

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

Verbreitung des caninen Herpesvirus (CHV-1)  
und des Canine Minute Virus (CnMV) unter Zuchthunden in  
Deutschland und Untersuchungen zur prokaryotischen  
Genexpression des Virusprotein 2 von CnMV

Inaugural-Dissertation

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

eingereicht von

Jill Manteufel

aus Berlin

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen  
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Axel Wehrend  
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hartwig Bostedt  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz  
Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen

Tag der Verteidigung: 23. Mai 2006

*„Be proud of yourself at the end of your life.”*

Meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit

---

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1	Welpensterblichkeit .....	3
2.2	Minute Virus of Canines (CnMV) .....	5
2.2.1	Taxonomie der Parvoviren.....	5
2.2.2	Struktur/Eigenschaften autonomer Parvoviren.....	7
2.2.3	Genom und Virusproteine.....	8
2.2.4	Replikation autonomer Parvoviren .....	9
2.2.5	Epidemiologie .....	11
2.2.6	Pathogenese und Pathologie .....	12
2.2.7	Klinik .....	13
2.2.8	Diagnose .....	14
2.2.9	Prophylaxe .....	15
2.3	Canines Herpesvirus (CHV-1).....	16
2.3.1	Taxonomie, Klassifizierung der Herpesviren .....	16
2.3.2	Struktur und Eigenschaften.....	19
2.3.3	Genom.....	19
2.3.4	Infektionszyklus.....	21
2.3.5	Immunologie .....	22
2.3.6	Epidemiologie .....	23
2.3.7	Pathogenese und pathologisch-anatomische Veränderungen .....	26
2.3.8	Klinik .....	27
2.3.9	Diagnose .....	28
2.3.10	Prophylaxe .....	29
2.4	Arbeitsplan.....	30

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
3.1	Material .....	31
3.1.1	Chemikalien, spezielle Reagenzien .....	31
3.1.2	Marker .....	31
3.1.3	Antikörper und Enzyme .....	31
3.1.4	Puffer und Lösungen .....	32
3.1.5	Kits .....	33
3.1.6	Untersuchungsmaterial .....	33
3.1.7	Medien .....	34
3.1.8	Mikroorganismen .....	34
3.1.9	Oligonukleotide .....	35
3.1.10	Labormaterial .....	35
3.1.11	Geräte .....	36
3.1.12	Software .....	36
3.2	Methoden .....	37
3.2.1	Zellkulturverfahren .....	37
3.2.2	Viruskultur .....	38
3.2.3	Präparation viraler DNA .....	40
3.2.4	Diagnostische PCR .....	41
3.2.5	Gelelektrophorese .....	42
3.2.6	Klonierung .....	42
3.2.7	Genexpression .....	46
3.2.8	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	47
3.2.9	Proteinanalytik .....	48
3.2.10	Herstellung von Hyperimmunsereen .....	50
3.2.11	Serumneutralisationstest (SNT) .....	50
3.2.12	Indirekter Immunofluoreszenztest (IFT) .....	51
3.2.13	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen CnMV .....	51
3.2.14	Statistische Auswertung .....	52

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1	Virusanzucht .....	54
4.1.1	Virusvermehrung .....	54
4.1.2	Virusaufreinigung .....	56
4.2	Herstellung von polyklonalen Antikörpern im Kaninchen.....	57
4.2.1	Immunisierung und Gewinnung des Blutes.....	57
4.2.2	Titerbestimmung .....	58
4.2.3	Einsatz der Hyperimmunseren in ELISA und Western Blot .....	58
4.3	Sensitivität und Spezifität der diagnostischen PCR.....	59
4.4	Untersuchung des Probenmaterials.....	60
4.4.1	Untersuchung Organproben .....	60
4.4.2	Untersuchung Spermaproben.....	60
4.4.3	Untersuchung Kotproben .....	62
4.4.4	Untersuchung Tupferproben .....	62
4.5	Herstellung des rekombinanten VP2 von CnMV .....	62
4.5.1	Klonierung des VP2-Gens von CnMV .....	62
4.5.2	Induktionskinetik .....	65
4.5.3	Expression des rekombinanten CnMV-VP2.....	65
4.5.4	Proteinaufreinigung .....	66
4.6	Serumneutralisationstest (SNT).....	69
4.6.1	Untersuchungen zum Zusatz von Komplement.....	69
4.6.2	Untersuchung der Seren.....	69
4.7	Indirekte Immunofluoreszenz .....	74
4.8	Analyse der Riskofaktoren.....	76
4.8.1	Geschlecht.....	76
4.8.2	Rasse .....	77
4.8.3	Alter .....	78
4.8.4	Zwingergröße.....	78
4.8.5	Ausstellungsbesuche .....	79
4.8.6	Fruchtbarkeitsstörungen.....	80

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
5.1	Seroprävalenz von CHV-1 .....	82
5.2	Seroprävalenz von CnMV .....	86
5.3	Risikofaktoren.....	86
5.4	Prokaryotische Expression von VP2.....	88
5.5	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen CnMV .....	91
5.6	Direkter Nachweis von CHV und CnMV .....	92
5.7	Abschließende Bewertung und Ausblick.....	94
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>

**Anhang**

**Tabellenverzeichnis**

**Abbildungsverzeichnis**

**Danksagung**

---

## Abkürzungsverzeichnis

a	Adenin
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Cytosin
CnMV	canine Minute Virus (synonym Minute Virus of Canines)
cpE	cytopathischer Effekt
CsCl	Cäsiumchlorid
ct	cytotoxisch
Cy2	Carbocyanin 2
DMEM	Dulbeco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DSH	Deutscher Schäferhund
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAIC	Freund's Adjuvans incomplete
fg	Femtogramm = $10^{-15}$ g
FITC	Fluorescin-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	als Massenangabe : Gramm als Zentrifugalkraft: Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )



## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Guanin
h	Stunde
His-Tag	Hexahistidin-Ende an einem Protein
HPO	Meerestichperoxidase <i>horseradish peroxidase</i>
IFT	Immunofluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G
ITR	inverted terminal repeats
J	Jahr(e)
kb	Kilobasen
kDA	Kilo-Dalton
log	Logarithmus, logarithmisch
M	Molar
nm	Nanometer
m	männlich
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
min	Minuten
ml	Milliliter
NP1	Nichtstrukturprotein des Canine Minute Virus
NS1	Nichtstrukturprotein 1
MOI	Infektionsmultiplizität ( <i>multiplicity of infection</i> )
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (Leserahmen)
p.i.	post infectionem
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PLZ	Postleitzahl
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>round per minute</i> )
RT	Raumtemperatur

## Abkürzungsverzeichnis

---

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNT	Serumneutralisationstest
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
t	Thymin
Tgb.Nr	Tagebuchnummer
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
VI	Virusisolierung
VP1	Virusprotein 1
VP2	Virusprotein 2
VP3	Virusprotein 3
w	weiblich
w/v	Gewicht pro Volumen
WHWT	West Highland White Terrier
WRCC	Walter Reed Canine Cell

## 1 Einleitung

Die Gesunderhaltung von Hunden und ihren Nachkommen gehört zu den wesentlichen Aufgaben der tierärztlichen Kunst. Probleme in diesem Bereich wie Fruchtbarkeitsstörungen und Welpensterblichkeit werden in enger Zusammenarbeit mit betroffenen Züchtern seit mehreren Jahren in verschiedenen Ländern intensiv untersucht. Der Tod einzelner Welpen oder des gesamten Wurfes ist für den Züchter nicht nur eine starke emotionale Belastung, sondern bedeutet auch immer einen finanziellen Verlust und einen Rückschlag für den bisherigen Züchterfolg.

Die Welpensterblichkeit wird in verschiedenen Studien (ANDERSON 1957; FOX 1963; SAGER u. REMMERS 1990; WIDMANN-ACANAL 1992; NIELEN et al. 1998) mit 6-34 % angegeben. Zuverlässige Daten, die eine Beurteilung der aktuellen Situation ermöglichen, sind aufgrund ungenauer Angaben und der geringen Anzahl toter Welpen, die tatsächlich untersucht werden können, kaum verfügbar. Der Anteil der infektiösen Ursachen an der Welpensterblichkeit ist daher weitgehend unbekannt. Zwei Virusinfektionen scheinen hier aber eine wesentliche Rolle zu spielen: das canine Herpesvirus 1 und das canine Parvovirus Typ 1.

Die wohl bei Züchtern und Tierärzten bekannteste Virusinfektion im Zusammenhang mit dem Auftreten von Welpenverlusten ist eine Infektion mit dem caninen Herpesvirus. Die Ausprägung einer Infektion hängt von der Infektionsroute, dem Trächtigkeitsstadium, dem Zeitpunkt der Infektion sowie der zellulären und humoralen Immunantwort des Hundes ab. Für den erwachsenen Hund ist die Infektion mit dem caninen Herpesvirus ungefährlich. Umso schwerwiegender sind die Auswirkungen einer Infektion für den Welpen. Die Welpen infizieren sich auf unterschiedlichen Wegen. Bei einer Infektion vor der Geburt im Mutterleib sterben die Embryonen ab, werden resorbiert oder es kommt zum Abort. Erfolgt eine Infektion gegen Ende der Trächtigkeit, werden lebensschwache Welpen geboren. Die meisten Welpen stecken sich jedoch während der Geburt beziehungsweise kurz danach mit dem caninen

Herpesvirus an. Während der Passage des Geburtsweges haben die Welpen Kontakt mit Sekreten in der Scheide, die das Virus enthalten können.

Doch auch durch Nasen- und Rachensekrete der Mutter infizieren sich die Welpen in den ersten Stunden ihres Lebens. Durch den engen Kontakt mit den Wurfgeschwistern und stetiges Belecken der Mutter verbreitet sich das Virus schnell von einem Welpen zum anderen. Die Welpen erkranken meist in den ersten drei Lebenswochen. Sie zeigen Durchfall, Nasenausfluss, Bauchschmerzen, Saugunlust und anhaltendes Wimmern, beziehungsweise Schreien.

Das zweite Virus, das bei erhöhten Welpenverlusten eine Rolle spielen kann und bisher einen geringen Bekanntheitsgrad besitzt, ist das Canine Minute Virus (CnMV, synonym canines Parvovirus Typ 1). Entdeckt wurde CnMV 1967 (BINN et al. 1970). Die Bezeichnung "minute", auf deutsch klein, erhielt es wegen seiner im Vergleich zu anderen Viren geringen Größe. Die Zusatzbezeichnung Typ 1 wurde nötig zur Unterscheidung von dem später entdeckten caninen Parvovirus Typ 2. Bei erwachsenen Tieren verläuft die Infektion meist unauffällig. Infektionen während der Trächtigkeit können zu Fruchtresorption, Aborten, Missbildungen und der Geburt lebensschwacher Welpen führen (CARMICHAEL 1987; CARMICHAEL et al. 1991). Infizierte Welpen sind apathisch, zeigen Saugunlust, haben Atemwegsprobleme und leiden oft auch unter Durchfall. Plötzliche Todesfälle infolge einer Herzmuskelentzündung treten ebenfalls auf. Das Canine Minute Virus wurde in Deutschland 1996 bei einer Yorkshire-terrierhündin und ihrem Wurf beschrieben (TRUYEN et al. ).

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, folgende Fragen zu klären: Wie hoch ist der Anteil von CHV- und CnMV-bedingten Fruchtbarkeitsstörungen beim Hund? Wie hoch ist das Vorkommen von spezifischen Antikörpern gegen diese Viren bei Zuchthündinnen und Rüden in Deutschland, das heißt, wie weit sind diese Viren in unserer Hundepopulation verbreitet. Gleichzeitig war es das Ziel, den Nachweis von CnMV spezifischen Antikörpern im Labor durch die Entwicklung eines diagnostischen Tests basierend auf rekombinanten Virusantigen zu vereinfachen.

---

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Welpensterblichkeit

Der Begriff perinatale Welpensterblichkeit umfasst alle Todesfälle vom geburtsreifen Fetus bis zum 14. Lebenstag. Die Höhe der Welpenverluste hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab wie Wurfgröße, Alter, Aufzuchterfahrung der Mutter, Rasse, Haltung und Fütterung. Die Welpensterblichkeit wird in der Literatur (ANDERSON 1957; FOX 1963; SAGER u. REMMERS 1990; WIDMANN-ACANAL 1992; NIELEN et al. 1998) mit 6 bis 34 % der lebendgeborenen Welpen angegeben. Fünfzig bis siebzig Prozent der Welpenverluste werden durch infektiöse Faktorenerkrankungen hervorgerufen, deren Genese oft sehr komplex ist und sowohl infektiöse Ursachen als auch Managementfehler in Haltung und Zucht zusammenfasst (MAYR-BIBRACK 1982; SAGER u. REMMERS 1990; MUNNICH et al. 1995). Im englischsprachigen Raum wurde für diesen Sachverhalt der Begriff des Fading Puppy Syndroms geprägt. In Tabelle 1 sind wichtige Differentialdiagnosen zu Ursachenkomplexen zusammengefasst. Bakterielle Infektionen werden mit 50 bis 70 % am häufigsten nachgewiesen (SAGER u. REMMERS 1990; MUNNICH et al. 1995). Der Anteil der viralen Infektionen ist weitgehend unbekannt. Zwei Virusinfektionen scheinen hier eine wesentliche Rolle zu spielen: das canine Herpesvirus 1 und das canine Parvovirus Typ 1. Unter den nichtinfektiösen Ursachen spielt die Asphyxie oder auch neonatale Atemdepression eine besondere Rolle. Das toxische Milchsyndrom tritt ab dem 3. Lebenstag auf. Dabei gelangen bei Puerperalstörungen der Hündin toxische Zerfallsprodukte aus dem sich in Involution befindlichen Uterus in die Milch. Diese Toxine bewirken beim Welpen eine Hemmung der Darmperistaltik (EBEL 1984). Die Diagnose von Erkrankungen bei neonatalen Welpen ist schwierig, da verschiedene Krankheiten eine sehr ähnliche oder gleiche Symptomatik haben und die Blutentnahme für diagnostische Untersuchungen erschwert ist. Die klinische Allgemeinuntersuchung des kranken Welpen führt i.d.R. zu folgenden unspezifischen Befunden: Verhaltensänderungen wie Schreien, Wimmern, Apathie, Hypoxie, Hypo- oder Hyperthermie, respiratorische Symptome, Dehydration,

abdominaler Schmerz und Durchfall. Die Letalität ist 24 bis 48 h nach Auftreten der ersten Symptome am größten. Bei einem perakuten Krankheitsverlauf verstirbt der Welpe plötzlich, ohne vorherige Anzeichen klinischer Symptome. In einer Studie von NIELEN et al. (1998) über die Todesursachen von Boxerwelpen in den Niederlanden lag die Mortalität bis zum 50. Tag bei 21,7 %. Davon verstarben 47,1 % innerhalb der ersten drei Wochen.

