Diseases), Glasgow, 4.-7.9.2022.

Supplement 2: Darja Pavlin, Alenka Nemeč Svete, Lina Tršar, Marjeta Štrljč, Nataša Tozon, Comparison of selected hematology markers in cats with FIP before and after therapy. Abstract accepted for presentation on the ISCAID symposium (International Society for Companion Animal Infectious Diseases), Glasgow, 4.-7.9.2022.

Comparison of selected hematology markers in cats with FIP before and after therapy

Darja Pavlin, Alenka Nemeč Svete, Lina Tršar, Marjeta Štrljč, Nataša Tozon

Background

Prognostic factors in COVID-19 include hematology markers like ratios between neutrophils and lymphocytes (N/L), lymphocytes and monocytes (L/M), platelets and lymphocytes (PLT/L) and systemic immune-inflammation index (SII) calculated as $N \times PLT / L$. There are no reports regarding these parameters in cats with FIP.

Aims

The aim of the study was to evaluate selected hematology parameters before and after therapy, which could serve as possible prognostic factors in cats with FIP.

Methods

Twelve cats with FIP were included in the study; ranging from 4 months to 11 years. Six were domestic shorthairs, three British shorthairs, and one British longhair, Bengal, and Maine Coon. Nine cats had the wet and three had dry form of FIP. They were treated with drug containing GS-441524 for 12 weeks, and completed 12-week observation period, therefore considered cured. The following haematological parameters were statistically evaluated before and at the end of therapy using the Wilcoxon signed-ranks test: number of neutrophils and lymphocytes and ratio N/L, L/M, PLT/L and SII. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

After therapy, absolute lymphocyte count ($p=0.001$), N/L ($p=0.003$) and PLT/L ($p=0.008$) ratios and SII ($p=0.003$) significantly decreased, while neutrophil count ($p=0.003$) and L/M ratio ($p=0.034$) significantly increased compared to pre-therapy values.

Conclusions

Based on our results, there is significant change in selected hematology parameters in cats which successfully complete the FIP treatment and are considered cured. To evaluate their predictive and prognostic value, comparing these parameters in cats with positive and negative outcome of therapy should be the next step.

Priloga 3: Darja Pavlin, Alenka Nemeč Svete, Lina Tršar, Marjeta Štrljč, Saša Koprivec, Nataša Tozon, Dynamics of selected inflammatory markers during treatment of FIP in cats. Prispevek sprejet za predstavitev na kongresu ECVIM-Ca (European College of Veterinary Internal Medicine – Companion animals), Barcelona, 21.-23.9.2023.

Supplement 3: Darja Pavlin, Alenka Nemeč Svete, Lina Tršar, Marjeta Štrljč, Saša Koprivec, Nataša Tozon, Dynamics of selected inflammatory markers during treatment of FIP in cats. Abstract accepted for the presentation at the ECVIM-Ca congress (European College of Veterinary Internal Medicine – Companion animals), Barcelona, 21.-23.9.2023.

Dynamics of selected inflammatory markers during treatment of FIP in cats

Darja Pavlin¹, Alenka Nemeč Svete¹, Lina Tršar¹, Marjeta Štrljč¹, Saša Koprivec², Nataša Tozon¹

In human patients with COVID-19 it has been shown, that dynamic of different inflammatory parameters can serve as a prognostic factor for outcome. These parameters include C-reactive protein as an acute phase protein and cytokines interleukin (IL)-6, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α .

The aim of the study was to evaluate changes of concentration of serum amyloid A (SAA) as one of the major acute phase proteins in cats, and above-mentioned cytokines in cats treated for FIP. The rationale was to determine dynamic of these variables during FIP treatment to select possible prognostic factors for FIP therapy. For this purpose, we used leftover blood samples, which were collected for diagnostics and clinical monitoring. In healthy control group, the samples were collected as a part of wellness check-up during routine procedures.

Blood samples of seven cats, which were treated with drug containing GS-441524 for 12 weeks and five control cats were included in the study. Five patients had wet and two had dry FIP; their ages ranged from 5 months to 11 years. Serum samples were taken before and 4, 8 and 12 weeks after start of the therapy. All included patients were considered cured, since they completed the 12-week observation period without relapse. Serum concentrations of SAA, IL-6, IL-1 β and TNF- α were determined using species specific ELISA kits.

TNF- α significantly increased after therapy ($p = 0.028$) from a median concentration of 77.4 pg/ml (IQR: 46.5–103.5 pg/ml) to 114.2 pg/ml (IQR: 111.0–135.0 pg/ml). Median concentration after therapy was significantly higher compared to the control group (99.0 pg/ml, IQR: 78.7–99.2 pg/ml; $p=0.042$). SAA and IL-1 β slightly increased after therapy, from median concentration 50.9 pg/ml to 54.5 pg/ml and 20.5 pg/ml to 21.8 pg/ml, respectively. IL-6 decreased from median concentration 61.1 pg/ml to 53.4 pg/ml. However, the changes in these three variables did not reach statistical significance. Furthermore, there were no significant differences ($p > 0.05$) of the last three variables compared to the control group.

Increase of TNF- α after successful treatment is similar to human patients with COVID-19, where it was found that expression of TNF- α is increased in patients who recovered. In contrast to human patients, therapy of FIP did not elicit any significant change in the concentration of

other cytokines. Based on these results we may conclude, that TNF- α is a possible candidate for a prognostic factor in treatment of cats with FIP.

Priloga 4: Darja Pavlin, Marjeta Štrljč, Lina Tršar, Alenka Nemeč Svete, Martina Krofič Źel, Saša Koprivec, Nataša Tozon, Hematološki markerji vnetja pri mačkah z mačjim infekcijskim peritonitisom. Prispevek sprejet za predstavitev na Slovenskem veterinarskem kongresu, Portorož, 3.-5.10.2024.

Supplement 4: Darja Pavlin, Marjeta Štrljč, Lina Tršar, Alenka Nemeč Svete, Martina Krofič Źel, Saša Koprivec, Nataša Tozon, Hematološki markerji vnetja pri mačkah z mačjim infekcijskim peritonitisom. Abstract accepted for the presentation at the Slovenian veterinary congress, Portorož, 3.-5.10.2024.

Hematološki markerji vnetja pri mačkah z mačjim infekcijskim peritonitisom

Darja Pavlin^{1*}, Marjeta Štrljč¹, Lina Tršar¹, Alenka Nemeč Svete¹, Martina Krofič Źel¹, Saša Koprivec², Nataša Tozon¹

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenija

(¹ Klinika za male živali, ² Inštitut za predklinične vede);

* darja.pavlin@vf.uni-lj.si

Ključne besede

mačji infekcijski peritonitis, FIP, COVID-19, razmerja med krvnimi celicami, prognostični dejavniki

Uvod

Mačji infekcijski peritonitis (angl. feline infectious peritonitis, FIP) je bolezen mačk, ki jo povzroča mačji koronavirus (FCoV). Obstajata dve klinični različici bolezni, efuzivni (mokri) in ne-efuzivni (suhi) FIP, katerih patogeneza in prognoza sta povsem različni. Tako v veterinarski, kot v humani medicini, so potrdili, da lahko določeni vnetni indeksi, izračunani iz številčnih vrednosti izbranih krvnih celic, služijo kot diagnostični in/ali prognostični dejavnik pri različnih boleznih: onkoloških, infekcijskih, vnetnih ipd (1). Na podlagi tega smo v naši raziskavi želeli ovrednotiti te parametre pri uspešno zdravljenih mačkah. Ugotoviti smo želeli tudi, ali se kakorkoli razlikujejo med mačkami s suho in mokro obliko FIP-a, saj pri mačkah s FIP-om ti parametri do zdaj še niso bili raziskani.

Materiali in metode

V raziskavo smo vključili 35 mačk, 23 z mokro in 12 s suho obliko FIP-a, ki so prejemale zdravilo GS-441524 najmanj 12 tednov in v času 12-ih tednov dobe opazovanja po zaključku zdravljenja niso imele relapsa. Med zdravljenjem smo stanje mačk spremljali z mesečnimi kliničnimi pregledi in hematološko analizo krvi. V kontrolno skupino je bilo vključenih 28 zdravih mačk, ki so bile po starosti uravnotežene s skupino pacientov. Na podlagi merjenih parametrov celotne krvne slike z diferencialno belo krvno sliko smo določili naslednje vnetne indekse: razmerje med nevtrofilnimi granulociti (N) in limfociti (L) (NLR), razmerje med L in monociti (M) (LMR), razmerje med trombociti (T) in L (TLR) ter sistemski imunsko-vnetni indeks (SII, izračunan kot $N \times T/L$). Z uporabo neparametričnega Mann-Whitneyevega testa

smo ugotavljali razlike omenjenih razmerij med skupino vseh pacientov in kontrolno skupino mačk ter med skupino pacientov z mokro in suho obliko FIP-a. Razlike smo ovrednotili kot statistično pomembne pri vrednosti $p \leq 0,05$.