**Tabelle 1: Übersicht Differentialdiagnosen Welpensterblichkeit**

perinatale Welpensterblichkeit	
nichtinfektiöse Ursachen	infektiöse Ursachen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anomalien/Missbildungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- teratogen</li> <li>- genetisch</li> </ul> </li> <li>• <b>prä- und postnatale Mangelernährung</b></li> <li>• <b>Verhaltensstörung Mutter</b></li> <li>• <b>Hypothermie/Hypoglykämie-Komplex</b></li> <li>• <b>Toxisches Milchsyndrom</b></li> <li>• <b>Früh-/Schwergewurt</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Neonatales Atemnotsyndrom/ Fruchtwasserrespiration</li> <li>- Traumen</li> <li>- geringes Geburtsgewicht</li> <li>- fehlerhafte Haltung/Stellung/Lage des Foeten</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bakterien</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Staphylokokken</li> <li>- Streptokokken, Typ G</li> <li>- hämolysierende <i>E.coli</i></li> <li>- Salmonellen</li> <li>- Klebsiellen</li> </ul> </li> <li>• <b>Viren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>-CHV-1</li> <li>- CnMV (canines Parvovirus Typ-1)</li> <li>- Rotaviren</li> <li>- canines Coronavirus</li> <li>- canines Parvovirus Typ-2</li> <li>- Staupevirus</li> <li>- Adenoviren</li> </ul> </li> <li>• <b>Parasiten</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ancylostoma caninum</li> <li>- Toxoplasmen</li> </ul> </li> </ul>

## 2.2 Minute Virus of Canines (CnMV)

Das Minute Virus of Canines (Canine Minute Virus, CnMV) oder synonym canines Parvovirus Typ-1 (CPV-1) wurde 1967 als erstes Parvovirus des Hundes aus dem Kot eines klinisch unauffälligen Schäferhundes, der auf einer amerikanischen Militärbasis in Deutschland stationiert war, isoliert. Anhand seiner biologischen und physikalischen Eigenschaften konnte es in die Familie der *Parvoviren* eingeordnet werden (BINN et al. 1970). Zunächst ließ sich dem isolierten Virus noch keine klinische Erkrankung zuordnen. Experimentelle Infektionen von Beaglen in den späten 80er Jahren führten jedoch zu transplazentaren Infektionen mit Fruchtsorption, insbesondere bei Infektion vor dem 30. d der Trächtigkeit (CARMICHAEL 1987; CARMICHAEL et al. 1991). Weitere Studien zeigten einen Zusammenhang mit Erkrankungen und Todesfällen von Welpen innerhalb der ersten drei Lebenswochen (CARMICHAEL et al. 1994). Bei Welpen und älteren Hunden mit Enteritis wurde CnMV ebenfalls isoliert.

1978 berichteten Tierärzte und Medien von einem neuen, sich weltweit rasant ausbreitendem, zweitem Parvovirus (CPV-2), das bei Hunden eine schwere blutige Durchfallerkrankung mit hoher Todesrate verursacht. Seit seiner Entstehung hat sich das Virus verändert und wurde mittlerweile durch neue antigene Typen (CPV-2a und CPV-2b) verdrängt. Beide Viren, CPV-1 und CPV-2, sind eigenständige Erreger, die sich genetisch und antigenetisch deutlich voneinander unterscheiden (MACARTNEY et al. 1988; MOCHIZUKI et al. 2002).

Das dritte beim Hund vorkommende Parvovirus ist das canine Adeno-assoziierte Virus, das jedoch klinisch unbedeutend ist (SUGIMURA u. YANAGAWA 1968).

### 2.2.1 Taxonomie der Parvoviren

Die *Parvoviren* lassen sich in zwei Subfamilien unterteilen: die *Parvovirinae* und die *Densovirinae*. Letztere kommen nur bei Invertebraten (Insekten, Garnelen und Krabben) vor und sollen deshalb an dieser Stelle nicht weiter erläutert werden. Einen Überblick über die taxonomische Einteilung der *Parvovirinae* gibt die Tabelle 2. Die Subfamilie der *Parvovirinae* besteht aus drei Genera und umfasst die Parvoviren der Vertebraten. *Dependoviren* können sich nur durch Koinfektion der Wirtszelle mit Adeno- oder Herpesviren, so genannten Helferviren, effizient replizieren (MCPHERSON et al. 1985). Diese Hilfe scheint sich eher indirekt durch Einflüsse der

frühen Genprodukte der Helferviren auf die Wirtszelle als direkt auf die parvovirale Replikation darzustellen. In Abwesenheit eines Helfervirus entwickelt sich eine latente Infektion, in deren Folge das virale Genom in das Wirtszellgenom integriert wird (BERNS et al. 1975; KOTIN et al. 1992). Die Mitglieder der beiden weiteren Genera *Erythrovirus* und *Parvovirus* replizieren sich dazu im Gegenteil ohne Hilfe anderer Viren und werden deshalb auch als autonome Parvoviren bezeichnet. Alle wichtigen tierpathogenen Parvoviren gehören zum Genus *Parvovirus*. Die Feline Panleukopenie (synonym Katzenseuche) ist eine schwere verlustreiche Erkrankung der Feliden, die durch Fieber, Durchfall, Erbrechen und Leukopenie gekennzeichnet ist. Neugeborene Kätzchen zeigen nach transplazentarer Infektion zentralnervöse Symptome, die als cerebelläre Ataxie bezeichnet werden. Die klassische Parvovirose des Hundes, verursacht durch das canine Parvovirus Typ-2, ist eine schwere hämorrhagische Gastroenteritis. Bei jungen Welpen, bei denen kein Schutz gegen CPV-2 besteht, kann sich eine Myokarditis entwickeln, die in den meisten Fällen durch die schwerwiegende Schädigung des Herzmuskels zum Tod des Welpen führt. Porzine Parvoviren verursachen Fruchtbarkeitsstörungen bei der Sau in Form von Fruchttod mit nachfolgender Resorption oder Mumifikation. Erwachsene Sauen erkranken nach einer Infektion nicht. Neuere molekularbiologische Untersuchungen zeigen, dass das bovine Parvovirus Typ 1 und das Aleutian Mink Disease Virus jeweils eigenständige Genera sind (OHSHIMA et al. 2004; TATTERSALL 2006). Die Infektion des Rindes mit dem bovinen Parvovirus während der Trächtigkeit führt zum Fruchttod und beim neugeborenen Kalb zu schweren wässrigen Durchfällen. Beim erwachsenen Tier ist der Verlauf der Infektion inapparent.

CnMV wurde in das Genus *Bocavirus* eingeordnet, da es mit 43 %iger Sequenzhomologie am engsten verwandt mit dem bovinen Parvovirus Typ-1 ist, gefolgt von B19 als nächsten Verwandten (SCHWARTZ et al. 2002).

Das Genus *Erythrovirus* beinhaltet das einzige bekannte humanpathogene Parvovirus B19. Charakteristisch und namensgebend für diesen Genus ist der ausgeprägte Tropismus zu Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen. Die Infektion mit B19 verursacht beim Menschen Ringelröteln (*Erythema infectiosum*, engl. Fifth Disease), Arthritis, chronische Anämien, Hydrops fetalis und möglicherweise Myokarditiden.



**Tabelle 2: Taxonomie der Parvoviridae\***

Subfamilie	Genus	Spezies	Wirt
Parvovirinae	Parvovirus	Canine Parvovirus	Hund
		Feline Parvovirus	Katze
		Raccoon Parvovirus	Waschbär
		Mink enteritis virus	Nerz
		Porzine Parvovirus	Schwein
		Mice minute virus	Maus
		LuIII Parvovirus	Maus
		Kilham rat virus	Ratte
	Erythrovirus	B19 Parvovirus	Mensch
		Simian Parvovirus	Affe
	Dependovirus	Canine Adeno-associated Virus	Hund
		Adeno-associated Virus 1-5	Mensch
		Goose Parvovirus	Gans
Amdovirus	Aleutian mink disease virus	Nerz	
Bocavirus	Bovine Parvovirus Typ 1	Rind	
	Canine Minute Virus	Hund	
Densovirinae	Densovirus	Junonia coenia Densovirus	Schmetterling
	Iteravirus	Bombyx mori Densovirus	Seidenspinner
	Brevidensovirus	Aedes aegypti Densovirus	Stechfliege
	Pefudensovirus	Periplaneta fuliginosa Densovirus	Schabe

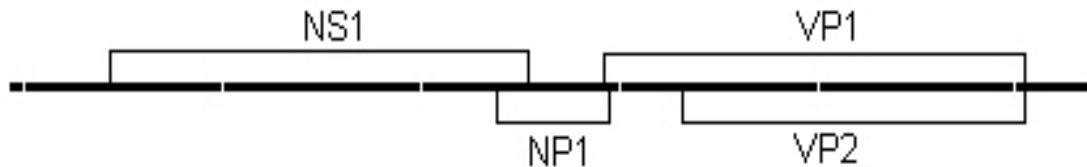
\* modifiziert nach Bücher-Osmond, C., ICTVdB : The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2005 und TATTERSALL 2006

### 2.2.2 Struktur/Eigenschaften autonomer Parvoviren

Die parvoviralen Viruspartikel besitzen ein aus 60 Kapsidproteinen bestehendes unbehülltes ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 18-26 nm, das ein einzelsträngiges DNA-Genom aus etwa 5097 bp enthält. Die Struktur des Virions ist mittlerweile für verschiedene Parvoviren mittels Röntgen-Kristallstrukturanalyse sehr gut untersucht (AGBANDJE et al. 1993; SIMPSON et al. 2002; KAUFMANN et al. 2004). Bei den meisten Parvoviren ist die einzelsträngige DNA komplementär zur viralen mRNA .

Die Virionen haben eine hohe Tenazität. Parvoviren sind resistent gegenüber Alkohol- und Chloroformbehandlung, Erhitzung auf 56 °C bis zu einer Stunde sowie pH-Werten zwischen 3 und 9. Das Virus wird durch Behandlung mit Formalin, Natronlauge, Glutaraldehyd,  $\beta$ -Propiolakton oder Hydroxylamin inaktiviert. Das komplette Virion von CnMV hat in CsCl eine Dichte von 1,40 – 1,44 g/cm<sup>3</sup> (MACARTNEY et al. 1988).

Einige Parvoviren haben onkosuppressive Eigenschaften, die zur Zeit im Hinblick auf eine mögliche Anwendung rekombinanter Parvoviren in der Therapie von Krebs genauer erforscht werden (CORNELIS et al. 2004; LANG et al. 2005).



**Abbildung 1: Genomstruktur von CnMV und Lokalisation der Open Reading Frames**

Den ORF's sind die zugehörigen Transkriptionsprodukte schematisch zugeordnet. Der Abstand zwischen den weißen Unterbrechungen auf dem Genomstrang beträgt 1000 bp. Der ORF von NP1 überlappt sowohl mit Nichtstrukturprotein 1(NS1) als auch auf einer Länge von 17 bp mit dem Virusprotein 1 (VP1).

### 2.2.3 Genom und Virusproteine

Der Aufbau des Genoms von CnMV ist typisch für Parvoviren. Die Gesamtgenomlänge beträgt 5390 bp (SCHWARTZ et al. 2002). Terminal befinden sich palindromische Sequenzabschnitte von 150 und 160 Basen, die als ITR-Regionen (*engl. inverted terminal repeats*) bezeichnet werden (ASTELL et al. 1985). Die Enden sind dadurch in der Lage, sich zu doppelsträngigen T- bzw. Y-förmigen Sekundärstrukturen, die auch als Haarnadelschleifen bezeichnet werden, zusammenzulagern und werden zur Replikation und Verpackung der DNA benötigt. Auf der rechten Seite codiert ein großer Leserahmen (Open Reading Frame, ORF) für das Nichtstrukturprotein NS-1. Daran schließt sich teilweise überlappend ein kleiner ORF an, der äquivalent zum NP-1 Protein des bovinen Parvovirus ist. Die Funktion des NP-1 Proteins bei CnMV ist unklar. Die rechte Hälfte des Genoms codiert für die Kapsidproteine VP1 (Virusprotein 1) und VP2 (Virusprotein 2). Das Virusprotein 3 (VP3) entsteht durch proteolytische Spaltung von VP2 in reifen infektiösen Partikeln. Mit einem Anteil von 90-95 % ist VP2 das Hauptprotein des Kapsids. Die Molekulargewichte der viralen Proteine von CnMV ähneln denen anderer Parvoviren und sind in Tabelle 3 aufgeführt (SCHWARTZ et al. 2002). VP1 kommt zu ca. 5 % im Kapsid vor. VP1 und VP2 sind bis auf einen aminoterminalen Bereich von 132 Aminosäuren identisch. Dieser Bereich wird als VP1 unique region bezeichnet. Durch die exponierte Lage von VP2 und VP1 an der Partikeloberfläche sind beide Proteine wichtige Angriffsziele für die Immun-

abwehr des Wirtes. Die bei vielen Parvoviren konservierte Region innerhalb der VP1 unique region mit Phospholipase-A2-Aktivität konnte auch im Genom von CnMV nachgewiesen werden. Die Phospholipase A2 ist von Bedeutung für die Infektion der Zelle und hat Funktion im Signaltransduktionsprozess. Das NS-1 Protein ist essentiell für die Virusreplikation und ist innerhalb der Parvoviren hochkonserviert. NS-1 besitzt u. a. sequenzspezifische Endonuklease- und eine ATP-abhängige DNA-Helikaseaktivität, wirkt als Aktivator viraler Promotoren und initiiert die Transkription viraler Strukturproteine. NS1 ist ein zur Oligomerisation befähigtes Phosphoprotein (NUESCH u. TATTERSALL 1993). NS1 ist hauptsächlich für die virusvermittelte Zytotoxizität verantwortlich.