Rezultati

Primerjava vseh pacientov pred terapijo s kontrolno skupino je pokazala, da imajo živali s FIP-om statistično značilno višje vrednosti indeksov NLR ($p < 0,001$), SII ($p < 0,001$), PLR ($p = 0,007$) ter značilno nižjo vrednost indeksa LMR ($p = 0,014$). Po terapiji razlike v vrednostih NLR, SII in PLR niso bile več statistično značilne v primerjavi s kontrolno skupino. Primerjava skupin s suho in mokro obliko je pokazala, da sta bila pred terapijo indeksa NLR ($p = 0,044$) in SII ($p = 0,045$) statistično značilno višja pri mokri obliki v primerjavi s suho obliko FIP-a. Po zaključku terapije razlika ni bila več statistično značilna ($p > 0,05$).

Razprava

Navedeni vnetni indeksi so preprosto dostopni in izmerljivi z uporabo vrednosti koncentracije različnih krvnih celic iz osnovne krvne slike in diferencialne bele krvne slike, ki jih živalim rutinsko določamo pri vsakem pregledu. Živali s potrjenim FIP-om so imele vse navedene indekse značilno različne v primerjavi s kontrolno skupino zdravih mačk, zato bi lahko omenjeni indeksi služili kot dodatni parametri za diagnostiko bolezni. Ta je pri FIP-u namreč kompleksna in pogosto je za postavitve diagnoze potrebno kombinirati rezultate različnih testov (2). Pomemben rezultat naše raziskave je tudi ta, da so se ti parametri z uspešnim zdravljenjem normalizirali oziroma poenotili s skupino zdravih živali, kar nakazuje na možnost uporabe teh parametrov za nadzor terapije oziroma kot prognostični dejavnik pri zdravljenju. Zanimiva ugotovitev je tudi, da se nekateri od indeksov značilno razlikujejo med pacienti s suho in mokro obliko, kar se sklada z različnim kliničnim potekom obeh oblik bolezni, pri čemer je mokra oblika po navadi povezana s hitrejšim potekom in bistveno krajšim preživetjem.

Literatura

1. Donato G, Pennisi MG, Persichetti MF, Archer J, Masucci MA. Retrospective Comparative Evaluation of Selected Blood Cell Ratios, Acute Phase Proteins, and Leukocyte Changes Suggestive of Inflammation in Cats. *Animals* 2023; 13(16): 2579. <https://doi.org/10.3390/ani13162579>
2. Tasker S, Addie DD, Egberink H, et al. Feline Infectious Peritonitis: European Advisory Board on Cat Diseases Guidelines. *Viruses* 2023.15(9):1847. doi: 10.3390/v15091847

Priloga 5: Lina Tršar, Marjeta Štrljč, Alenka Nemeč Svete, Saša Koprivec, Nataša Tozon, Martina Krofič Źel, Darja Pavlin, Evaluation of selected inflammatory markers in cats with feline infectious peritonitis before and after therapy. Članek poslan v revijo BMC Veterinary Science, v recenziji od 6.4.2024.

Supplement 5: Lina Tršar, Marjeta Štrljč, Alenka Nemeč Svete, Saša Koprivec, Nataša Tozon, Martina Krofič Źel, Darja Pavlin, Evaluation of selected inflammatory markers in cats with feline infectious peritonitis before and after therapy. Research article sent to the BMC Veterinary Science magazine, in review from 6.4.2024.

EVALUATION OF SELECTED INFLAMMATORY MARKERS IN CATS WITH FELINE INFECTIOUS PERITONITIS BEFORE AND AFTER THERAPY

Lina Tršar^{1,*}, Marjeta Štrljč^{1,*}, Alenka Nemeč Svete¹, Saša Koprivec², Nataša Tozon¹, Martina Krofič Źel¹, Darja Pavlin¹

¹ University of Ljubljana Veterinary Faculty, Small Animal Clinic, Cesta v Mestni log 47, Ljubljana, Slovenia

² University of Ljubljana Veterinary Faculty, Institute of Preclinical Sciences, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenia

*Lina Tršar and Marjeta Štrljč contributed equally to this work and share co-first authorship.

Corresponding author: darja.pavlin@vf.uni-lj.si

Abstract

Background: Feline infectious peritonitis (FIP), once considered incurable disease with a mortality rate approaching 100%, has experienced a new therapeutic breakthrough in recent years. The aim of our study was to evaluate selected clinicopathological parameters before and after GS-445124-based treatment of FIP in cats, which could serve as potential candidates for predicting treatment success and monitoring treatment progress.

Results: Pre-treatment haematological parameters in 32 treated cats predictably showed moderate leukocytosis, neutrophilia, lymphopenia and anaemia, which normalized post-treatment. Pre-treatment values of haemogram-derived inflammatory markers (ratio of neutrophils to lymphocytes, platelets to lymphocytes, lymphocytes to monocytes and the systemic immune-inflammatory index) differed significantly from those in the healthy cats and between patients with effusive and non-effusive disease. Post-treatment, only the ratio of lymphocytes to monocytes remained higher; the other three markers were comparable to the control group. The biochemical results showed characteristic abnormalities (e.g. hyperproteinaemia, hypoalbuminemia, hypergammaglobulinemia, hyperbilirubinemia), which normalised with treatment. Lactate dehydrogenase activities did not differ significantly before and after treatment, except in cats with a relapse and one non-responder, which had markedly elevated values at the time of diagnosis. Analysis of leftover blood samples from eight cats for acute phase proteins (haptoglobin and ferritin) and pro-inflammatory cytokines (tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin 6) using ELISA revealed that haptoglobin, but

not ferritin, was significantly elevated compared to the control group and normalised with treatment. No differences in cytokine concentrations were detected before treatment compared to the control group, but tumour necrosis factor- α increased significantly after treatment.

Conclusions: Our findings demonstrate that successful treatment of FIP leads to highly significant changes in most clinicopathological parameters and haemogram-derived inflammatory markers. The latter could offer a simple, inexpensive and readily available alternative to the more commonly used acute phase proteins for monitoring FIP treatment. Successful therapy leads to a significant decrease in haptoglobin and an increase in tumour necrosis factor- α . In our study, cats with an unfavourable outcome showed a marked increase in lactate dehydrogenase activity before therapy, suggesting that this parameter could be a promising prognostic factor in larger studies.

Background

Feline infectious peritonitis (FIP) is a unique infectious disease in cats, caused by the feline coronavirus (FCoV). A distinctive feature of this infection is that the majority of cats either overcome the infection asymptotically or exhibit only mild respiratory or digestive clinical signs. Only a small percentage (up to 10%) of infected cats develop fulminant systemic disease with systemic vasculitis and subsequent multiorgan failure [1]. There are two types of the disease, caused by two different biotypes of FCoV: the low-virulence feline enteric coronavirus and the highly-virulent feline infectious peritonitis virus, the latter being a mutated form that causes FIP [2]. The mutation occurs spontaneously in a certain region of the FCoV genome, leading to a change in cell tropism from enterocytes to monocytes/macrophages [3]. The factors contributing to the mutation of the virus and causing systemic disease are not entirely elucidated and likely involve a combination of virus mutations and individual characteristics of each cat, including genetic predisposition and specific immune response.

Non-specific clinical signs commonly observed in the early stages of the disease include lethargy, anorexia, fever refractory to antibiotics, lymphadenopathy and weight loss [1]. However, in some cases, cats may retain their body condition [1]. There are two clinical forms of FIP: wet/effusive and dry/non-effusive, with the former being easier to diagnose [3]. The most obvious manifestation of the wet form is ascites; however, thoracic and pericardial effusion can also occur. Abdominal organs may be affected by pyogranulomatous lesions and masses [1, 3]. Ocular and neurological manifestations are also common in cats with FIP [1, 3]. More specific clinical signs consist of dyspnoea, tachypnoea, vomiting and diarrhoea.

Until recently, FIP was considered an incurable disease with an extremely poor prognosis, with a mortality rate close to 100% [1]. However, in 2019, researchers from UC Davis published ground-breaking results from a study on the experimental antiviral drug GS-441524, a nucleoside analogue [4]. The study demonstrated an 80% efficacy rate in treating 31 naturally infected cats. The possibility of effectively treating a previously untreatable disease, combined with the drug's lack of registration for veterinary use, has led to the unique phenomenon of so-called crowd-sourced antiviral GS-441524-like therapy [5]. In the last two years, several studies have been published, indicating that despite the unlicensed and uncontrolled production of the drug, its clinical effect has surpassed all expectations [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

With the advent of a completely new therapy offering an effective long-term cure, it seems necessary to determine the predictive and prognostic factors as well as parameters that could be used for monitoring the effect of the therapy. FIP shares some features with COVID-19: both are caused by a coronavirus infection, and in both, the infection can either lead to a life-threatening/fatal form or resolve spontaneously with milder clinical signs. Numerous predictive

factors are known for the fulminant form of COVID-19, including neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR); lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR); platelet-to-lymphocyte ratio (PLR); systemic inflammatory index (SII); lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activity; concentration of cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumour necrosis factor- α (TNF- α); and acute-phase proteins (APPs) such as ferritin and C-reactive protein [14]. Despite the successful treatment of numerous cats with GS-441524-based therapies in the last half decade, only a few prognostic factors indicating a favourable treatment outcome have been described. These include a good appetite and/or activity level, a lower bilirubin concentration, and normalization of alpha-1-acid glycoprotein (AGP) and serum amyloid A (SAA) concentrations [15, 10]. Other parameters that can be used to assess the progress of treatment are the resolution of lymphopenia and anaemia and the normalization of the albumin to globulin (A/G) ratio [4, 10].

The purpose of this study was to evaluate selected clinicopathologic parameters before and after treatment of FIP in cats, which could serve for monitoring the progress of the treatment and as possible candidates for predicting therapeutic outcomes.

Results

1 Cats

Thirty-five FIP-affected cats (14 females and 21 males) with a median age of 11 months (IQR: 6.0 – 24.0 months) and 28 healthy cats (10 females and 18 males) with a median age of 16.5 months (IQR: 10.0 – 23.8 months) were included in the study. Although the cats in the control group were 5.5 months (median) older, the age difference was not significant ($p = 0.065$). The study population comprised 16 domestic shorthair/longhair cats, 11 British shorthair/longhair cats, 4 Maine Coons and one each of the following breeds: Ragdoll, Bengal, Persian and Siberian.

In 23/35 cats (65.7%), the effusive form of FIP was diagnosed, while in 12/35 (34.2%), the non-effusive form was observed. Eight of the 35 cats (22.8%) exhibited neurological signs, primarily seizures, ataxia and incontinence. Additionally, 10/35 (28.5%) cats had ocular involvement, primarily manifesting as clinical signs related to anterior uveitis, including blepharospasm, photophobia, conjunctivitis, myosis, positive flare and low intraocular pressure.

Twenty-nine of the 32 patients were considered cured after a single course of 12-week therapy. In 2/32 patients, relapse occurred after the completion of therapy; one cat relapsed within 80 days, and another within 30 days. However, both were treated again with an increased dosage of the same medicine and successfully completed a second 12-week observation period without relapse. The results obtained in both treatment cycles were used independently in the study. One cat in severe clinical condition died three days after the start of therapy.

Complete data regarding weight (before and after therapy) were available for 29 cats. Before treatment, the treated cats had significantly ($p = 0.010$) lower weight compared to the age-matched control group. After treatment, the treated cats showed a significant increase in weight (Table 1), which was no longer significantly lower compared to the control group ($p = 0.192$). The increase in weight was significant and independent of their age (young cats under one year vs. adult cats over one year).

Table 1: Weight in treated and control cats before and after treatment

Weight [kg]	Weight before treatment [kg] Median; IQR	Weight after treatment [kg] Median; IQR	<i>p</i> value
All FIP cats; n=29	2.85; 2.38–4.00	4.50; 3.80–5.03	< 0.001
FIP cats < 1 year old; n=16	2.55; 1.83–3.05	4.18; 3.19–4.65	< 0.001
FIP cats > 1 year old; n=13	3.50; 3.01–4.35	4.55; 4.00–5.38	0.001
Control group n=22	3.90; 3.53–4.62*		

* Significant difference in weight in control group cats ($p = 0.010$) compared to the group of all FIP cats before treatment; $p < 0.05$ (bold), significant difference before vs after treatment; IQR, 25th – 75th percentile; n=number of data included in the statistical analysis

2 Haematological parameters

Pre-treatment haematological parameters indicated moderate leucocytosis with absolute and relative neutrophilia and lymphopenia and moderate anaemia (Table 2). All haematological parameters, with the exception of platelet and monocyte concentrations, were significantly different compared to those of the control group of healthy cats. Post-treatment values of these haematological parameters normalized, showing no significant difference in comparison with those of the control group. Platelet concentration was the only parameter that was significantly higher compared to the control group after treatment. Similarly, all pre-treatment haemogram-derived inflammatory markers significantly differed from those in healthy cats, with NLR, PLR and SII having higher values, and LMR having a lower value compared to the control group (Table 2). Post-treatment, only LMR remained significantly different compared to healthy cats.

Table 2: Haematological and haemogram-derived inflammatory markers in healthy cats and FIP cats before and after treatment

Parameter	HEALTHY cats	FIP cats			
		Before treatment	<i>p</i> ^a	After treatment	<i>p</i> ^b
WBC ($\times 10^9/L$)	n = 28 8.80; 7.65–12.68	n = 36 14.57; 9.07–20.76	0.006	n = 30 10.60; 8.93–12.10	0.225
RBC ^c ($\times 10^{12}/L$)	n = 28 9.38 \pm 1.56	n = 36 7.15 \pm 1.90	< 0.001	n = 30 9.94 \pm 1.16	0.065
HCT ^c	n = 28	n = 35	< 0.001	n = 30	0.131

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2024. Raziskovalna naloga.

(L/L)	0.413 ± 0.059	0.279 ± 0.067		0.394 ± 0.051	
HGB ^c	n = 28	n = 36	< 0.001	n = 30	0.362
(g/L)	127.6 ± 16.1	91.9 ± 22.3		131.2 ± 14.0	
NEUT	n = 28	n = 36	< 0.001	n = 30	0.560
(x 10 ⁹ /L)	4.58; 2.74–7.23	12.03; 8.26–18.17		4.83; 4.17–6.05	
LYMPH	n = 28	n = 36	< 0.001	n = 30	0.102
(x 10 ⁹ /L)	3.24; 2.68–4.26	1.55; 1.05–2.74		3.98; 2.91–6.09	
MONO	n = 28	n = 36	0.839	n = 30	0.072
(x 10 ⁹ /L)	0.290; 0.190–0.608	0.390; 0.150–0.680		0.210; 0.130–0.308	
PLT	n = 28	n = 27	0.613	n = 29	0.002
(x 10 ⁹ /L)	263; 221–333	258; 168–346		407; 287–435	
NLR	n = 28	n = 36	< 0.001	n = 30	0.234
	1.47; 0.82–2.45	7.43; 3.95–11.13		1.16; 0.78–1.58	
LMR	n = 28	n = 34	0.014	n = 29	0.001
	10.50; 6.41–15.95	6.01; 1.71–12.70		18.50; 14.09–26.93	
PLR	n = 28	n = 27	0.007	n = 29	0.737
	74.9; 57.8–128.6	156.3; 94.2–238.5		88.0; 62.1–126.9	
SII (x 10 ⁹ /L)	n = 28	n = 27	< 0.001	n = 29	0.503
	444.5; 185.4–652.4	2265.7; 869.3–3158.4		431.5; 264.2–722.6	

^a control vs FIP before treatment, significant difference, $p < 0.05$ (bold); ^b control vs FIP after treatment, significant difference, $p < 0.05$ (bold); ^c values reported as mean ± standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, haemoglobin concentration; HCT, haematocrit; NEUT, neutrophil concentration; LYMPH, lymphocyte concentration; MONO, monocyte concentration; PLT, platelet concentration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic immune-inflammatory index; n=number of data included in the statistical analysis.

Statistical analysis of the effects of treatment on haematological parameters was not possible for all included cats due to missing data (Table 3). However, all selected haematological and haemogram-derived inflammatory markers were significantly different post-treatment compared to pre-treatment values. Anaemia improved markedly, as all erythrocyte-dependent parameters (RBC, HCT, HGB) increased significantly after treatment. The most profound change in the white blood cell differential count was a decrease in neutrophils and an increase in lymphocytes. However, we observed a less pronounced but still significant decrease in total white blood cell count ($p = 0.047$). Treatment also had a notable impact on haemogram-derived inflammatory markers, as the comparison of pre- and post- treatment results showed significant differences in all these parameters (Table 3).