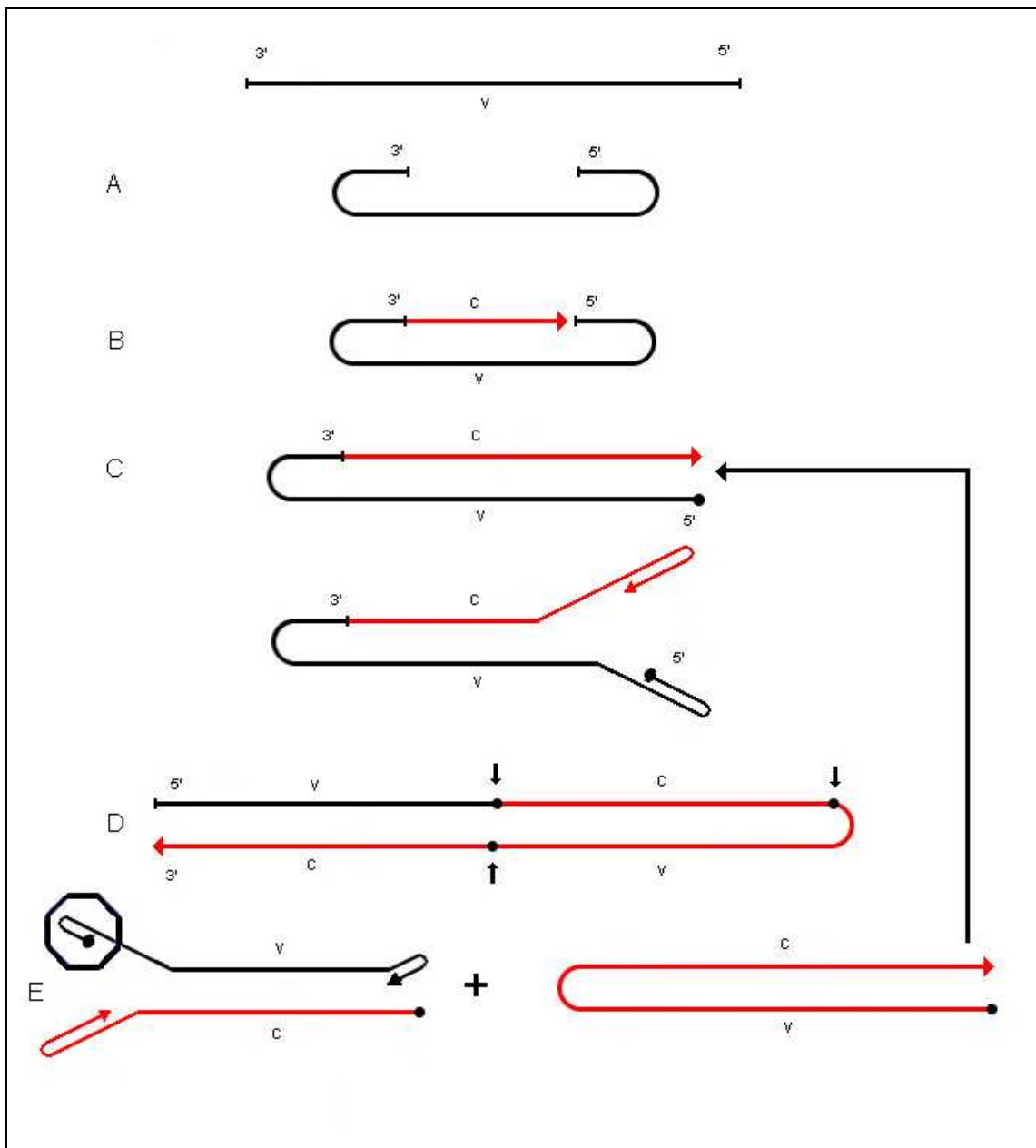
**Tabelle 3: Molekulargewichte der viralen Proteine von CnMV**

Protein	NS1	VP1	VP2	VP3	NP1
kDa	81,9	78,9	67 und 63	61	21,7

(SCHWARTZ *et al.* 2002)

#### 2.2.4 Replikation autonomer Parvoviren

Die Replikation der parvoviralen DNA findet nur im Zellkern von sich in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen statt. Während der S-Phase werden eine Reihe von zellulären Faktoren exprimiert, die für den Start und den Ablauf der viralen Replikation benötigt werden (COTMORE u. TATTERSALL 1987). In Abbildung 2 ist die Replikation autonomer Parvoviren schematisch dargestellt (BERNS 1990; COTMORE u. TATTERSALL 1995). Ausgangspunkt der Replikation der einzelsträngigen DNA sind die ITR-Sequenzen an beiden Genomenden. Palindromische Sequenzen an den Genomenden führen zu doppelsträngigen Haarnadelstrukturen (*hairpin*), die namensgebend für den Replikationsmechanismus (*rolling hairpin mechanism*) sind. Das 3'-OH-Ende der gebildeten Haarnadelschleife dient dabei der zellulären DNA-Polymerase als Primer (COSSONS *et al.* 1996). Durch fortschreitende Einzelstrangverdrängungssynthese bilden sich Dimere und Tetramere. Das NS1 Protein hat bei der Verdrängungssynthese ATP-abhängige Helikase-Funktion und spaltet mit ihrer Nukleaseaktivität monomere Genome ab, an deren 5'-Ende je ein NS1 kovalent gebunden bleibt (COTMORE u. TATTERSALL 1989).



**Abbildung 2: Rolling Hairpin -Modell der Replikation Autonomer Parvoviren. Modifiziert nach COTMORE und TATTERSALL (1987).**

A : Ausbildung von Haarnadelschleifen an den Genomenden. B : Initiation der DNA-Synthese beginnend am 3'-Ende. C : Auffaltung durch Verdrängung des 5'-Endes durch fortschreitende Synthese (engl. displacement synthesis) und Elongation (engl. gap fill synthesis); Restrukturierung der Haarnadelenden. D : NS-1 bindet an replizierte DNA und trennt monomere Virusgenome ab. E : Verpackung der Minusstränge in vorgefertigte Kapside. c: zur ss DNA Genom komplementärer Strang; v: ss DNA Minusstrang. Die Pfeile zeigen auf die Binde- und Schnittstelle des NS1-Proteins auf dem Virusgenom. Im weiteren Verlauf ist das gebundene NS1 als schwarzer Punkt gekennzeichnet.

Die 3'-OH-Enden dienen als Ausgangspunkt für neue Replikationen. Die monomeren Genome interagieren mit Proteinen und werden in vorgefertigte leere Kapside verpackt. Die Freisetzung der Viruspartikel erfolgt durch Lyse der Wirtszelle. Der Verpackungsmechanismus ist dabei noch kaum untersucht. Bei den meisten Parvoviren wird hauptsächlich der zur RNA komplementäre Minusstrang verpackt. Das bovine Parvovirus, dem Canine Minute Virus am nächsten verwandt innerhalb der Parvoviren, bildet hier mit einem Anteil von nur 20 bis 30 % inkapsidierten Minussträngen eine Ausnahme.

### 2.2.5 Epidemiologie

Bisher konnte CnMV nur bei Caniden nachgewiesen werden. Seroepidemiologische Studien konnten zeigen, dass CnMV weltweit in den Hundepopulationen verbreitet ist. Die Inzidenz unter wilden Caniden ist nicht bekannt (STEINEL et al. 2001). BINN et al. (1970) konnte in kommerziell erhältlichen caninen Hyperimmunseren aus dem Jahre 1956 hohe Antikörpertiter nachweisen. Tabelle 4 stellt eine Zusammenfassung aller Arbeiten über die Seroprävalenz von CnMV mit Angabe der angewandten Methode dar. Die Seroprävalenz in den USA ist mit 50 bis 87,5 % sehr hoch. In Italien und der Türkei haben im Durchschnitt 13-24 % der Hunde Antikörper gegen CnMV. Dabei ist der Unterschied zwischen einzelnen Regionen in Italien groß. In Palermo sind 30,5 % der Hunde seropositiv, in Neapel 9,5 % (PRATELLI et al. 1998; RINALDO et al. 2000a). In Asien liegt der Anteil positiver Seren bei 5 bis 11 %.

Bisher gibt es außerhalb der USA nur wenige Fallberichte von neonataler Welpensterblichkeit, bei denen virologisch und serologisch CnMV nachgewiesen werden konnte (JARPLID et al. 1996; PRATELLI et al. 1999; MOCHIZUKI et al. 2002). Den bisher einzigen Fall einer CnMV-Infektion in Deutschland konnte TRUYEN (1996) im Zusammenhang mit einem Spätabort bei einer Yorkshireterrier-Hündin dokumentieren. Die Übertragung des Virus erfolgt bei einer natürlichen Infektion hauptsächlich oronasal. Die Ausscheidung erfolgt mit dem Kot zwischen dem 4. und 8. d p.i. (CARMICHAEL et al. 1991; CARMICHAEL et al. 1994). CnMV wurde sowohl bei Hunden mit mildem Durchfall, aber auch im Kot von Tieren nachgewiesen, die klinisch völlig gesund erschienen (EUGSTER u. NAIRN 1977; CARMICHAEL et al. 1980). Die Infektion mit CnMV verläuft wahrscheinlich in vielen Fällen subklinisch. Acht Wo-

chen alte Welpen erkrankten nach experimenteller Infektion nicht. In der Sektion konnten makro- und mikroskopisch keine Läsionen festgestellt werden (CARMICHAEL 1987). Erfolgt eine Infektion mit CnMV zwischen dem 25. und 35. Trächtigkeitstag, kommt es zu fetalem Tod mit Fruchtresorption, Totgeburten oder der Geburt lebensschwacher Welpen.

**Tabelle 4: Seroprävalenz von CnMV**

Land	Autor	Proben	Test	Seroprävalenz
USA	(BINN et al. 1970)	27 Seren	HI /SNT	79,4 %
	(SIEGL 1976)		HI	70 %
	(MACARTNEY et al. 1988)	80 Seren	HI	89,7 %
	(CARMICHAEL et al. 1991)		HI	< 30 bis >70 %
	(CARMICHAEL et al. 1994)	1008 Seren	HI	47,0 %
Japan	(MOCHIZUKI et al. 2002)	238 Seren	HI	5 %
	(HASHIMOTO et al. 2001)	226 Seren	HI	15,4 %
Korea	(JANG et al. 2003)	314 Seren	HI	11,8 %
Türkei	(TORUN u. YILMAZ 2005)	100 Seren	IF	18,0 %
Italien	(RINALDO et al. 2000a)	211 Seren	IF	24,17 %
	(PRATELLI et al. 1998)	446 Seren	IF/SNT	13,6 %

*HI – Hämagglutinations Inhibitionstest, IF – indirekte Immunofluoreszenz, SNT - Serumneutralisationstest*

### 2.2.6 Pathogenese und Pathologie

Es fehlen Studien zur Pathogenese. DECARO et al. (2002) und TORUN und YILMAZ (2005) vermuten jedoch, dass die Reduktion der monozytären Phagozytose mit der Folge einer Immunsuppression eine Bedeutung in der Pathogenese von CnMV hat und ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung von Sekundärerkrankungen beim Hund ist.

Nach oronasaler Aufnahme ist CnMV vom 1. bis 3.d der Infektion im Blut nachweisbar (CARMICHAEL et al. 1991). Während dieser Phase der Virämie breitet sich das Virus im ganzen Körper aus. CnMV benötigt wie alle Parvoviren mitotisch aktive Wirtszellen um sich vermehren zu können. Die Replikation der Parvoviren führt zum Absterben der Zelle. Als Ausdruck einer Virusvermehrung lassen sich postmortal vor allem an der Lunge, dem Dünndarm und den Organen des lymphatischen Systems nekrotisch entzündliche Veränderungen feststellen. Die Veränderungen in der Lunge entsprechen

histopathologisch einer interstitiellen Pneumonie, die durch Hypertrophie und Hyperplasie der Alveolarzellen charakterisiert ist. Der Thymus, die Milz und die Körperl lymphknoten sind ödematisiert, nekrotisch und mit Entzündungszellen infiltriert. Nach experimentellen Infektionen konnte das Virus in hohen Titern erfolgreich aus Thymus, Milz, Ileum und Lymphknoten reisoliert werden (MACARTNEY et al. 1988).

Im Dünndarm, v.a. in Duodenum und Jejunum, kommt es zu einer akuten Enteritis mit Epitelzellhyperplasie. An der Zottenspitze lässt sich in den Zellkernen der Epithelzellen mittels Immunofluoreszenz Virusantigen nachweisen (CARMICHAEL et al. 1994; TRUYEN et al. 1996; JARPLID et al. 1996). Die Peyer'schen Platten und die Darmlymphknoten sind nekrotisch verändert. Als deutliches Unterscheidungsmerkmal zur klassischen Parvovirose, bei der vor allem die Darmkrypten nekrotische Läsionen aufweisen, sind bei einer Infektion mit CnMV die Krypten bis auf einzelne nekrotische Zellen nahezu unverändert (CARMICHAEL et al. 1994; JARPLID et al. 1996).

In allen veränderten Bereichen sind mikroskopisch basophile oder azidophile intranukleäre Einschlusskörperchen nachzuweisen. Im Darm befinden sich die Einschlusskörperchen vor allem in den Spitzen der Darmvilli.

JARPLID et al. (1996) berichtet von 2 Todesfällen in einem Wurf von 5 Miniatur Schnauzer, die eine nichteitrigte Myokarditis aufwiesen.

In experimentellen Infektionen, die Fruchtresorptionen zur Folge hatten, wurden bei der späteren histopathologischen Untersuchung der Plazenta fokale nekrotische Läsionen gefunden. Die endometrialen Endothelien zeigten fokale papilläre Hyperplasien (CARMICHAEL et al. 1991).

### **2.2.7 Klinik**

Bei erwachsenen Tieren verläuft die Infektion meist unauffällig ohne Auftreten klinischer Symptome. Experimentelle Studien konnten zeigen, dass oronasale und intravenöse Infektionen mit CnMV zwischen dem 25. und 35. Trächtigkeitstag zu Fruchtresorption, Aborten, Missbildungen und der Geburt lebensschwacher Welpen führen (MACARTNEY et al. 1988; CARMICHAEL et al. 1991). Infektionen bis zum 30. Tag der Trächtigkeit führten in allen Fällen zu embryonalem Fruchttod mit nachfolgender Resorption. Nach dem 30. Trächtigkeitstag sind die klinischen Auswirkungen einer Infektion variabel. Beobachtet werden: Fruchtresorption, Totgeburten,

Geburt lebensschwacher Welpen und/oder Welpen mit Anasarka und Myokarditis (CARMICHAEL et al. 1991).

Welpen, die sich in den ersten drei Lebenswochen infizieren, zeigen als klinische Symptome Dyspnoe, Saugunlust, Erbrechen und/oder Durchfall. Der Ausprägungsgrad der Symptome ist altersabhängig und variiert innerhalb eines Wurfes (CARMICHAEL et al. 1994; JARPLID et al. 1996). Zwei von fünf Welpen zeigten am 5. Tag p.i. eine milde Dyspnoe nach oronasaler Infektion am 5. Lebenstag. Ein Welpen musste aufgrund von Saugunlust mit nachfolgender Dehydratation und komatösem Zustand euthanasiert werden.

Bei zwei 35 Tage alten Schäferhundwelpen waren respiratorische Symptome die einzigen klinischen Befunde (PRATELLI et al. 1999). Plötzliche Todesfälle treten in Verbindung mit einer viralen Myokarditis auf.

Welche Faktoren bei der Entstehung klinischer oder subklinischer Infektionen und dem Ausprägungsgrad der Symptome eine Rolle spielen, ist nicht bekannt.

### **2.2.8 Diagnose**

Die Diagnose einer CnMV Infektion bei Welpensterblichkeit kann in den meisten Fällen nur postmortal gestellt werden. Der direkte Virusnachweis ist mittels Virusisolierung, PCR, Immunfluoreszenz und Hämagglutination möglich. WRCC 3873-D Zellen galten lange Zeit als die einzige permissive permanente Zelllinie, die für die Isolierung und Vermehrung von CnMV genutzt werden konnte. Bei MOCHIZUKI et al. (2002) war die Virusisolierung von CnMV mit Ausbildung eines cpE in MDCK Zellen erfolgreich. CnMV vermehrt sich auch in primären fetalen Hundezellen aus der Lunge, jedoch nicht aus der Haut (CARMICHAEL et al. 1991).

HASHIMOTO (1999) entwickelt für den routinemäßigen Nachweis von CnMV im Labor die in situ-Hybridisierung (ISH). Der indirekte Nachweis einer Infektion mit CnMV ist durch den Nachweis spezifischer Antikörper möglich. Testmethoden, die in der Literatur zum Antikörpernachweis beschrieben werden, sind der indirekte Hämagglutinationstest und der indirekte Immunfluoreszenztest. CnMV agglutiniert ausschließlich die Erythrozyten von Rhesusaffen und Grünen Meerkatzen bei einer Temperatur von 4 °C und pH-Werten zwischen 5,5 und 6,2. BINN et al. (1970) und



MACARTNEY et al. (1988) empfehlen, den Titer der Virussuspension vor dem Einsatz im Hämagglutinationshemmungstest durch Ultrazentrifugation oder durch Erhitzung bei 56 °C für 20 min aufzukonzentrieren. HASHIMOTO et al. (2001) klassifiziert Seren mit einem HI-Titer  $\geq 1:40$  als seropositiv. Kommerzielle Hyperimmunsereen zum Nachweis von CnMV sind nicht erhältlich.

### **2.2.9 Prophylaxe**

Die Diagnose CnMV Infektion wird i.d.R. post mortem gestellt. Durch die relativ unspezifischen Symptome und die hohe Letalität in den ersten drei Lebenswochen der Welpen nach Auftreten der ersten Symptome, ist eine symptomatische Therapie schwierig beziehungsweise wäre auch mit wenig Aussicht auf Erfolg. Eine Impfung gegen das Canine Minute Virus ist nicht möglich. Hunde, die im Rahmen einer jährlichen Impfung gegen die Parvovirose (CPV-2) geimpft werden, sind gegen CnMV aufgrund fehlender Kreuzimmunität nicht geschützt.

## 2.3 Canines Herpesvirus (CHV-1)

Anfang der 60er Jahre trat eine bis dahin unbekannte schwere systemische Erkrankung bei neugeborenen Welpen auf, die in vielen Fällen den Tod ganzer Würfe zur Folge hatte. Innerhalb eines Jahres isolierten und beschrieben drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander als Ursache dieses neu aufgetretenen Erkrankungsbildes das canine Herpesvirus (CARMICHAEL et al. 1965; SPERTZEL et al. 1965; STEWART et al. 1965). Beim erwachsenen Hund verläuft die Infektion mit dem caninen Herpesvirus mild bis subklinisch. Die Auswirkungen einer Infektion der Welpen in den ersten drei Lebenswochen sind jedoch fatal und enden meist tödlich. Bei der Zuchthündin kann eine Infektion zu Unfruchtbarkeit, zu einer Verminderung der Wurfgröße und der Geburt lebensschwacher Welpen führen. Für den Züchter bedeutet der Nachweis von CHV-1 im Zuchtbestand wirtschaftlicher Verlust und die Einhaltung umfassender zuchthygienischer Maßnahmen zur Eliminierung des Virus aus dem Bestand.

### 2.3.1 Taxonomie, Klassifizierung der Herpesviren

Der Name Herpesvirus leitet sich aus dem Griechischem von herpein (= kriechen) ab und weist auf die kriechende Ausbreitung des durch Herpes-Simplex-Viren beim Menschen verursachten Hautausschlages hin. Herpesviren sind in der Natur weit verbreitet und mit annähernd einhundert Spezies gehört diese Familie zu einer der größten Virusfamilien (ROIZMANN et al. 1992). Tierpathogene Herpesviren, die unter anderem als Erreger von Erkrankungen des Respirations- und Genitaltraktes zu teilweise großen finanziellen Verlusten in der Tierzucht und Landwirtschaft führen, sind die equinen Herpesviren Typ 1 bis 5, die bovinen Herpesviren Typ 1 bis 4, das porcine Herpesvirus 1 (SHV-1, Aujeszky'sche Krankheit), das porcine Cytomegalievirus (PCMV) beim Schwein und zwei Vertreter beim Geflügel, das infektiöse Laryngotracheitis-Virus (ILTV) und das Marek's-Disease-Virus (MDV). In Deutschland ist die Infektion mit dem bovinen Herpesvirus Typ 1 und die Aujeszky'sche Krankheit anzeigepflichtig. Ein charakteristisches Merkmal der Herpesviren ist die Ausbildung einer latenten Infektion. Durch Stress oder Immunsuppression kommt es zur Reaktivierung und Ausscheidung der Herpesviren mit oder ohne klinischer Manifestation. Aufgrund ihres biologischen Verhaltens werden Herpesviren in drei Subfamilien unterteilt:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesvirinae (siehe Tabelle 5).

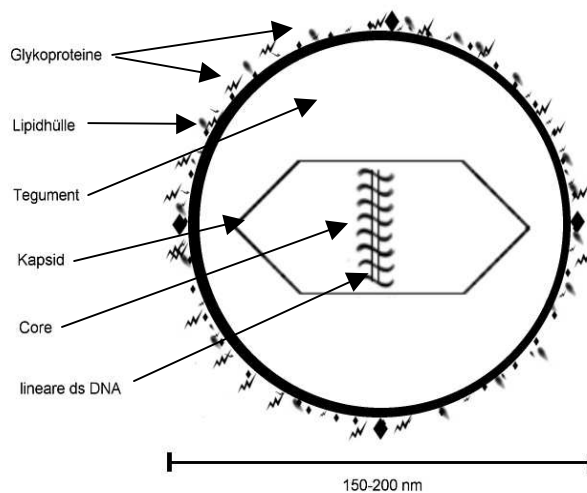
**Tabelle 5: Subfamilien der Herpesviridae und ihre biologischen Eigenschaften**

Eigenschaft	$\alpha$ -Herpesvirinae	$\beta$ -Herpesvirinae	$\gamma$ -Herpesvirinae
Wirtszellspektrum	weit	eng	eng
Replikation in vitro	schnell	langsam	unterschiedlich
cpE	Zellyse	Zellhyperplasie	unterschiedlich
Orte der Latenz	sensorische Ganglien	Speicheldrüsen, lymphoretikuläres Gewebe	B- und Lymphozyten

Die Subfamilien ihrerseits werden anhand der DNA-Sequenz, der Genomstruktur und der immunologischen Verwandtschaft bestimmter Virusproteine untereinander weiter unterteilt in verschiedene Genera (siehe Tabelle 6) (REMOND et al. 1996). Das canine Herpesvirus gehört zu den  $\alpha$ -Herpesvirinae. Später wurde durch vergleichende Sequenzanalysen von MC GEOCH et al. (1995) und READING und FIELD (1999) die Zugehörigkeit zum Genus Varizellovirus bestätigt. CHV-1 hat im Vergleich zu anderen Alphaherpesviren in vivo und in vitro ein relativ enges Wirtsspektrum. Das Virus wächst im Labor nur in Zellen caninen Ursprungs wie MDCK, NLDK oder A72. LEBICH et al. (1994) und MC GEOCH et al. (2000) beschreiben jedoch einen Plaque-reduktionstest mit NBL-/-Zellen (fetal mink lung cell). CHV-1 ist am nächsten verwandt mit dem Felinen Herpesvirus (FHV) und dem Phociden Herpesvirus, dem Herpesvirus der Seehunde (KIMBER et al. 2000).

**Tabelle 6: Charakteristische Vertreter der Herpesviren**

Unterfamilie	Genus	Spezies	Krankheit/Wirt
$\alpha$ -Herpesviren	Simplexvirus	Human herpesvirus 1	Herpes simplex (labialer Typ)
		Human herpesvirus 2	Herpes simplex (genitaler Typ)
		Bovine herpesvirus 2	Mamillitisvirus des Rindes
	Varizellovirus	Cercopithecine herpesvirus 1	Herpes-B-Virus, Affen
		Macropodid Herpesvirus	Känguruh
		Human herpesvirus 3	Varizella-Zoster
		Bovine herpesvirus 1	Infektiöse Bovine Rhinotracheitis, Rind
		Equine herpesvirus 1	Stutenabort, Pferd
		Equine herpesvirus 4	Rhinopneumonitis, Pferd
		Suid herpesvirus 1	Aujeszky'sche Krankheit, Schwein
		Canine herpesvirus	Hund
		Caprine herpesvirus	Ziege
		Feline herpesvirus	Rhinotracheitis, Katze
		Phocid herpesvirus	Seehund
		Cervid herpesvirus	Reh, Elch
Equine herpesvirus 3	Koitalexanthem		
Mardivirus	"Marek's disease-like viruses"	Marek'sche Krankheit, Geflügel	
Iltovirus	"Infectious laryngo-tracheitis-like viruses"	Infektiöse Laryngo-tracheitis, Geflügel	
$\beta$ -Herpesviren	Cytomegalovirus	Human herpesvirus 5	humanes CMV
		Porcine herpesvirus	Einschlusskörperchenrhinitis, Schwein
	Muromegalovirus	Murid herpesvirus 1	Maus
		Murid herpesvirus 2	Ratte
	Roseolovirus	Human herpesvirus 6	Exanthema subitum
		Human herpesvirus 7	Exanthema subitum, Enzephalitis
$\gamma$ -Herpesviren	Rhadinoviren	Alcephaline herpesvirus 1	Bösartiges Katarrhalfieber, Rind
	Lymphocryptoviren	Human herpesvirus 8	Epstein-Barr



**Abbildung 3: Struktur der Herpesvirionen**

In der die Virionen nach außen begrenzenden Hülle sind virale Glykoproteine eingelagert. Zwischen Kapsid und Hülle befindet sich das Tegument. Das Kapsid enthält die mit fibrillären Proteinen assoziierte lineare ds DNA.

### 2.3.2 Struktur und Eigenschaften

Der Durchmesser der behüllten Herpesvirionen variiert zwischen 150 und 200 nm. Der Kern (*core*) der Herpesvirionen bestehen aus der doppelsträngigen linearen DNA, die mit einer fibrillären Proteinmatrix assoziiert ist. Die DNA ist umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid, das einen Durchmesser von 100 bis 110 nm hat und aus 162 Kapsomeren, vornehmlich Hexameren, und einem Dutzend Pentameren besteht. Das Tegument ist eine asymmetrische amorphe Proteinmatrix, die den Bereich zwischen Kapsid und Hülle ausfüllt und deren Proteine in der frühen Phase des Infektionszyklus wichtige Funktionen übernehmen. In die Hülle sind bis zu zwölf Glykoproteine und eine Reihe nicht glykosilierter Proteine eingelagert, die wie Spikes nach außen ragen. Die Form der behüllten Viren erscheint, mit dem Kapsid als Zentrum, im Elektronenmikroskop spiegeleiförmig. In CsCl haben die Viruspartikel eine Dichte von 1,20-1,29 g/cm<sup>3</sup>. Herpesviren haben nur eine geringe Tenazität in der Umwelt und sind mittels einfacher Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen leicht zu inaktivieren. Eine Erhitzung über 4 min auf 56 °C führt ebenso wie eine Lagerung bei 37 °C für 22 h zur Inaktivierung des caninen Herpesvirus (THEBAULT 2004).

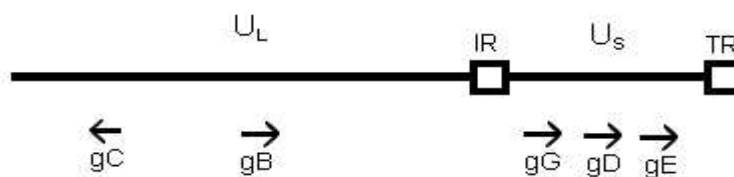
### 2.3.3 Genom

Die lineare doppelsträngige DNA des caninen Herpesvirus hat eine Gesamtlänge von 128 kb und kodiert für über 75 Proteine. Der GC-Gehalt variiert je nach Autor und betrachtetem Genomabschnitt zwischen 29,8 (REUBEL et al. 2002) und 38 % (MANNING et al. 1988).

Die DNA-Synthese erfolgt nach dem *Rolling Cycle*-Mechanismus. Dabei entsteht ein langer DNA-Strang, der aus mehreren Einheiten des Genoms zusammengesetzt ist und als Concatamer bezeichnet wird.