Table 3: Haematological parameters and haemogram-derived inflammatory markers before and after treatment of FIP

Haematological parameters	Before treatment	After treatment	<i>p</i>
WBC ($\times 10^9/L$); n=30	11.50; 8.43–18.60	10.60; 8.93–12.1	0.047
RBC ^a ($\times 10^{12}/L$); n=30	7.11 \pm 1.57	9.94 \pm 1.16	< 0.001
HCT ^a (L/L); n=29	0.276 \pm 0.059	0.394 \pm 0.051	< 0.001
HGB ^a (g/L); n=30	91.1 \pm 20.4	131.2 \pm 14.0	< 0.001
NEUT ($\times 10^9/L$); n=30	10.94; 5.81–17.17	4.83; 4.17–6.05	< 0.001
LYMPH ($\times 10^9/L$); n=30	1.48; 1.01–2.48	3.98; 2.91–6.09	< 0.001
MONO ($\times 10^9/L$); n=30	0.390; 0.143–0.643	0.210; 0.130–0.308	0.016
PLT ($\times 10^9/L$); n=23	248; 163–346	400; 283–432	0.006
NLR; n=30	7.43; 4.03–10.28	1.16; 0.78–1.58	< 0.001
LMR; n=27	6.33; 1.75–12.25	18.50; 14.19–26.35	< 0.001
PLR; n=23	144.2; 92.1–246.3	91.7; 67.4–120.5	0.013
SII ($\times 10^9/L$); n=23	2160.4; 869.3–3158.4	431.5; 247.5–749.0	< 0.001

^a values reported as mean \pm standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); *p* < 0.05 (bold), significant difference before vs after treatment; WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, haemoglobin concentration; HCT, haematocrit; NEUT, neutrophil concentration; LYMPH, lymphocyte concentration; MONO, monocyte concentration; PLT, platelet concentration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic immune-inflammatory index; n=number of data included in the statistical analysis.

An additional comparison of both pre- and post-treatment haematological parameters between cats with effusive and those with non-effusive FIP was performed. Statistical analysis revealed significantly higher NLR (*p* = 0.044) pre-treatment values in effusive FIP (median: 8.90; IQR: 4.63 – 14.55) compared to non-effusive FIP (median: 4.98; IQR: 2.37 – 8.39). Similarly, pre-treatment SII values were significantly (*p* = 0.045) higher in effusive FIP (median: $2719.4 \times 10^9/L$; IQR: $1190.0 \times 10^9/L$ – $3971.5 \times 10^9/L$) than in non-effusive FIP (median: $1056.5 \times 10^9/L$; IQR: $701.5 \times 10^9/L$ – $1804.9 \times 10^9/L$). Conversely, we observed a much lower, though non-significant (*p*=0.052), pre-treatment lymphocyte concentration in effusive FIP (median: $1.23 \times 10^9/L$; IQR: $1.02 \times 10^9/L$ – $2.20 \times 10^9/L$) than in non-effusive FIP (median: $2.40 \times 10^9/L$; IQR: $1.31 \times 10^9/L$ – $4.69 \times 10^9/L$). All other haematological parameters and haemogram-derived inflammatory markers did not differ significantly between these two clinical presentations either before or after treatment.

3 Biochemical parameters

Biochemistry profiles of treated cats, which were performed as a part of the diagnostics of the disease, revealed hyperproteinaemia with hyperglobulinemia, hypoalbuminemia, decreased albumin/globulin ratio and hyperbilirubinemia (Table 4).

Post-treatment biochemical parameters were not available for all patients; therefore, the comparison of pre- and post-treatment parameters in treated cats was based on a smaller subset (Table 4). Therapy profoundly affected the majority of biochemical parameters, which returned toward reference values: there was a significant decrease in the concentrations of total proteins, bilirubin and absolute and relative globulins. Albumin levels, A/G ratio and alanine aminotransferase (ALT) activity significantly increased. Electrophoresis of serum proteins showed a significant decrease only in the concentrations of alpha-2 and gamma globulins; changes in other fractions did not reach statistical significance.

Table 4: Selected biochemical parameters before and after treatment of FIP and their reference values

Biochemical parameters	Reference values*	Before treatment	After treatment	p
TP ^a (g/L); n=29	59–87	84.0 ± 15.6	72.9 ± 6.2	< 0.001
ALB ^a (g/L); n=29	31–47	23.6 ± 6.3	36.7 ± 3.6	< 0.001
ALB ^a (%); n=29	44.5–62.3	28.7 ± 8.9	50.6 ± 6.2	< 0.001
GLOB ^a (g/L); n=29	28.0–51.0	60.1 ± 16.2	36.3 ± 7.0	< 0.001
GLOB ^a (%); n=29	5.9–23	70.9 ± 9.6	49.4 ± 6.4	< 0.001
A/G ^a ; n=29	>0.57	0.433 ± 0.224	1.058 ± 0.265	< 0.001
Alpha-1 globulins (g/L); n=7	1.6–5.2	1.8; 1.6–2.1	2.3; 2.0–2.5	0.176
Alpha-2 globulins (g/L); n=7	4.0–12.8	8.4; 6.1–11.1	5.5; 4.6–7.4	0.018
Beta-1 globulins (g/L); n=7	1.9–7.4	4.5; 3.8–5.1	5.2; 5.0–5.5	0.150
Beta-2 globulins (g/L); n=7	2.0–8.5	7.0; 5.8–8.1	6.1; 5.0–6.7	0.128
Gamma-globulins (g/L); n=7	3.6–16.9	32.9; 19.0–47.6	12.7; 12.3–19.4	0.028
ALT(U/L); n=28	27–110	39.0; 31.3–50.8	67.5; 50.0–80.0	< 0.001
Bilirubin (μmol/L); n=25	0–6.8	8.00; 4.05–23.40	3.20; 2.60–3.80	< 0.001
LDH (U/L); n=9	21–217	119.0; 80.5–152.5	110.0; 75.5–172.5	0.594

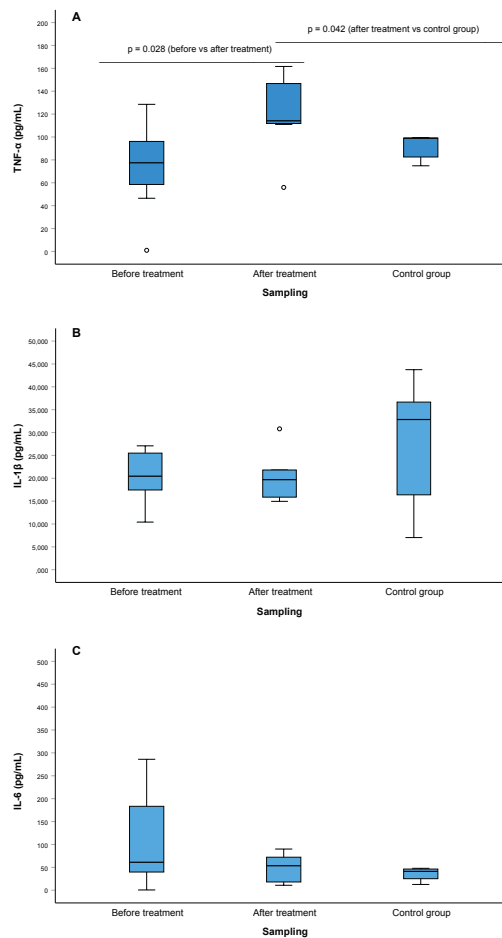
*IDEXX laboratories; ^a values reported as mean ± standard deviation, other parameters are reported as median and IQR (25th to 75th percentile); *p* < 0.05 (bold), significant difference before vs after treatment; TP, total protein

concentration; ALB, albumin; GLOB, globulins; A/G, albumin-to-globulin ratio; ALT, alanine aminotransferase; n=number of data included in the statistical analysis.

4 Cytokine and APP response

TNF- α concentration (Figure 1A) significantly increased after therapy from a median concentration of 77.4 pg/mL (IQR: 46.5–103.5 pg/mL) to 114.2 pg/mL (IQR: 111.0–158.4 pg/mL) ($p = 0.028$). Additionally, its median concentration after therapy was significantly higher compared to the control group (99.0 pg/mL, IQR: 78.7–99.2 pg/mL; $p = 0.042$). IL-1 β concentration (Figure 1B) slightly decreased after therapy, from its median concentration of 20.3 pg/mL (IQR: 13.9–26.3 pg/mL) to 19.7 pg/mL (IQR: 15.4–26.3 pg/mL). IL-6 concentration (Figure 1C) decreased from a median concentration of 61.1 pg/mL (IQR: 36.6–286.0 pg/mL) to 53.4 pg/mL (IQR: 11.2–90.0 pg/mL). However, the changes in these two variables did not reach statistical significance. Furthermore, there were no significant differences in IL-1 β and IL-6 concentrations either before or after therapy compared to the control group.