Die Sequenzen für die Gene der viralen Thymidinkinase, der Proteinkinase, der Glykoproteine gB, gC, gD, gG, gH, gI und gE sowie für Teile des Genoms in der  $U_s$  und  $U_L$  liegen durch die Arbeit mehrerer Arbeitsgruppen vor (LIMBACH et al. 1994; REMOND et al. 1995; REMOND et al. 1996; TYACK et al. 1997; REUBEL et al. 2002; YAMADA et al. 2005). Nach der von ROIZMANN (1996), basierend auf der Genomorganisation entwickelten Einteilung der Herpesviren in die Gruppen A bis F, gehört das canine Herpesvirus in die Gruppe D. Der schematische Aufbau des Genoms, das aus einer unique long ( $U_L$ ) und einer unique short ( $U_s$ ) Region besteht, die wiederum von sich repetitierenden Sequenzregionen flankiert wird, ist in Abbildung 4 dargestellt.

Aufgrund der Größe des Genoms und der milden klinischen Auswirkungen einer Infektion beim Hund eignet sich CHV-1 als lebende Vektorvakzine. So wurde ein rekombinantes canines Herpesvirus, bei dem das Gen für die virale Thymidinkinase durch das Glykoprotein gG des Tollwutvirus ersetzt wurde, Hunden intranasal appliziert. Der Titer gegen Tollwut war im Vergleich mit anderen klassischen Impfstoffen deutlich höher (XUAN et al. 1998). Kurze Zeit später gelang es NISHIKAWA et al. (2000), ein Neospora caninum-Protein exprimierendes rekombinantes Herpesvirus herzustellen, das die Bildung von spezifischen IgG-Antikörpern im Hund induzierte.



**Abbildung 4: schematischer Genomaufbau CHV-1**

Das Genom von CHV-1 ist in eine ca. 100 000 bp große unique long ( $U_L$ )- und eine 7400-8600 bp große unique short ( $U_s$ )-Region unterteilt. Die  $U_s$ -Region wird von zwei inversen Repetitionen, internal repeat (IR) und terminal repeat (TR), flankiert. Unterhalb des Genomstranges ist die Lokalisation und Orientierung ausgewählter Glykoproteine angegeben. Bedingt durch Rekombination können die  $U_s$ - und  $U_L$ -Region unterschiedliche Orientierung zueinander haben. Dadurch gibt es zwei Isoformen des Genoms, die zu gleichen Anteilen in den Virionen vorgefunden werden.

### 2.3.4 Infektionszyklus

Vertreter der  $\alpha$ -Herpesviren binden über die in der Hülle befindlichen Glykoproteine gB und/oder gC an Heparansulfat-Proteoglycane auf der Zelloberfläche (SHUKLA u. SPEAR 2001). Diese noch wenig spezifische und labile Bindung wird durch die Interaktion von gD mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche gefestigt. Innerhalb der Herpesvirusfamilie sind die für die Infektion der Zelle verwendeten Rezeptoren nicht einheitlich (SPEAR u. LONGNECKER 2003), gehören aber in vielen Fällen der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren und der Immunoglobulin-Rezeptorfamilie an. Nach der durch das Zusammenwirken von gB, gD und gH induzierten direkten Verschmelzung der viralen Hülle mit der Plasmamembran erfolgt der Transport des Kapsids zum Kern. Durch eine Kernpore gelangt die DNA in den Zellkern und zirkularisiert dort. Verläuft der Infektionszyklus lytisch, beginnt die Synthese der *immediate early* (IE oder  $\alpha$ )-Gene, deren Produkte die Transkription der *early* (E oder  $\beta$ )-Proteine steuern. Die *early* Proteine wiederum sind für die DNA-Replikation wichtig, schalten die zelleigene Proteinsynthese ab und regulieren die Bildung der *late* (L oder  $\gamma$ )-Proteine. Zu den späten Proteinen gehören vor allem Strukturproteine, die für die Bildung und den Zusammenbau des Virus im Zellkern wichtig sind.

Durch Knospung (*budding*) an der inneren Kernmembran erhalten die Partikel ihre Hülle. Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Reifung der Virionen, insbesondere durch Glykosylierung der Hüllproteine. Die Freisetzung der in Vesikeln akkumulierten Virionen erfolgt durch Exocytose über den Golgi-Apparat an der Zelloberfläche. Durch die Inanspruchnahme des gesamten Zellsynthesapparates zur Produktion der Viren stirbt die Zelle ab. Nach einer primären lytischen Infektion verbleibt das Virus lebenslang im Organismus, kann aber in Stresssituationen, durch Immunsuppression und andere Faktoren reaktiviert werden und es kommt zu einer temporären Ausscheidung von infektiösen Viren. Diese Eigenschaft aller Herpesviren wird als Latenz bezeichnet. Das Virus-DNA verbleibt in bestimmten Zellen des Wirtes nach Eindringen in den Zellkern in zirkularisierter Form als Episom. In der Phase der Latenz werden keine Virionen gebildet, die Wirtszelle überlebt. Durch die fehlende oder stark reduzierte Synthese viraler Proteine wird jedoch verhindert, dass infizierte Zellen durch das Immunsystem erkannt und bekämpft werden.

### 2.3.5 Immunologie

CHV-1 ist ein schwach immunogenes Virus, d. h. die Antikörperbildung im Wirt wird nur mäßig induziert. Für das Herpes-Simplex-Virus des Menschen konnte nachgewiesen werden, dass bei lokalen Formen auf der Haut und der Infektion des ZNS die zelluläre Immunantwort für die Bekämpfung und Elimination einer (Herpes-) Virusinfektion besonders wichtig ist (MANICKAN u. ROUSE 1995; ZINKERNAGEL et al. 1996).

Insgesamt gibt es sieben canine Herpesvirusproteine gegen die, wie im Western Blot nachgewiesen, Antikörper nach einer Infektion gebildet werden (TAKUMI et al. 1990). Drei der in die Plasmamembran eingelagerten viralen Glykoproteine sind Hauptangriffspunkt der Immunabwehr des Körpers für die Bildung neutralisierender Antikörper. In ihrer Eigenschaft, Komplement für die Virusneutralisation zu benötigen, unterscheiden sich die Antikörper. Der Zusatz von Komplement fördert beziehungsweise verstärkt die Bindung neutralisierender Antikörper gegen gB und gC. Die Neutralisation von gD und bestimmten Epitopen von gB erfolgt komplementunabhängig (XUAN et al. 1991). Für die Glykoproteine gB, gC und gD wurden die hauptimmunogenen Epitope durch Serien von monoklonalen Antikörpern näher charakterisiert. Die Antigenität ist abhängig von der Sekundär- und Tertiärstruktur der Glykoproteine (XUAN et al. 1991).

Nach einer Infektion dauert es zwei bis drei Wochen bis Antikörper nachgewiesen werden können. Die ersten Antikörper werden gegen gB (145/112 kDa) gebildet, gefolgt von gD (47 kDa) und gC (80 kDa) (XUAN et al. 1992). Maximale Antikörpertiter sind drei bis vier Wochen p.i. zu erwarten. Bei LUNDGREN und CLAPPER (1969) war der höchste im Serumneutralisationstest gemessene Titer 1:40. KOJIMA et al. (1990) dokumentiert bei einem Ausbruch von CHV-1 unter spezifisch pathogenfrei gehaltenen Beaglen durchschnittliche Antikörpertiter von 1:64-1:128. Dieser relativ geringe Anstieg der Antikörpertiter ist in der Literatur mehrfach beschrieben (PERCY et al. 1971; OKUDA et al. 1993).

Über die Dauer der Persistenz von Antikörpern im Blut sind die Angaben in der Literatur sehr widersprüchlich. EVERMANN (1989) gibt einen Zeitraum von 30 d an. OKUDA et al. (1993) konnte bei Verlaufsuntersuchungen nach experimentellen Infektionen bei allen untersuchten Hunden Antikörper in der 28. Woche p.i. nachweisen.



Die Titerhöhe blieb in den ersten zwei Monaten konstant, um dann langsam abzufallen. Ein Titer von 1:4 schützt Welpen vor einer Erkrankung nach oronasaler und intraperitonealer Infektion mit  $10^5$  TCID<sub>50</sub> (POULET u. DUBOURGET 1993).

Herpesviren haben die Fähigkeit, lebenslange latente Infektionen hervorzurufen. Das Virus kann sich in sensorische Ganglien des Nervensystems, geschützt vor der körpereigenen Immunabwehr zurückziehen. Eine Reaktivierung der Virusausscheidung ohne Anzeichen klinischer Symptome durch die Gabe von Prednisolon ist nachgewiesen worden. Bei erwachsenen Hunden ist dies verbunden mit einem Anstieg der Titerhöhe (OKUDA et al. 1993).

### 2.3.6 Epidemiologie

Das canine Herpesvirus weist ein limitiertes Wirtsspektrum auf, das sich wahrscheinlich ausschließlich auf Mitglieder der zoologischen Familie der Canidae beschränkt. Bei seroepidemiologischen Untersuchungen in Nordamerika konnten KIMBER et al. (2000) jedoch Antikörper gegen CHV-1 bei Ottern, die zur Familie der Marderartigen gehören, nachweisen. Neben dem caninen Herpesvirus gibt es noch das porcine Herpesvirus und das feline Herpesvirus, die beim Hund nachgewiesen wurden und klinische Bedeutung haben können (EVERMANN et al. 1982).

Der Hund kann sich über die Nahrung mit dem porcinen Herpesvirus-1 infizieren. Die Erkrankung verläuft akut bis perakut und endet ausnahmslos tödlich. Ein wichtiges Symptom der so genannten Pseudowut ist der ausgeprägte Juckreiz, der bis hin zur Automutilation führen kann. EVERMANN et al. (1982) konnte ein dem feline Herpesvirus ähnliches Herpesvirus aus dem Kot und postmortal aus dem mesenterialen Lymphknoten von an Durchfall erkrankten Junghunden isolieren.

Für den erwachsenen Hund ist die Infektion mit dem caninen Herpesvirus ungefährlich. Umso schwerwiegender sind die Auswirkungen einer Infektion bei den Welpen. Die oronasale Übertragung durch soziales Verhalten (Belecken, Beschnuppern) der Hunde untereinander ist der Hauptübertragungsweg zwischen erwachsenen Hunden. Auf welchem Weg sich die Feten im Mutterleib anstecken, ist noch nicht hinreichend geklärt. APPEL et al. (1969), CORNWELL und WRIGHT (1969), sowie LOVE und HUXTABLE (1976) konnten experimentell eine transplazentare Übertragung nachwei-

sen. Die meisten Welpen infizieren sich jedoch während der Geburt durch virushaltige Sekrete in der Scheide (FULTON et al. 1974).

Doch auch durch Nasen- und Rachensekrete der Mutter ist eine Infektion der Welpen in den ersten Stunden ihres Lebens möglich. Während der akuten Phase einer Infektion mit CHV-1 scheiden alle Hunde nach 3 bis 5 Tagen für eine Dauer von zwei bis drei Wochen das Virus über Nasensekrete aus, unabhängig von der Infektionsroute (APPEL et al. 1969; CARMICHAEL 1970; OKUDA et al. 1993). Durch den engen Kontakt mit den Wurfgeschwistern und stetiges Belecken der Mutter verbreitet sich das Virus schnell von einem Welpen zum anderen.

Die für alle Herpesviren typische Eigenschaft der Ausbildung einer latenten Infektion konnte auch für das canine Herpesvirus bestätigt werden (BURR et al. 1996; MIYOSHI et al. 1999).

Studien über die Verbreitung des caninen Herpesvirus wurden seit der Entdeckung 1965 in vielen Ländern der Erde durchgeführt. Abhängig von der verwendeten Methode werden in Europa bei 40 – 80 % der untersuchten Hunde virusspezifische Antikörper gefunden. In den 70er Jahren erfolgte die Titerbestimmung meist mittels Serumneutralisationstest. Studien dieser Zeit aus Washington, der Schweiz und den Niederlanden zeigten Prävalenzen von 1 bis 8 % für einzeln gehaltene Hunde und 19,8 % für Zwingerhunde. TAKUMI et al. (1990) entwickelten einen ELISA und zeigten, dass dieser Test sensitiver als der Serumneutralisationstest ist. Bei zwei späteren Studien wurde der Serumneutralisationstest (mit oder ohne Komplementzusatz) und/oder der ELISA vergleichend zur Bestimmung der Seroprävalenz angewandt (READING u. FIELD 1998; KOENIG et al. 2004). Beide Studien konnten zeigen, dass die Ergebnisse von SNT und ELISA zu über 97 % übereinstimmten.

Eine höhere Seroprävalenz wurde im Zusammenhang mit der Größe des Zwingers, insbesondere wenn die Hygienebedingungen mangelhaft sind und wenn in der Vorgeschichte Zwingerhusten aufgetreten ist (RONSSE et al. 2004), nachgewiesen.

SEO et al. (1994) und VAN GUCHT et al. (2001) zeigten, dass mit dem Alter der Anteil seropositiver Tiere ansteigt. Bei RONSSE et al. (2004) war kein Hund, der jünger als 6 Monate war, seropositiv. Der Anteil serokonvertierter Hunde stieg bis zum 2. Lebensjahr deutlich an.

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Antikörpertiter und dem Auftreten von Aborten in einem Zwinger, aber nicht mit aus der Vorgeschichte bekannten Fällen von Welpensterblichkeit oder Unfruchtbarkeit (RONSSE et al. 2004; RONSSE et al. 2005).

**Tabelle 7: Übersicht Seroprävalenz des caninen Herpesvirus (CHV-1)**

Land	Autor	Population*	Seroprävalenz
USA	(LUNDGREN und CLAPPER 1969)	282 Hunde aus Haushalten (2;4)	12,8 %
Niederlande	(FULTON et al. 1974)	100 Hunde (4)	6,0 %
	(OSTERHAUS et al. 1977)	107 Hunde aus Haushalten (1)	2,8 %
	(VAN GUCHT et al. 2001)	115 Hunde aus Zwingern (1)	12,0 %
Belgien	(RIJSEWIJK et al. 1999)	224 Hunde (3)	39,3 %
	(SCHWERS et al. 1980)	100 Hunde (2)	1,0 %
	(RONSSE et al. 2002)	97 Hunde aus Zwingern (1) 102 Hunde aus Haushalten 545 Hunde aus Zwingern (1;2;3)	49,5 % 46,1 % 45,7 %
Schweiz	(ENGELS et al. 1980)	632 Hunde aus Haushalten	6,3 %
Deutschland	(BIBRACK u. SCHAUDINN 1976)	134 Zuchthunde (1)	18,7 %
		128 Zuchthunde	39,1 %
		125 Hunde aus Haushalten 62 Welpen (1)	12,0 % 8,1 %
Großbritannien	(ACKERMANN 1975)	328 Hunde	30,0 %
	(KOENIG et al. 2004)	1666 Hunde aus Zwingern	18,8 %
	(READING u. FIELD 1998)	325 Hunde aus Haushalten (1;3)	76-88 %
Frankreich	(DELISLE 1982)	185 Hunde aus Haushalten 433 Hunde aus Zwingern	0,5 % 28,4 %
	(LACHERETZ u. COGNARD 1998)	99 Hunde (5)	43 %
	(POULET u. DUBOURGET 1993)	345 Hunde aus Zwingern	15,9 %
Italien	(GUIGAL et al. 2002)	640 Hunde aus Zwingern	30,6 %
	(SAGAZIO et al. 1998)	280 Hunde insgesamt 79 Hunde aus Zwingern (2)	11,4 % 66,6 %
	(RINALDO et al. 2000b)	300 Hunde (2)	21,6 %
Japan	(TAKUMI et al. 1990)	557 Hunde (1;3)	26,3 %
Korea	(SEO et al. 1994)	338 Hunde insgesamt	37 %
		davon Zuchthunde (3)	58 %

\*In Klammern ist die Art des verwendeten Testes zur Bestimmung der Antikörpertiter als Ziffer angegeben. 1 : SNT mit Komplementzusatz, 2 : SNT ohne Zusatz von Komplement, 3 : ELISA, 4 : Plaquereduktionstest, 5 : Immunofluoreszenz

### 2.3.7 Pathogenese und pathologisch-anatomische Veränderungen

Nach einer oronasalen Infektion erfolgt eine erste Virusvermehrung in den lokalen Lymphknoten des Kopfes und Halses. Die systemische Ausbreitung erfolgt von dort zellassoziiert über die Blutbahn. Labordiagnostisch ist diese kurze Zeit der Virämie nur sehr selten nachzuweisen. Die Verbreitung von CHV-1 im Körper erfolgt Leukozyten-assoziiert (APPEL et al. 1969). Ein Hinweis für die gefäßassoziierte Ausbreitung des caninen Herpesvirus im Körper fand HASHIMOTO et al. (1982), als er Virusantigen in den Blutgefäßwänden der maternalen und fetalen Plazenta nachwies. CHV-1 bedingte Vaskulitiden, hyalinscholligen Degenerationen und Ödeme der Gefäßwände führen zu fokalen Nekrosen in der Plazenta und scheinen in der Pathogenese von Aborten von entscheidender Bedeutung zu sein (HASHIMOTO et al. 1979b; HASHIMOTO et al. 1979c; PERL et al. 1982).

CHV-1 gelangt über das Blut in die parenchymatösen Organe und vermehrt sich dort. HASHIMOTO et al. (1979a) fanden zusätzlich Veränderungen in Thymus, Speicheldrüse und Schilddrüse und schlussfolgerten daraus einen Pantropismus (Empfänglichkeit aller Körpergewebe) des caninen Herpesvirus. Als Ausdruck einer zum Zelluntergang führenden Virusvermehrung kommt es zu makroskopischen Veränderungen in Form von fokalen hämorrhagischen, nekrotischen und entzündlichen Veränderungen in Lunge, Leber, Niere, Darm und mesenterialen Lymphknoten. Pathognomonisch sind stecknadelkopfgroße subkapsuläre und intrakapsuläre Hämorrhagien, insbesondere in Niere, Milz und Leber (HASHIMOTO et al. 1979a; PERL et al. 1982; LIN et al. 1983). Die mikroskopischen Veränderungen an der Niere beinhalten fibrinoide Nekrosen der Arterien und Degeneration der Tubuli.

Erreicht CHV-1 das ZNS, kommt es zu nichteitrigen Meningoencephalomyelitiden mit fokaler Neuritis und Gliosis (PERCY et al. 1968; PERCY et al. 1970). Die Invasion des ZNS erfolgt wahrscheinlich auf hämatogenem Wege.

Veränderungen an den Augen in Form von unilateralen Retinaödemen und fokaler Retinadysplasie in mehreren Fällen wurde beschrieben (PERCY et al. 1968).

Zum Schluss sei noch erwähnt, dass CHV-1 bei einem Hund mit malignem Lymphom isoliert wurde (KAKUK et al. 1969).

### 2.3.8 Klinik

Die Inkubationszeit nach einer Infektion mit CHV-1 beträgt 3 bis 7 Tage. Todesfälle von neugeborenen Welpen innerhalb der Inkubationszeit deuten auf eine pränatale Infektion mit CHV-1 in utero (HASHIMOTO et al. 1982). Die klinischen Symptome beim Welpen sind Wimmern, Apathie, Durchfall, Dyspnoe und Bauchschmerzen. Ein bis drei Tage nach Auftreten der ersten Symptome ist die Letalität am größten. Die Infektion älterer Welpen verläuft mild (POSTE u. KING 1971; POULET et al. 2001). Im ersten Drittel der Trächtigkeit führt eine Infektion zu embryonalem Tod mit Fruchtresorption; die Hündinnen bleiben „leer“ (SPEARMAN 1908). Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit CHV im mittleren und letzten Drittel der Trächtigkeit Aborte, Totgeburten und neonatale Mortalität zur Folge hat. Die Herpesinfektion beim erwachsenen Hund ist wenig auffällig mit etwas klarem Nasenausfluss und einer milden Konjunktivitis vom 2. bis 5. Tag p.i. Die Körpertemperatur verändert sich nicht (HASHIMOTO et al. 1982). Die Symptome verschwinden ohne Behandlung nach wenigen Tagen von selbst und werden vom Besitzer meist nicht als Erkrankung wahrgenommen.

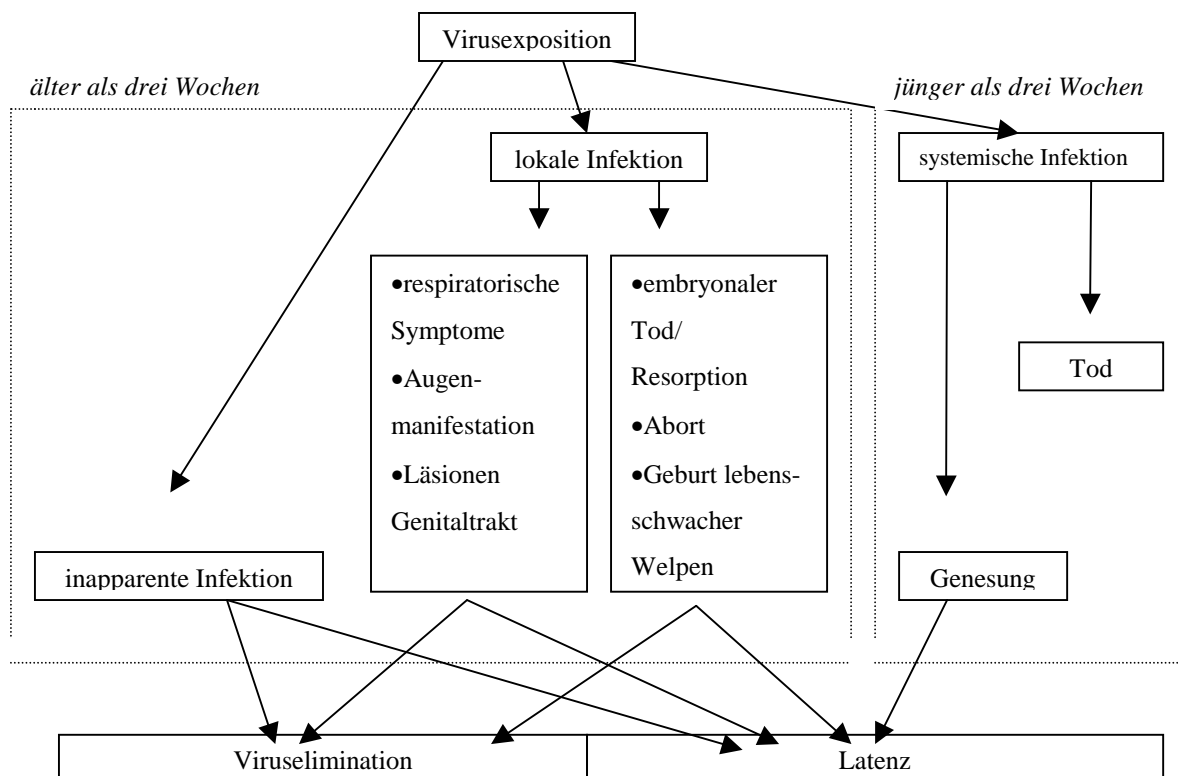


Abbildung 5: Verlaufsformen einer Infektion mit dem caninen Herpesvirus (RONSSE et al. 2003)

BINN et al. (1967) isolierte CHV-1 bei Hunden mit respiratorischen Symptomen und KARPAS et al. (1968) gelang es, bei experimentell infizierten Hunden produktive Tracheobronchitiden hervorzurufen. Das canine Herpesvirus wird zu den sekundären pathogenen Erregern des Zwingerhustenkomplexes gezählt.

HASHIMOTO et al. (1983), HILL und MAREE (1974) beschreiben vesikuläre Läsionen an den Genitalschleimhäuten erwachsener Hunde als Ausdruck der lokalen Virusvermehrung und Ausscheidung. Diese Läsionen treten bei der Hündin im Proöstrus auf und bilden sich spontan im Anöstrus zurück (POSTE u. KING 1971). Beim Rüden sind die vesikulären Läsionen an der Präputialschleimhaut sowie an der Basis des Penis nachweisbar und sind von Bedeutung für eine mögliche venerische Übertragung des caninen Herpesvirus beim Deckakt.

Die dramatischsten Auswirkungen einer CHV-1 Infektion treten bei Welpen in den ersten drei Lebenswochen auf. Der Tod tritt innerhalb von 24 bis 48 h nach Auftreten der ersten Symptome ein. Die Symptome sind Anorexie, Apathie, Saugunlust, Dyspnoe, angespanntes Abdomen, gelblich-grüner Durchfall und u.U. blutiger Nasenausfluss.

### **2.3.9 Diagnose**

Anhand der klinischen Symptome kann nur eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Im Blut von Welpen ist eine deutliche Reduktion der Thrombozyten nachweisbar (KAKUK u. CONNER 1970). Die Diagnose von einer CHV-1 Infektion erfolgt im Labor mittels Virusisolierung, PCR, Immunhistologie und Elektronenmikroskopie. Mittels Elektronenmikroskopie lassen sich Viruspartikel direkt darstellen. Diese können aber nicht weiter charakterisiert werden. Die Virusisolierung ist eine spezifische Nachweismethode, aber selten aufgrund der Instabilität der Hülle, von Erfolg gekrönt. CHV-1-spezifische monoklonale Antiseren für den immunhistologischen Nachweis sind kommerziell nicht erhältlich. In der Zellkultur stellt sich der cpE durch Anschwellung und Abrundung von Zellen dar, die sich kurz darauf ablösen. Dieser Prozess setzt sich nach außen fort. Basophile oder auch azidophile EK sind mit der Nuklearmembran assoziiert. Die pathologischen Veränderungen sind pathognomonisch. Histopathologisch sind Einschlusskörperchen zu sehen. Der direkte Virusnachweis ist mittels PCR möglich.

### 2.3.10 Prophylaxe

Die Therapie einer CHV-1 Infektion beim Welpen erfolgt symptomatisch. Infizierte Welpen hatten eine längere Überlebenszeit oder überlebten, wenn ihre Körpertemperatur künstlich auf 39 °C erhöht wurde (CARMICHAEL et al. 1969; CARMICHAEL 1970). Das canine Herpesvirus wird in seiner Vermehrung bei Temperaturen über 37 °C deutlich gehemmt (LUST u. CARMICHAEL 1971). Die normale Körpertemperatur von Welpen beträgt 38 - 39 °C. Die Fähigkeit, die Körpertemperatur konstant zu halten, ist bei Welpen erst ab der 2. Lebenswoche vollständig entwickelt. Bis dahin sind sie angewiesen auf die Wärmezufuhr durch das Muttertier oder durch geeignete Maßnahmen (Wärmelampe) im Wurflager. Die Vermehrung von caninen Herpesviren bei optimal versorgten Welpen lässt sich wirkungsvoll durch eine ausreichend warme Umgebung vermindern. Seit einiger Zeit gibt es einen Impfstoff auf dem Markt, der verhindert, dass in den ersten Lebenstagen mit CHV-1 infizierte Welpen erkranken und sterben. Die Infektion der Mutter und die Übertragung des Virus auf die Welpen wird nicht verhindert. Bei der Subunit-Vakzine handelt es sich um das aufgereinigte virale Glykoprotein gB. Seronegative Hündinnen werden während der Trächtigkeit zweimal geimpft: Die erste Impfung erfolgt während der Läufigkeit oder 7-10 Tage nach Deckakt, die zweite 1-2 Wochen vor dem errechneten Geburtstermin. Bei nachfolgenden Trächtigkeiten erfolgen die Wiederholungsimpfungen nach demselben Impfschema.

Seronegativ heißt, dass die Hündin noch nie Kontakt mit dem caninen Herpesvirus hatte und deshalb auch keine Antikörper zum Schutz ausbilden konnte. Ob die Hündin einmal Kontakt mit dem Virus hatte, lässt sich nur durch eine Blutuntersuchung feststellen. Mit dem als Goldstandard geltenden Serumneutralisationstest ist es im Labor nicht möglich zu unterscheiden, ob der Antikörpertiter eines Hundes von einer Impfung herrührt oder ob die Antikörper aufgrund einer natürlichen CHV-1-Infektion gebildet wurden.

DELISLE (1982) sowie POULET und DUBOURGET (1993) empfehlen als Metaphylaxe die Serotherapie. Von erwachsenen seropositiven Hunden des gleichen Zwingers wird Serum gewonnen. Davon werden 1 bis 2 ml den Welpen am ersten oder zweiten Lebenstag intraperitoneal verabreicht.