Figure 1: Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) (A), interleukin-1 β (IL-1 β) (B) and interleukin-6 (IL-6) (C) concentrations before and after FIP treatment and in the control group of healthy cats

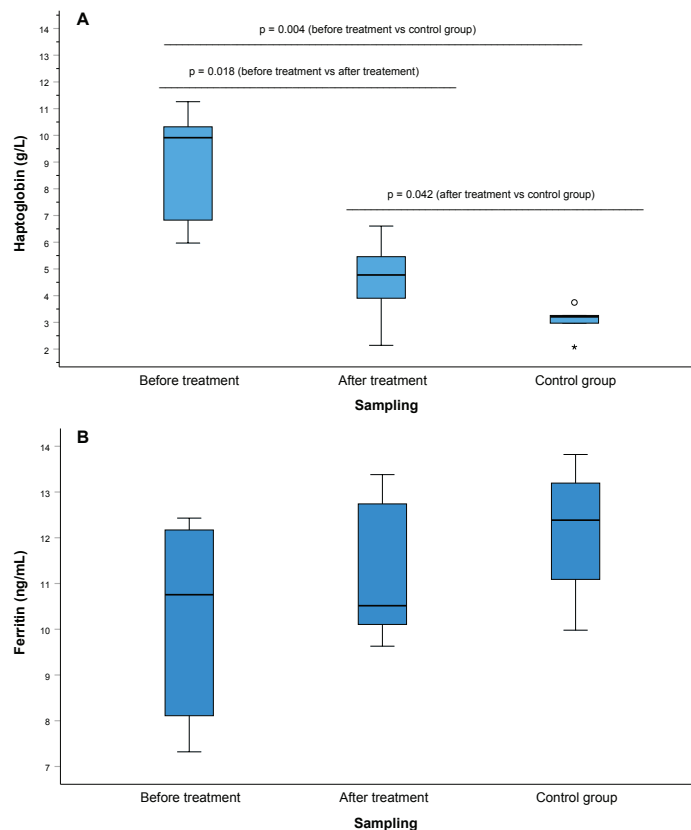


Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2024. Raziskovalna naloga.

Of the acute-phase proteins, the haptoglobin concentration (Figure 2A) showed significant changes after treatment, significantly decreasing ($p = 0.018$) from 9.91 g/L (IQR: 6.41 – 10.53 g/L) to 4.77 g/L (IQR: 3.56 – 5.47). Compared to the control group, the haptoglobin concentration was significantly higher both before ($p = 0.004$) and after therapy ($p = 0.042$). However, the post-treatment concentration almost reached that of the control group (median: 3.21; IQR: 2.55 – 3.50 g/L), with the p -value at the threshold of statistical significance.

Pre-treatment and post-treatment ferritin concentrations (Figure 2B) of 10.76 ng/mL (IQR: 8.05 – 12.30 ng/mL) and 10.52 ng/mL (IQR: 10.00 – 12.83 ng/mL), respectively, were lower compared to those of the control group (median: 12.39 ng/mL; IQR: 10.54 – 13.51 ng/mL); however, these differences did not reach statistical significance in any of the comparisons.

Figure 2: Haptoglobin (A) and ferritin (B) concentrations before and after FIP treatment and in the control group of healthy cats



Discussion

Our study demonstrated that clinically successful treatment of FIP in cats results in the normalization of the majority of haematological and biochemical parameters presented at the time of diagnosis. This includes parameters that were severely altered pre-treatment. Furthermore, we observed a significant decrease in haptoglobin and an increase of TNF- α following clinical remission.

Specific antiviral treatment with GS-441524-based therapy has been demonstrated to be highly successful in treating FIP in cats. Large-scale studies report remission rates between 80 and 94%, with some studies even reaching a 100% success rate [4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 17]. A relapse rate of approximately 10% has been reported in a large-scale study, which aligns with our findings [15], where relapse was observed in 2 cats out of a surviving 31. Both of these cats were successfully treated with a repeated course of therapy. Notably, one of the two cats that relapsed in our study was a Ragdoll. In their manuscript, Green et al (2023) reported a poorer response to therapy in Ragdoll cats, noting a delayed response to treatment, with 3/5 Ragdoll cats being euthanized [16]. While the number of Ragdolls in both studies is too low to draw definitive conclusions, further research should consider investigating breed-specific responses to treatment, particularly since pure-bred cats are at higher risk of developing FIP [14].

An important outcome in treated cats was the significant increase in their body weight [18, 19], which was also confirmed in our study. Notably, the weight gain was not associated with the accumulation of ascitic fluid, as ascites resolved within the first month of therapy in all cats enrolled in the study. FIP commonly affects younger or adolescent cats, and thus it was important to discern whether growth could be influencing the observed weight gain. To address this, we divided cats into two subcategories based on their age (young cats under 1 year and adult cats over 1 year). Weight gain was significant in both age groups. Therefore, regular weighing should be recommended for all cats during FIP treatment, serving as a simple, non-invasive monitoring tool and for the necessary adjustment of drug dosages.

The focus of our study was the evaluation of selected clinicopathologic parameters, with an emphasis on inflammatory markers, to ascertain if they correlate with clinical improvement. Routine laboratory findings of cats at the time of diagnosis displayed typical clinicopathological alterations associated with FIP, as previously described [10, 13, 15, 16, 17, 20, 21]. In summary, these included lymphopenia with neutrophilia and non-regenerative anaemia for haematological parameters, and hyperproteinaemia, hyperglobulinemia, hypoalbuminemia, low A/G ratio and pronounced hyperbilirubinemia for biochemical parameters. An important finding was that treatment had a profound impact on the vast majority of both haematological and biochemical parameters. We succeeded in demonstrating a significant change in almost all clinicopathologic parameters compared to pre-treatment values. Furthermore, the post-treatment values were either within reference ranges (IDEXX laboratories) or did not differ significantly from the healthy control group. A similar observation was noted in other studies describing different approaches to the treatment of FIP, with either parenteral or peroral application of GS-441524 or remdesivir [10, 11, 13, 16, 17, 18, 19]. However, in contrast to our study, the majority of previous studies relied only on descriptive statistics of clinicopathologic changes during treatment, without using statistical methods to compare measured parameters, or they compared a much smaller set of laboratory parameters.

Haemogram-derived inflammatory markers, such as NLR, LMR, PLR and SII, have already been identified as prognostic and/or diagnostic markers in various neoplastic and inflammatory diseases in cats [22, 23, 24, 25], yet their role in FIP has not been previously studied. Our study demonstrated that cats with FIP have significantly higher NLR, PLR and SII levels and significantly lower LMR levels compared to healthy cats. This is similar to findings in human patients with acute COVID-19 [26], where the severity of clinical signs and treatment outcomes are associated with the values and dynamics of haemogram-derived inflammatory markers, particularly NLR [22, 27, 28]. The post-treatment values of these inflammatory markers aligned with those of the healthy control group, with the exception of LMR, which significantly

increased beyond the healthy group's values. This increase can be attributed to a significant increase in the absolute lymphocyte count, which influences the ratio. Similar normalization of these inflammatory parameters has been observed in patients with severe COVID-19 who successfully recovered [23]. Another notable finding in our study was that cats with effusive FIP had significantly higher NLR and SII levels compared to cats with non-effusive FIP. The difference in lymphocyte count approached the threshold of statistical significance ($p=0.052$), with lower concentrations observed in effusive cases. Effusive FIP is reported to have a worse prognosis compared to the non-effusive form of the disease, with an MST of 21.3 days and 38.4 days, respectively [29]. Typically, non-effusive FIP has a more chronic and less severe clinical presentation, and APP concentrations are usually lower compared to the effusive form [6, 20], which is also likely reflected in haemogram-derived inflammatory markers.

Recently, Donato et al. studied the relationship between NLR, MLR (an inverse value of the parameter we included, LMR) and PLR ratios and other markers of inflammation in cats [30]. The highest values of these markers were found in cats with hypoalbuminemia, hyperglobulinemia and increased SAA – conditions typically present in FIP patients – but also with a normal albumin-to-globulin ratio, and the presence of left shift response. In the group of cats without any indications of inflammation, the maximum values of NLR, MLR and PLR were 11.25, 0.42 and 528.3, respectively, which the authors propose as possible cut-off values for “cats with no inflammation”. In our study, the vast majority of cats with FIP had values well below these proposed cut-off values but were still significantly higher compared to our healthy control group. These findings align more closely with results obtained from 76 healthy cats (median NLR of 1.9) and cats with systemic inflammatory response syndrome and sepsis (median NLR of approximately 9) [31]. Given that FIP is a disease related to a pronounced systemic inflammatory response, which is also reflected in elevated levels of other inflammatory markers (e.g. SAA, AGP, etc) [15], it is reasonable to expect an increase in haemogram-derived inflammatory markers. The discrepancy between our results and those of Donato could stem from differences in sample size, the age of the cats included, methodology (analyser), or, most likely, the different diagnoses of the included cats. In Donato's study, none of the cats had FIP, and the group of “cats with no inflammation” consisted of cats without leucocyte alterations suggestive of inflammation, which does not necessarily equate to healthy cats. Therefore, it is plausible that the cut-off values proposed by Donato might be too high or at least warrant further investigation. Nevertheless, these calculated markers could prove beneficial in clinical use, as they are easily measurable, inexpensive and accessible parameters.