Die Wirksamkeit antiviraler Chemotherapeutika zur Therapie einer Infektion mit dem caninen Herpesvirus ist nicht untersucht. In vitro-Studien zeigen eine Hemmung der

Virusvermehrung von CHV-1 in MDCK-Zellen unter Zusatz von rekombinantem caninen Interferon- $\gamma$  (NISHIKAWA et al. 2001). Klinische Studien zum Einsatz von Interferon bei einer Infektion mit dem caninen Herpesvirus beim Hund fehlen.

Zuchtmanagement und Hygiene sind wirkungsvolle Mittel, um die Infektion und Verbreitung des caninen Herpesvirus in einem Zwinger zu verhindern. Drei Wochen vor der Geburt sollten trächtige Hündinnen isoliert und stressarm gehalten werden. Latent infizierte Hunde tragen durch klinisch symptomlose Phasen der Virusausscheidung zur Verbreitung von CHV-1 bei und sollten von seronegativen Zuchttieren getrennt werden. Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sind, aufgrund der Empfindlichkeit der Virionen gegenüber Detergentien und lipidlöslichen Reinigungsmitteln, einfach.

## **2.4 Arbeitsplan**

Ziel dieser Arbeit ist es, die Verbreitung und die Bedeutung des caninen Herpesvirus und des Canine Minute Virus unter Zuchthunden in Deutschland näher zu untersuchen. Dazu sollten Seren von Zuchthunden, Abstriche, Kotproben und Organe von verstorbenen Welpen oder Abortmaterial auf CHV-1 und CnMV untersucht werden.

Gleichzeitig soll der diagnostische Nachweis von CnMV durch die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen CnMV im Kaninchen und die Herstellung rekombinantem Virusprotein in *E.coli* vereinfacht werden. Das synthetisierte CnMV-Protein soll später als Basis für die Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von CnMV-spezifischen Antikörpern beim Hund dienen.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien, spezielle Reagenzien

Chemikalien wurden bezogen von den Firmen Roth, Merck, AppliChem und Sigma. Im Folgenden sind spezielle Chemikalien bzw. Produkte und ihre Hersteller aufgeführt:

NEA	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin 1:250	Biochrom, Berlin
Guinea Pig Complement	Sigma, Saint Louis, USA
Freunds Adjuvans incomplete	Sigma, Saint Louis, USA
Roti®- Blue	Roth, Karlsruhe
Bradford Reagent	Sigma, Saint Louis, USA
Bis-Acrylamid (30%/0,8%)	Roth, Karlsruhe
PMSF	Roth, Karlsruhe
Seesand, reinst	Windaus Labortechnik, Clausthal-Zellertal

#### 3.1.2 Marker

DNA-Molekulargewichtsmarker	PEQLAB Biotechnologie GmbH,
Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
peqGOLD 100 bp DNA Marker	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

#### 3.1.3 Antikörper und Enzyme

sheep anti-dog IgG HPO	Serotec, Düsseldorf
sheep anti-dog IgG FITC	Serotec, Düsseldorf
sheep anti-rabbit IgG HPO	Bethyl Inc., Montgomery, Texas, USA
swine anti-rabbit-IgG HPO	Dako A/S, Glostrup, Dänemark
goat anti-rabbit-IgG Cy2	dianova GmbH, Hamburg
goat anti-mouse-IgG HPO	Serotec, Düsseldorf

mouse anti His	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Restriktionsendonukleasen und Puffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

PE-Puffer	500 mM Saccharose, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
PBS	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
PBS/T	PBS mit 0,05 % Tween®20
Boratpuffer	0,2 M Borsäure, 0,5 M NaCl, pH 7,4
CsCl (1,39 g/cm <sup>3</sup> )	CsCl 530 mg/ml
5 M NaCl	NaCl 292,2 g, A. bidest ad 1 l
TE-Puffer	Tris, EDTA, pH 8,0
Bindepuffer	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,9
Elutionspuffer	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 1 M Imidazol, pH 7,9
Waschpuffer I	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,9
Waschpuffer II	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 50 mM Imidazol, pH 7,9
SDS-Probenpuffer Laemmli	nach 12,5 % (v/v) 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Thowbin-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin
SDS-Elektrophoresepuffer (5x)	5 mM Tris, 38,4 mM Glycin, 0,02 % SDS
Phosphatpuffer (10x)	720 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 170 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
0,5 M Tris-HCl	6,00 g / 100 ml, pH 6,8
1,5 M Tris-HCl	18,15 g / 100 ml, pH 8,8
Puffer X2	20 mM Tris Cl, 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 80 mM DTT, 4 % SDS, 250 µg/ml Proteinase K
TBE 10x	108 g Tris, 55 g Borsäure, 8,3 g EDTA, A.bidest ad 1 l

#### Sammelgel für SDS-Page (2x):

A. bidest.	3,075 ml
0,5 M Tris-HCl	1,25 ml
SDS 20 %	25 µl
Bis-Acrylamid	0,67 ml
APS 10 %	25 µl
TEMED	5 µl

#### Trenngel 12 % für SDS-Page (2x):

A. bidest.	3,4 ml
1,5 M Tris-HCl	2,5 ml
SDS 20 %	50 µl
Bis-Acrylamid	4,0 ml
APS 10 %	50 µl
TEMED	5 µl

### 3.1.5 Kits

QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Stool Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Nucleo Spin® -Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Fast Start High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
ReddyMix™ PCR Master Mix	Abgene House, Surrey, UK
TOPO TA Cloning®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 3.1.6 Untersuchungsmaterial

Durch Veröffentlichungen über das infektiöse Welpensterben und deren virale Ursachen in einigen Mitgliedszeitschriften von interessierten Hundezuchtvereinen wurden Züchter aufgefordert, Serumproben einzusenden. Auf einer speziell eingerichteten Homepage mit der URL <http://www.herpes-beim-hund.de> konnten Tierärzte und Züchter einen dazugehörigen Probenbegleitschein herunterladen, auf dem zusätzliche Daten über z. B. Geschlecht, Rasse und Alter erfragt wurden. Ein Abdruck des Probenbegleitscheines ist im Anhang (Seite II) dieser Arbeit dargestellt. Zusätzlich können 40 Seren der Serumbank aus München, die 1998 im Rahmen einer seroepidemiologischen Studie zur Wirksamkeit verschiedener Impfschemata und Impfstoffe bei Hunden angelegt wurde, mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Von Frau Prof. Günzel-Apel, Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover wurden freundlicherweise 31 Spermaproben und 26 Serumproben aus dem Patientengut der Klinik in Hannover zur Verfügung gestellt. Zwischen März 2004 und Oktober 2005 konnten so insgesamt 429 Serumproben, 34 Spermaproben, 37 Tupferabstriche und 16 Kotproben gesammelt werden.

Die positiven Referenzseren für die Antikörperbestimmung gegen das Canine Minute Virus und ein negatives Referenzserum eines Hundes mit SPF-Status überließ freundlicherweise Prof. Leland E. Carmichael, J. A. Baker Institute, Cornell University, NY, USA.

### 3.1.7 Medien

MEM-Earle/HEPES	enthält 20 mM HEPES, 4,5 g/l Glukose ; vor Gebrauch Zusatz 1x NEA, 120 mg/l Na-Pyruvat, 2 mM/l Glutamin, 1,1 g/ml NaCl, 100 IE Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin)
DMEM	3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat, 4,5 g/l Glukose, 1,028 g/l Glutamin; vor Gebrauch Zusatz 1x NEA, 100 IE Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin)
LB	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 171 mM NaCl, pH 7,0
FKS	Biochrom, Berlin
SOC	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glukose, pH 7,0
TB	11,8 g/800 ml Pepton, 23,6 g/800 ml Hefe, 4 ml/800 ml Glyzerin, vor Gebrauch Zugabe von 100 ml 20% Glukose, 100 ml 10xPhosphatpuffer, 50 µg/ml Ampicillin

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A. bidest. angesetzt und anschließend autoklaviert. Feste Nährböden enthalten zusätzlich 1,5 % (w/v) Bacto-Agar. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach Abkühlen der autoklavierten Medien auf ca. 40 °C. Zellkulturmedien wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

### 3.1.8 Mikroorganismen

Wirtsstamm	Genotyp
TOP10F <sup>'</sup> (Invitrogen)	F <sup>-</sup> ( <i>lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i> )
XL-1Blue (Stratagene®)	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>F' [proAB lacIq lacZ ΔM15 TU(tet<sup>r</sup>)]</i>
BL21-CodonPlus(DE3)RIL (Stratagene®)	<i>E. coli B F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>

### 3.1.9 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. Biomers, Ulm und Sigma Genosys hergestellt. Die Auswahl der Oligonukleotidsequenzen erfolgt manuell und unter Verwendung des Programms Primer3 (ROZEN u. SKALETSKY 2000). Der Einbau von Restriktionsschnittstellen erfolgt manuell. In Tabelle 8 sind alle verwendeten Oligonukleotide unter Angabe der Annealingtemperatur und der Position innerhalb der in der Genbank veröffentlichten Sequenzen für CnMV (NC004442) und CHV-1 (AF361073) zusammengefasst.

**Tabelle 8: Oligonukleotide**

Primer	Sequenz <sup>a)</sup>	T <sub>m</sub>	Position
CnMV12s	5'-aca agc cat cac agt gga tc-3'	60°C	4206-4225
CnMV18as	5'-tcg ttc ttt gac tcg ggt ct3'	60°C	4926-4907
CnMV5as	5'- aac tca ctt tcc gga gca ga -3'	60°C	4482-4463
CHVgBr <sup>b)</sup>	5'-ttg caa tgc ccc tca taa tt -3'	56°C	2128-2109
CHVgBf <sup>b)</sup>	5'-cag gac tat tgg act ata gt-3'	56°C	2009-2028
VP2MBamHI	5'-tat tag↓gat cca atg gaa ccg cag gaa act gag -3'	56 °C	3329-3249
VP2MEcoRI	5'- atg aga att↓cct gcg ttt tgt tta tgc etc ttc -3'	56°C	5041-5019
VP2BgIII2.1	5'- ccg ga↓g atc tca gcg tca gcg ttt tgt tta tg-3'	56°C	5041-5026
VP2 PaeI2.1	5'- caa ggc atg↓ caa ccg cag gaa act g-3'	56°C	3332-3247

a) *Fettgedruckt sind die jeweiligen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme. Der Pfeil signalisiert die Schnittstelle.*

b) *(BURR et al. 1996)*

### 3.1.10 Labormaterial

PAGEr Duramide® Precast Gels	Cambrex Bio Science Inc., Rockland, USA
Hybond-P Blotting Membran	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Plastikmaterial	Nunc, Dänemark; Simport Plastic, Kanada Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz BSN medical, Hamburg Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

### 3.1.11 Geräte

Blotapparatur	Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell, BioRad Laboratories, München
Elektrophoreseapparaturen	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Geldokumentationsgeräte	GelDoc 2000, BioRad Laboratories, München
Inkubatoren	CO <sub>2</sub> Unitherm 170, UniEquip, Martinsried; Heraeus, Heracell
Kamera	Leica DC 180, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Schweiz
Mikroskope	Leica DM IL, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Netzgeräte	BioRad Power Pac 200, 300, 1000, 3000; München
pH-Meter	WTW Laboratory Equipment, Weilheim
Photometer	Multiskan Ascent®, Labsystems, Helsinki, Finnland Perkin Elmer Lambda Bio uv/vis, Rodgau
Pipetten	Eppendorf, Gilson S.A.S., Frankreich
Wasserbad	medingen W 12, Medingen
Zentrifugen	Heraeus Biofuge Stratos Heraeus Biofuge fresco Hettich Universal 30F, Tuttlingen Beckmann Optima™ L-70K Ultracentrifuge
Horizontal-Schüttler	Ultrawash PPlus®, Fa. Dynatech Technologies Ltd., Guernsey, UK
Schüttel-Heizblock sterile Werkbänke	Vortemp 56 EVC, UniEquip, Martinsried Heraeus, Kojair
PCR-Cycler	eppendorf Mastercycler® gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Tpersonal 48, Whatman Biometra, Göttingen
Waagen	Sartorius; Kern und Sohn;
Reinstwasseranlage	Clear UV Plus Reinstwassersystem. SG-Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Hamburg
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA ; VWR international

### 3.1.12 Software

Diese Arbeit wurde unter Anwendung von Microsoft Office 98 realisiert. Als Werkzeuge zum Bearbeiten und Analysieren von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen wurde Software von DNASTAR benutzt. Für die Dokumentation und Archivierung von Aufnahmen mit der Mikroskopkamera kam das Programm Leica IM50 zum Einsatz. Graphiken wurden mit Micrografx Picture Publisher erstellt und bearbeitet. SPSS 11.5 und RegioGraph 6.0 wurden für die statistische Analyse und die graphische Darstellung der Ergebnisse verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturverfahren

#### 3.2.1.1 Kultivierung WRCC-Zellen

Die WRCC-Zellen wurden von Prof. Leland E. Carmichael, James A. Baker Institute, Cornell, USA zur Verfügung gestellt und stellen eine permanente Zelllinie aus einer subepidermalen Zyste eines bestrahlten Hundes dar. Die epithelioiden WRCC-Zellen sind, zusammen mit einzelnen MDCK-Stämmen, die einzig bekannten permissiven Zellen für das Canine Minute Virus. Die Kultivierung erfolgt in DMEM supplementiert mit 10 % FKS, nicht essentiellen Aminosäuren und Antibiotika, bei 5 % CO<sub>2</sub>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen der Passage 14 - 45 verwendet. Für die Passage wird der konfluent gewachsene Monolayer zweimal kurz mit 0,25 % Trypsin gewaschen und anschließend bis zur Ablösung der Zellen mit 0,25 % Trypsin inkubiert. Die abgelösten Zellen werden im Wachstumsmedium suspendiert und im gewünschtem Verhältnis geteilt. Zur Einstellung der gewünschten Zellzahl in der Suspension werden die Zellen wie in Punkt 3.2.1.3 beschrieben gezählt.