Previous publications have reported that approximately 30-40% of cats with FIP exhibit an increase in ALT activity at the time of diagnosis, which can persist until the completion of therapy [11, 17, 18]. In our study, only 3 out of 35 cats with FIP (8%) exhibited a minor increase in ALT activity – the highest value was 178 U/L, which is approximately 50% above the upper reference limit. For all these cats, the values normalized after treatment. However, we observed that four cats (11%) with ALT values within reference limits pre-treatment developed an increase in ALT activity after treatment. Three of them had just minor increases (between 119 and 168 U/L, with a reference range of 27 to 110 U/L), and the fourth, a Ragdoll cat with a relapse, exhibited a three-fold increase over the upper reference range. This particular cat also experienced an increase in the activities of alkaline phosphatase (two-fold increase) and aspartate transaminase (20% over the higher reference limit) following the second cycle of treatment, which persisted for at least 6 months. However, the cat remains asymptomatic and in remission one year later. There have been reports of minor and reversible increases in ALT in human patients with COVID-19 following treatment with remdesivir, without any other signs

of liver damage [32]. In feline patients, there have been sporadic observations of increased ALT during treatment of FIP [7, 16, 17], and they were more pronounced when treatment included GS, compared to monotherapy with remdesivir [16]. However, the precise cause of possible hepatopathy associated with administration of remdesivir and GS-441524 is still not fully understood [17].

Several reports from human medicine have demonstrated that increased LDH activity indicates a negative clinical prognosis and higher mortality in human patients with COVID-19 [33, 34]. In cats, it is proposed as a prognostic factor in various diseases, such as acute kidney injury and malignant diseases [35, 36, 37]. Our study's statistical analysis of paired LDH activities in cats before and after therapy did not reveal significant changes. However, LDH activity was measured in 15 pre-treatment samples of treated cats (data not shown), showing increases in three cases: both patients who suffered relapse (approximately two-fold increase) and the only cat that died within days of starting therapy (approximately five-fold increase). Furthermore, the Ragdoll cat that relapsed had an LDH activity of 222 U/L, slightly above the upper value of the reference range, after the first cycle of therapy, which normalized to 130 U/L after the second and successful treatment. The number of cats with undesirable outcomes (relapse or death) in our study was so low that statistical evaluation was not possible. Nevertheless, we believe that the notable differences in LDH activity at the time of diagnosis between cats with positive and negative outcomes warrant further investigation of this enzyme as a possible prognostic factor in cats with FIP. Another interesting approach could be the determination of different LDH isoenzymes in effusions of treated cats [38, 39, 40]. However, this type of measurement would not be feasible for monitoring of therapy, as effusions usually resolve in less than 6 weeks (sometimes as quickly as 1 week) with successful treatment [16, 18, 19], which was also observed in our study. Therefore, any long-term serial monitoring is not possible. Furthermore, fluid is not available in the non-effusive form of the disease.

In a small number of included cats with sufficient leftover serum samples, the pre- and post-treatment concentrations of selected APPs and proinflammatory cytokines were determined. In FIP, concentrations of haptoglobin, SAA and AGP are known to increase [20, 41, 42, 43], with the latter two aiding in diagnosis [15, 20]; however, increased concentrations are not pathognomonic for the disease. We decided to include haptoglobin, which has not been extensively studied in cats with FIP, and ferritin, which has previously been demonstrated to have a prognostic value in people with COVID-19 [14, 44]. Haptoglobin was significantly higher compared to the healthy control and showed significant decline post-treatment, aligning with control group levels. Its normalization after treatment is a novel finding, making it another candidate for treatment monitoring, along with previously described AGP and SAA, which exhibit similar dynamics [6, 16, 20].

To evaluate the changes in pro-inflammatory cytokines in treated cats, we measured the concentration of the three main feline proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β [45]. These are also among the most important prognostic factors in COVID19 [46]. In cats with Coronaviral infection these three cytokines have been studied by Safi et al. (2017) [2] using different methodologies, including real-time PCR and a multiplex bead-based immunoassay. They found that IL-1 β and IL-6 could not be detected in the serum of the majority of cats with FIP but were present in their abdominal effusions. In contrast, TNF- α production was detected in both FCoV-positive and negative groups. Our study demonstrated a significant increase of TNF- α concentration after therapy and a non-significant decrease in IL-1 β and IL-6 concentrations. TNF- α is a major contributor to the inflammatory response and pathogenesis of FIP, causing apoptosis of lymphocytes and subsequently lymphopenia [20, 47]. It would be

reasonable to expect that TNF- α would be elevated before therapy and normalize after treatment; however, our study showed the opposite. These results are similar to those in people with severe COVID-19 treated with antiviral therapy, such as favipiravir or lopinavir/ritonavir, as reported by Mortaz et al. [48]. The concentration of TNF- α at the time of diagnosis did not differ compared to the control group but significantly increased after therapy, especially in patients requiring intensive care. The authors suggested that might be due to the inability of the anti-viral therapy to suppress the systemic inflammatory response, despite clinical improvement and improvement in other inflammatory markers associated with COVID-19 infection. It should be stressed that the number of samples in this part of our study was very low and that the concentrations were measured using the ELISA method, which has its limitations. Therefore, the results should be interpreted with caution and validated in a larger sample size.

The findings of this study must be viewed in light of several limitations. The main limitation of this study is the nature of the treatment. Since GS-4441524 is currently produced without a licence and uncontrolled, it is not possible to ascertain the exact quantity of the active ingredient received by the cats. However, two research groups have recently reported the results of quality assessments of a wide range of products (30 vials from 17 brands by Mulligan and Browning and 127 different products by Kent et al.) [49, 50]. All parenteral products marketed as GS-44125 contained this active ingredient at the advertised or higher concentrations, with peroral products showing more variable concentrations. Although procuring licensed GS-441524 is currently not possible in the majority of countries worldwide, the patients appear to be treated with the advertised drug, as evidenced by the high survival rate of treated cats. Another limitation is the unavailability of all studied parameters for every treated cat before and after therapy, due to the retrospective nature of the study and issues with client compliance. This is particularly true for the small number of samples in which cytokines and APPs were determined using the ELISA method, which has its own set of limitations.

Conclusions

In conclusion, we demonstrated that successful treatment of FIP results in highly significant changes in the majority of clinicopathological parameters in treated patients. For the first time, we demonstrated that haemogram-derived inflammatory markers follow a similar pattern and significantly differ between effusive and non-effusive FIP. They could serve as simple, cost-effective and readily available parameters for diagnostic and monitoring purposes, similar to the currently more commonly used but more expensive or less available APPs. Additionally, based on our limited number of samples, we also conclude that haptoglobin is another APP that normalizes with treatment of FIP, and that TNF- α increases after therapy. We also found indications that LDH activity could be a possible new prognostic factor for cats with FIP. Our results encourage further studies on LDH concentrations and cytokine and APP responses to treatment of FIP in a larger group of cats.

Methods

Cats

Blood samples from a total of 35 client-owned cats were included in this study, which was conducted between 2020 and 2022 at the Small Animal Clinic of the Veterinary faculty of the University of Ljubljana, Slovenia. The inclusion criteria consisted of a FIP diagnosis, confirmed by a veterinarian, following the AAFP diagnostic guidelines [3]. Briefly, the diagnosis of FIP was based on relevant clinical signs with typical clinicopathological test results (haematology, biochemistry and cytologic examination of effusions) and the detection of FCoV in body effusions and/or affected organs (spleen, lymph node aspirates) with commercially available RT-PCR detection of mutations in spike proteins (FIP virus RealPCR™, IDEXX laboratory).

The study was conducted as a retrospective study, utilizing clinical and laboratory data and leftover blood samples collected for diagnostics and/or clinical monitoring. A total of 32 cats were treated with a non-licensed, but commercially available antiviral drug containing the adenosine nucleoside analogue GS-441524. At the time of the study, there were no licensed drugs containing GS-441524 available in the European Union; therefore, the therapy was carried out as described in previously reported crowd-sourced GS-441524-based therapies [5]. Cats that completed a 12-week observation period after the completion of therapy without experiencing a relapse were considered cured. Three out of 35 cats were not treated, but their results were included in the statistical pre-treatment group comparison with the control group.

The following clinical information was collected: weight before/after treatment, age, sex and neuter status, presenting clinical signs inclusive of effusive/non-effusive form, ocular and neurological involvement. In treated cats, clinical examinations and blood sample collections were performed at the time of diagnosis and 4, 8 and 12 weeks after the start of treatment. Blood samples were collected from all cats via venipuncture of the cephalic or jugular vein. Leftover serum samples from 19 cats were stored at -80°C for further analyses with the permission of the owners.

Haematology analysis and haematology-derived inflammatory markers

In all included animals, a complete blood count with a differential white blood cell count was performed using an ADVIA 120 automated haematology analyser with species-specific software (Siemens, Germany). From these results, the following haematology-derived inflammatory markers were calculated from absolute counts of relevant parameters: NLR, LMR and PLR. Additionally SII was calculated as neutrophils x platelets/lymphocytes. Since reference values for these haematology-derived inflammatory markers are not available for cats, a control group of 28 age-matched healthy cats was included, for which the same indexes were calculated. In these cats, the analysis was performed as a part of a wellness checkup, and results were used with the permission of the owners.

Biochemistry analysis

The biochemical parameters determined at each time point were selected at the discretion of the attending veterinarian, based on the clinical status of each animal. However, the minimal laboratory workup included the routine determination of serum urea, creatinine, total protein and albumin concentrations, and ALT activity. Serum protein electrophoresis and bilirubin measurement were performed in 7 treated cats before treatment and 20 cats after treatment. All biochemical analyses were performed at a commercial laboratory (IDEXX Laboratories, Germany), and individual values were compared with the reference ranges reported by IDEXX Laboratories. Additionally, LDH activity was determined retrospectively in stored frozen serum

samples. LDH activity was measured spectrophotometrically using an RX Daytona+ automated biochemical analyser (Randox, Crumlin, United Kingdom) and a Randox lactate dehydrogenase L-lactate–pyruvate reagent kit in the Diagnostic Laboratory of the Small Animal Clinic.

Cytokine and APP response

Out of the 19 samples stored with owners' permission, samples from 8 cats were suitable for the determination of cytokine and/or APP response. The remaining cats had either missing samples at crucial time points (e.g. before or after therapy) due to the owners' lack of compliance, or the volume of the stored samples was insufficient for analysis.

An additional five blood samples from healthy cats, collected as part of a wellness check-up during routine examinations, served as a control group. Cats were considered healthy based on their history, physical examination and routine laboratory results (routine haematology and biochemistry parameters within reference ranges). Species-specific, commercially available quantitative sandwich ELISA tests were used to determine five selected serum parameters: IL-6, TNF- α , IL-1 β , ferritin (Cat IL-6 ELISA kit, Cat. No.: MBS284478; Cat TNF- α ELISA kit, Cat. No.: MBS1602676; Cat IL-1 β kit, Cat. No.: MBS9319075; Cat Ferritin ELISA kit, Cat. No.: MBS096404; all Mybiosource, USA), and haptoglobin (Feline and Canine Haptoglobin ELISA kit, Cat. No.: TE1033, Teco, Switzerland). The standards used to generate the calibration curve were prepared in six different concentrations for each kit separately according to the manufacturer's recommendations regarding the stated sensitivity for each parameter. All test samples, standards and quality controls were analysed in duplicate according to the manufacturer's instructions. Optical densities were measured at 450 nm using a Multiskan FC Microplate Photometer microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA), and the average absorbance of the two measurements of each sample was calculated. Sample concentrations were determined using the best-fit standard curve.

Statistical analysis

Results from the initial visit (pre-treatment) and final checkup (post-treatment, 12 weeks after the start of therapy) were statistically analyzed for the study. The data were analysed using commercially available software (IBM SPSS 29, Chicago, Illinois, USA). The Shapiro-Wilk test was used to determine the data distribution. Based on the results, parametric or non-parametric tests were used to compare the data. We performed the following comparisons:

- (a) for haematology, cytokines and APPs, pre-treatment values of selected parameters (including results of cats that were not treated, where available) were compared with values of the control group. Post-treatment values of these parameters were compared with those of the control group and, for parameters where paired results for the same cat were available, pre- and post-treatment values were compared to determine the effect of the therapy. In addition, pre- and post-treatment data were also compared between cats with the effusive and non-effusive form of FIP.
- (b) For biochemistry results, pre-treatment and post-treatment values were compared for those parameters where paired results for the same cat were available to determine the effect of the therapy.

Accordingly, an independent t-test was used in cases of normally distributed data, and the Mann-Whitney U-test was applied for non-normally distributed data to test for statistically significant differences in the measured parameters between FIP cats and the control group before and after therapy and between cats with the effusive and non-effusive form of FIP. Moreover, the Mann-Whitney test was used to test for statistically significant differences in weight between young and adult cats. For FIP cats, a paired sample t-test was used for normally distributed data, and a Wilcoxon signed-rank test was used for non-normally distributed data to compare parameters before and after therapy. A value of $p \leq 0.05$ was considered significant.

List of abbreviations

A/G: albumin to globulin ratio

AGP: alpha-1-acid glycoprotein

ALT: alanine aminotransferase

APPs: acute-phase proteins

FCoV: feline coronavirus

FIP: feline infectious peritonitis

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-6: interleukin-6

LDH: lactate dehydrogenase

LMR: lymphocyte-to-monocyte ratio

NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio

PLR: platelet-to-lymphocyte ratio

SAA: serum amyloid A

SII: systemic inflammatory index

TNF- α : tumour necrosis factor- α

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The authors confirm that the study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines. All owners provided informed consent for use of leftover samples for the study.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

All data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

The study was supported by grant no. P4-0053 from the Slovenian Research Agency. The funder had no influence on the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Authors' contributions

Study concept/study design: D.P., N.T., A.N.S.; data acquisition: D.P., L.T., M.Š., M.K.Ž., A.N.S., S.K.; statistical analysis: A.N.S.; data analysis/interpretation: all authors; manuscript drafting: L.T., M.Š., D.P.; manuscript revision for important intellectual content: all authors; approval of the final submitted manuscript: all authors.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Luka Milčinski for his assistance with figure preparations and Philip Jan Nagel for manuscript editing.

References

- 1 Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, et al. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2009; doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.008.
- 2 Safi N, Haghani A, Ng SW, Selvarajah GT, Mustaffa-Kamal F, Omar AR. Expression profiles of immune mediators in feline Coronavirus-infected cells and clinical samples of feline Coronavirus-positive cats. *BMC Vet Res.* 2017; doi: 10.1186/s12917-017-1019-2.
- 3 Thayer V, Gogolski S, Felten S, Hartmann K, Kennedy M, Olah GA. 2022 AAFP/EveryCat feline infectious peritonitis diagnosis guidelines. *J Feline Med Surg.* 2022; doi: 10.1177/1098612X221118761.
- 4 Pedersen NC, Perron M, Bannasch M, Montgomery E, Murakami E, Liepnieks M, et al. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 2019; doi: 10.1177/1098612X19825701.
- 5 Jones S, Novicoff W, Nadeau J, Evans S. Unlicensed GS-441524-Like antiviral therapy can be effective for at-home treatment of feline infectious peritonitis. *Animals.* 2021; doi: 10.3390/ani11082257.
- 6 Katayama M, Uemura Y. Prognostic prediction for therapeutic effects of mutian on 324 client-owned cats with feline infectious peritonitis based on clinical laboratory indicators and physical signs. *Vet Sci.* 2023; doi: 10.3390/vetsci10020136.

7 Krentz D, Zenger K, Alberer M, Feltern S, Bergmann M, Dorsch R, et al. Curing cats with feline infectious peritonitis with an oral multi-component drug containing GS-441524. *Viruses*. 2021; doi: 10.3390/v13112228.

8 Roy M, Jacque N, Novicoff W, Li E, Negash R, Evans SJM. Unlicensed molnupiravir is an effective rescue treatment following failure of unlicensed GS-441524-like therapy for cats with suspected feline infectious peritonitis. *Pathogens*. 2022; doi: 10.3390/pathogens11101209.

9 Izes AM, Yu J, Norris JM, Govendir M. Current status on treatment options for feline infectious peritonitis and SARS-CoV-2 positive cats. *Vet Q*. 2020; doi: 10.1080/01652176.2020.1845917.

10 Zwicklbauer K, Krentz D, Bergmann M, Felten S, Dorsch R, Fischer A, et al. Long-term follow-up of cats in complete remission after treatment of feline infectious peritonitis with oral GS-441524. *J Feline Med Surg*. 2023; doi: 10.1177/1098612X231183250.

11 Krentz D, Zwicklbauer K, Felten S, Bergmann M, Dorsch R, Hofmann-Lehmann R, et al. Clinical follow-up and postmortem findings in a cat that was cured of feline infectious peritonitis with an oral antiviral drug containing GS-441524. *Viruses*. 2022; doi: 10.3390/v14092040.

12 Meli ML, Spiri AM, Zwicklbauer K, Krentz D, Felten S, Bergmann M, et al. Fecal feline coronavirus RNA shedding and spike gene mutations in cats with feline infectious peritonitis treated with GS-441524. *Viruses*. 2022; doi: 10.3390/v14051069.

13 Yin Y, Li T, Wang C, Liu X, Ouyang H, Ji W, et al. A retrospective study of clinical and laboratory features and treatment on cats highly suspected of feline infectious peritonitis in Wuhan, China. *Sci Rep*. 2021; doi: 10.1038/s41598-021-84754-0

14 Gallo Marin B, Aghagoli G, Lavine K, Yang L, Siff EJ, Chiang SS, et al. Predictors of COVID-19 severity: A literature review. *Rev Med Virol*. 2021; doi: 10.1002/rmv.2146.

15 Tasker S, Addie DD, Egberink H, Hofmann-Lehmann R, Hosie MJ, Truyen U, et al. Feline infectious peritonitis: european advisory board on cat diseases guidelines. *Viruses*. 2023; doi: 10.3390/v15091847.

16 Taylor SS, Coggins S, Barker EN, Gunn-Moore D, Jeevaratnam K, Norris JM, et al. Retrospective study and outcome of 307 cats with feline infectious peritonitis treated with legally sourced veterinary compounded preparations of remdesivir and GS-441524 (2020–2022). *J Fel Med Surg*. 2023; doi: 10.1177/1098612X231194460.

17 Green J, Syme H, Tayler S. Thirty-two cats with effusive or non-effusive feline infectious peritonitis treated with a combination of remdesivir and GS-441524. *J Vet Intern Med*. 2023; doi: 10.1111/jvim.16804.

18 Coggins SJ, Norris JM, Malik R, Govendir M, Hall EJ, Kimble B, et al. Outcomes of treatment of cats with feline infectious peritonitis using parenterally administered remdesivir, with or without transition to orally administered GS-441524. *J Vet Intern Med*. 2023; doi: 10.1111/jvim.16803.

19 Cosaro E, Pires J, Castillo D, Murphy BG, Reagan KL. Efficacy of oral remdesivir compared to GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring effusive feline infectious peritonitis: a blinded, non-inferiority study. *Viruses*. 2023; doi: 10.3390/v15081680.

- 20 Addie DD, Silveira C, Aston C, Brauckmann P, Covell-Ritchie J, Felstead C, et al. Alpha-1 acid glycoprotein reduction differentiated recovery from remission in a small cohort of cats treated for feline infectious peritonitis. *Viruses*. 2022; doi: 10.3390/v14040744.
- 21 Riemer F, Kuehner KA, Ritz S, Sauter-Louis C, Hartmann K. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis – a retrospective study of 231 confirmed cases (2000–2010). *J Feline Med Surg*. 2016; doi: 10.1177/1098612X15586209.
- 22 Petrucci GN, Lobo L, Queiroga F, Martins J, Prada J, Pires I, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic marker for feline mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol*. 2021; doi: 10.1111/vco.12686.
- 23 Chiti LE, Martano M, Ferrari R, Boracchi P, Giordano A, Grieco V, et al. Evaluation of leukocyte counts and neutrophil-to-lymphocyte ratio as predictors of local recurrence of feline injection site sarcoma after curative intent surgery. *Vet Comp Oncol*. 2020; doi: 10.1111/vco.12534.
- 24 Neumann S. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in dogs and cats with acute pancreatitis. *Vet Clin Pathol*. 2021; doi: 10.1111/vcp.12979.
- 25 Tagawa M, Shimbo G, Miyahara K. Prognostic role of lymphocyte to monocyte ratio in feline high-grade lymphomas. *Can Vet J*. 2021; 62: 1095-1103.
- 26 Kosidło JW, Wolszczak-Biedrzycka B, Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Dorf J. Clinical significance and diagnostic utility of NLR, LMR, PLR and SII in the course of COVID-19: A Literature Review. *J Inflamm Res*. 2023; doi: 10.2147/JIR.S395331.
- 27 Liu A, Hammond R, Donnelly PD, Kaski JC, Coates ARM. Effective prognostic and clinical risk stratification in COVID-19 using multimodality biomarkers. *J Intern Med*. 2023; doi: 10.1111/joim.13646.
- 28 Zahorec R. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives. *Bratisl Lek Listy*. 2021; doi: 10.4149/BLL_2021_078.
- 29 Tsai H-Y, Chueh L-L, Lin C-N, Su B-L. Clinicopathological findings and disease staging of feline infectious peritonitis: 51 cases from 2003 to 2009 in Taiwan. *J Fel Med Surg*. 2011; doi:10.1016/j.jfms.2010.09.014.
- 30 Donato G, Pennisi MG, Persichetti MF, Archer J, Masucci M. A Retrospective comparative evaluation of selected blood cell ratios, acute phase proteins, and leukocyte changes suggestive of inflammation in cats. *Animals*. 2023; doi: 10.3390/ani13162579.
- 31 Gori E, Pierini A, Lippi I, Lubas G, Marchetti V. Leukocytes ratios in feline systemic inflammatory response syndrome and sepsis: a retrospective analysis of 209 cases. *Animals*. 2021; doi: 10.3390/ani11061644.
- 32 Casalini G, Giacomelli A, Antinori S. Liver tests abnormalities with licensed antiviral drugs for COVID-19: a narrative review. *Expert Opin Drug Saf*. 2022; doi: 10.1080/14740338.2022.2160446.
- 33 Fialek B, Pruc M, Smereka J, Jas R, Rahnama-Hezavah M, Denegri A, et al. Diagnostic value of lactate dehydrogenase in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Cardiol J*. 2022; doi: 10.5603/CJ.a2022.0056.

34 Huang Y, Guo L, Chen J, Wu M, Zhang C, Liu Z, et al. Serum lactate dehydrogenase level as a prognostic factor for COVID-19: a retrospective study based on a large sample size. *Front Med (Lausanne)*. 2022; doi: 10.3389/fmed.2021.671667.

35 Terragni R, Morselli-Labate AM, Vignoli M, Bottero E, Brunetti B, Saunders JH. Is serum total LDH evaluation able to differentiate between alimentary lymphoma and inflammatory bowel disease in a real world clinical setting? *PLoS One*. 2016; doi: 10.1371/journal.pone.0151641

36 Naito E, Shimada R, Yuki M. Diagnostic utility of measuring lactate dehydrogenase levels and its isoenzyme activities for the evaluation of malignancy in feline pleural effusion and ascitic fluid. *Open Vet J*. 2022; doi: 10.5455/OVJ.2022.v12.i5.19.

37 Lee YJ, Chan JP, Hsu WL, Lin KW, Chang CC. Prognostic factors and a prognostic index for cats with acute kidney injury. *J Vet Intern Med*. 2012; doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00920.x.

38 Romanelli P, Paltrinieri S, Bonfanti U, Castaman MG, Monza E, Bertazzolo W. Utility of the ratio between lactate dehydrogenase (LDH) activity and total nucleated cell counts in effusions (LDH/TNCC Ratio) for the diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP). *Animals*. 2022; doi: 10.3390/ani12172262.

39 Zoia A, Slater LA, Heller J, Connolly DJ, Church DB. A new approach to pleural effusion in cats: markers for distinguishing transudates from exudates. *J Feline Med Surg*. 2009; doi: 10.1016/j.jfms.2009.04.005.

40 Mon Hla H, Hunprasit V, Siripoonsup J, Rungsipipat A, Radtanakantikanon A. Diagnostic utility of LDH measurement for determining the etiology of modified transudate pleural effusion in cats. *Front Vet Sci*. 2022; doi: 10.3389/fvets.2022.1044192.

41 Paltrinieri S. The feline acute phase reaction. *Vet J*. 2008; doi: 10.1016/j.tvjl.2007.06.005.

42 Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, Paltrinieri S. Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J*. 2004; doi: 10.1016/s1090-0233(03)00055-8.

43 Hazuchova K, Held S, Neiger R. Usefulness of acute phase proteins in differentiating between feline infectious peritonitis and other diseases in cats with body cavity effusions. *J Feline Med Surg*. 2017; doi: 10.1177/1098612X16658925.

44 Para O, Caruso L, Pestelli G, Tangianu F, Carrara D, Maddaluni L, et al. Ferritin as prognostic marker in COVID-19: the FerVid study. *Postgrad Med*. 2022; doi: 10.1080/00325481.2021.1990091.

45 Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*. 2010; doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.009.

46 Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020; doi: 10.1038/s41591-020-1051-9.

47 Takano T, Hohdatsu T, Hashida Y, Kaneko Y, Tanabe M, Koyama H. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* 2007; doi: 10.1016/j.vetmic.2006.08.033.

48 Mortaz E, Bassir A, Roofchayee ND, Dezfuli NK, Jamaati H, Tabarsi P, et al. Serum cytokine levels of COVID-19 patients after 7 days of treatment with Favipiravir or Kaletra. *Int Immunopharmacol.* 2021; doi: 10.1016/j.intimp.2021.107407.

49 Mulligan AJ, Browning ME. Quality assessment and characterization of unregulated antiviral drugs for feline infectious peritonitis: implications for treatment, safety, and efficacy. *Am J Vet Res.* 2024; doi: 10.2460/ajvr.23.10.0221.

50 Kent AM, Guan S, Jacque N, Novicoff W, Evans SJM. Unlicensed antiviral products used for the at-home treatment of feline infectious peritonitis contain GS-441524 at significantly different amounts than advertised. *J Am Vet Med Assoc.* 2024; doi: 10.2460/javma.23.08.0466.