#### 3.2.1.2 Kultivierung MDCK-Zellen

Die Vermehrung des caninen Herpes Virus erfolgt in Madin Darby Canine Kidney Cells (MDCK-Zellen), die freundlicherweise von Herrn Dr. Roland Riebe, Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin (ZBV), Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit zur Verfügung gestellt wurden. Die epithelioiden, schnell proliferierenden Zellen wurden in dieser Arbeit von der 66. bis 104. Passage eingesetzt. Die Kultivierung erfolgt mit MEM/Earle, 20 mM HEPES unter dem Zusatz von 5 % FKS, 120 mg/l Natriumpyruvat, 1,1 mg/ml Natriumhydrogencarbonat, 2 mM/l Glutamin, nichtessentiellen Aminosäuren und Antibiotika. Die Zellen wurden zwei- bis dreimal in der Woche je nach Konfluenz im Verhältnis 1/3 bis 1/10 passagiert. Die Zellen werden dazu zweimal mit Trypsin gewaschen und danach bis zur Ablösung der Zellen bei 37 °C inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgen unter einer Sterilwerkbank.

### 3.2.1.3 Zellzählung

Die Auszählung der im Wachstumsmedium resuspendierten Zellen erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer. Sofort nach Zugabe von 10 % (v/v) Trypanblau wird die Zellsuspension in die Kammer gefüllt. Blau gefärbte, tote Zellen werden nicht gezählt. Die Auswertung erfolgt rechnerisch nach folgender Formel, nachdem die Zellen in mindestens 9 Großquadraten ausgezählt worden sind.

$$\text{Zellen / ml} = \frac{N}{Q \cdot V_K} \cdot \frac{V_G}{V_Z}$$

N = Summe aller gezählten Zellen

Q = Anzahl der ausgezählten Großquadrate

V<sub>K</sub> = Kammervolumen = 0,0001

V<sub>G</sub> = eingesetztes Gesamtvolumen in ml

V<sub>Z</sub> = davon Zellsuspension in ml

### 3.2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Langzeitlagerung werden die WRCC in DMEM und MDCK in MEM mit 10 % FKS in einer Zellzahl von 2 bis 4 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml nach Zugabe von 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in Einfrierröhrchen mit einer Abkühlrate von -1 °C/min bis auf -60 °C heruntergekühlt und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Tiefgefrorene Zellen werden im Wasserbad bei 37 °C rasch bis zum Gefrierpunkt aufgetaut und zusammen mit auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium in vorbereitete Kulturflaschen ausgesät.

## 3.2.2 Viruskultur

### 3.2.2.1 Virusstämme

Der CnMV Stamm-GA3 (CARMICHAEL et al. 1991) und der canine Herpesvirusstamm-11 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Leland E. Carmichael, J. A. Baker Institute, Cornell University, NY, USA für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.



### 3.2.2.2 Virusisolierung

Ein bis zwei Gramm Organmaterial oder Kot werden mit etwas Seesand in einem Mörser mit Pistill fein zerrieben. Nach der Zugabe von 5 ml PBS und Antibiotika (200 IE/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin) wird der flüssige Überstand zentrifugiert (3000 rpm / 20 min/ 4 °C), sterilfiltriert und portioniert bis zur weiteren Verwendung kurzfristig bei 4 °C, ansonsten bei -80 °C gelagert. 500 µl des Überstandes werden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, die 5 x 10<sup>5</sup> frisch ausgesäte WRCC oder 7,5 x 10<sup>5</sup> MDCK Zellen enthalten, inokuliert. Die Flaschen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für fünf Tage inkubiert und täglich auf das Auftreten eines cpE kontrolliert. Bei negativem Ergebnis werden die Flaschen zweimal eingefroren und wieder aufgetaut, die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand ein zweites Mal mit frischen WRCC- bzw. MDCK-Zellen passagiert. Bildet sich nach zweimaliger Passage kein cytopathischer Effekt aus, wird versucht, mittels indirekter Immunofluoreszenz Virusantigen in der Zelle nachzuweisen.

### 3.2.2.3 Virusaufreinigung

WRCC-Zellen werden mit CnMV in einer MOI von 1 infiziert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zum Auftreten eines 70 bis 100 %igen cpE inkubiert. Nach einem zweimaligen Gefrier- und Tauzyklus wird die Zellsuspension von groben Zelltrümmern durch Zentrifugation (3000 g, 20 min, 4 °C) befreit. Das im Überstand befindliche Virus wird mit PEG-6000 (Endkonzentration 10 % w/v) und einer 5 M NaCl-Lösung (10 % v/v) über Nacht bei 4 °C unter Rühren ausgefällt. Das Präzipitat wird 45 min bei 1500 g und 4 °C sedimentiert und in geringer Menge Borat-Puffer resuspendiert. Anschließend wird Chloroform in einem Verhältnis von 1:1 dazugegeben und das Gemisch während der einstündigen Inkubationszeit bei RT mehrmals aufgeschüttelt. Anschließend wird zentrifugiert (4000 rpm/ 20 min/ 4 °C) und der Überstand über einen isopyknischen CsCl-Gradienten gereinigt. Dazu wird in jedes Röhrchen eine CsCl-Lösung mit einer eingestellten Dichte von 1,39 g/cm<sup>3</sup> (38 %) vorgelegt und mit dem virushaltigen Überstand überschichtet. Nach der Ultrazentrifugation bei 40 000 rpm für 21 h bei 4 °C in einem SW41 Rotor befinden sich zwei opalisierende Virusbanden im mittleren Röhrchendrittel. Durch seitliches Einstechen mit einer Kanüle werden die Banden abgezogen und durch erneute Zentrifugation bei 25 000 rpm und 4 °C für 3 h

pelletiert. Das Pellet wird in PBS resuspendiert und nach Bestimmung des Protein-gehaltes (3.2.9.4) und der Kontrolle der Reinheit in einer SDS-Gelelektrophorese (3.2.9.1) als Antigen zur Herstellung des Hyperimmunserums gegen CnMV (3.2.10) in Kaninchen verwendet.

#### 3.2.2.4 Virustitration

Zur Bestimmung der TCID<sub>50</sub> wird die Methode der Endverdünnungstitration benutzt. Es wird diejenige Virusverdünnung ermittelt, in der noch eine infektiöse Einheit vorhanden ist. Vorbereitend werden zunächst Zellen passagiert und gezählt. Von der auf  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellten Zellsuspension werden 100 µl in jede Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Auf separaten 96-Well-Mikrotiterplatten erfolgt die Herstellung einer Virusverdünnungsreihe. Dazu werden je 180 µl Medium in jedes Well vorgelegt und je 20 µl der zu untersuchenden Virussuspension in die erste Spalte gegeben. Nach einem gründlichen Durchmischen erfolgt ein Überpipettieren von 20 µl in die jeweils nachfolgende Kavität. Zwischen jeder Verdünnungsstufe werden die Pipettenspitzen gewechselt. 100 µl jeder Virusverdünnung werden auf die Zellkulturplatte übertragen. Um einen erneuten Spitzenwechsel zu umgehen, wird dabei mit der höchsten Verdünnungsstufe begonnen. Die Auswertung erfolgte nach zwei bis vier Tagen lichtmikroskopisch. Die Kalkulation des Titers als TCID<sub>50</sub>/0,1 ml erfolgt nach KAERBER (1931) und SPEARMAN (1908). Der Titer besagt, wie viele infektiöse Einheiten im unverdünnten Ausgangsmaterial vorhanden sind.

#### 3.2.3 Präparation viraler DNA

Die DNA-Präparationen aus Organmaterial, Zellkulturüberstand, Tupferproben und Kot erfolgt mit kommerziell erhältlichen Aufreinigungskits der Firma Qiagen, Hilden nach Vorschrift des Herstellers. Für die Aufreinigung von viraler DNA aus Sperma wurde das Protokoll des Herstellers durch einen zusätzlichen Schritt abgeändert. Zu 100 µl Sperma wird das gleiche Volumen Puffer X2 gegeben. Die Probe wird für eine Stunde bei 55 °C inkubiert und zwischendurch gevortext. Nach Zugabe von je 200 µl Puffer AL und Ethanol erfolgt die weitere Aufreinigung wieder gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die eluierte DNA wird bei -20 °C gelagert.

### 3.2.4 Diagnostische PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte. Der Anfang und das Ende des DNA-Fragmentes wird bestimmt durch das Design zweier gegenläufiger Primer, die zu dem 3'- beziehungsweise 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts komplementär sind. Die Oligonukleotide zur spezifischen Diagnostik einer CnMV-Infektion wurden entweder manuell oder mit dem Programm Primer 3 (ROZEN u. SKALETSKY 2000) designed und anschließend mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) unter Verwendung des BLAST Programms (ALTSCHUL et al. 1990) hinsichtlich einer Voraussage der Spezifität verglichen.

In einem Standardreaktionsansatz von 25 µl werden 22,5 µl PCR Master Mix (1.1x ReddyMix™, ABgene House), 0,5 µl je Oligonukleotid und 1,5 µl Template gegeben.

Die einzelnen Bestandteile liegen in folgenden Endkonzentrationen vor: 200 µM dNTP, 0,75 U Taq Polymerase, 2,5 – 2,75 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,2 – 0,4 µM je Oligonukleotid.

Die genauen Angaben bezüglich MgCl<sub>2</sub>- und Oligonukleotidkonzentrationen sowie Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Nach einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 3 min werden 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Ein Zyklus besteht jeweils aus einer Denaturierung bei 94 °C (30 s), der Anlagerung der Primer (30 s) bei der für jedes Primerpaar spezifischen Schmelztemperatur (siehe Tabelle 8) und der Extension bei 72 °C für 30 s. Anschließend wird der Reaktionsansatz für weitere 7 min bei 72 °C inkubiert, um eventuell noch unvollständige DNA-Stränge zu komplettieren.

Als Negativkontrolle wird A. bidest und/oder virale DNA von einem anderen als dem gesuchten Virus genommen. Positivkontrolle ist virale DNA aufgereinigt aus Zellkulturüberstand.

Die PCR-Produkte werden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Ergebnisse dokumentiert (3.2.5).

**Tabelle 9: Übersicht der Reaktionsbedingungen der PCR zum Nachweis von CnMV und CHV-1**

Oligonukleotid	Konzentration	MgCl <sub>2</sub>	Annealingtemperatur	Fragmentgröße
CHVgBr CHVgBf	0,4 µM	2,75 mM	56°C	120 bp
CnMV 12s CnMV 5as	0,2 µM	2,5 mM	60°C	276 bp
CnMV 12s CnMV 18as	0,2 µM	2,5 mM	60°C	702 bp

### 3.2.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgt in Abhängigkeit von den Größen der DNA Fragmente in 1 bzw. 2%igen Agarosegelen in einer Gelelektrophoresekammer in 1xTBE-Puffer. Die Elektrophorese wird bei 120-140 V für 45-60 min durchgeführt. Die Größe des Fragmentes wird durch visuellen Vergleich mit einem eingesetzten DNA-Standard-Marker bestimmt. Die Agarosegelelektrophorese wird auch zur Reinigung von DNA-Fragmenten benutzt. Dazu wird das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell so knapp wie möglich aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Nucleo Spin Extraction Kit II (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert.

### 3.2.6 Klonierung

Das Oberflächenprotein VP2 von CnMV ist bedingt durch seine exponierte Lage auf der Virusoberfläche ein wichtiges Antigen. VP2 eignet sich deshalb zum Einsatz in einem diagnostischen Nachweissystem für CnMV. Dafür werden relativ große Mengen an Antigen benötigt. Die Herstellung von rekombinantem Protein durch Genexpression in *E.coli* ist eine etablierte Methode und lässt sich für eine kontinuierliche Produktion des Proteins in unterschiedlichen Mengen sehr gut standardisieren.

Das Gen für VP2 wird amplifiziert und zunächst in einen Klonierungsvektor eingebaut. Später erfolgt die Subklonierung in einen Expressionsvektor und die Transformation in einen *E.coli*-Expressionsstamm.

### 3.2.6.1 Herstellung Amplifikat

Die Amplifizierung des VP2-Gens erfolgt in einer PCR unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Polymerase). Die 3' → 5'-Exonukleaseaktivität der *Pfu*-Polymerase ermöglicht die Synthese großer DNA-Fragmente (bis 12 kb) mit sehr niedriger Fehlerrate. Durch diese Aktivität ist das Enzym in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide herauszuschneiden und durch das richtige zu ersetzen. Die *Pfu*-Polymerase wird im Sinne einer Hotstart-PCR erst nach dem initialen Denaturierungsschritt zum Reaktionsansatz zugegeben.

Das 1737 bp große Fragment wird mit dem FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH) unter Verwendung des Oligonukleotidpaares VP2BgIII2.1 und VP2PaeI2.1 amplifiziert und dann nach Angaben des Herstellers in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert. Der das Insert enthaltene Vektor wird mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung ermittelt und erhält die neue Bezeichnung pCR<sup>®</sup>2.1MVP2.

**Tabelle 10: PCR-Programm zur Amplifizierung des VP2-Gens von CnMV mit VP2MBamHI und VP2MEcoRI**

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
	95 °C	5 min
30 x	95 °C	1 min
	56 °C	1 min
	72 °C	2 min
	72 °C	10 min
	4 °C	∞

### 3.2.6.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die an spezifischen Sequenzen der DNA binden und sie dort spalten. Die Erkennungssequenzen sind i.d.R. palindromisch aufgebaut. Die Länge variiert zwischen 4 und 6 bp.

Zum einen dient die Behandlung mit Restriktionsenzymen zur Vorbereitung von Fragmenten und Vektoren für eine Ligationsreaktion. Mit dem Restriktionsverdau wird zum anderen aber auch überprüft, ob die präparierten Plasmide das gewünschte Fragment enthalten (siehe Tabelle 11). Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme hinterlassen überstehende Enden, die auch als *sticky ends* bezeichnet werden.

Die DNA-Fragmente werden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und das Restriktionsmuster ausgewertet.

**Tabelle 11: Pipettierschema für den Restriktionsverdau des Vektors pET22b(+)-M-VP2 mit EcoRI und BamHI (Inkubation: 37 °C, 30-45 min)**

Ansatz	50 $\mu$ l
Vektor	5 $\mu$ l
EcoRI	1 $\mu$ l
BamHI	1 $\mu$ l
10xPuffer	5 $\mu$ l
Aqua bidest.	38 $\mu$ l

### 3.2.6.3 Subklonierung genomischer Fragmente

Das VP2-Gen von CnMV wird aus dem Vektor pCR<sup>®</sup>2.1MVP2 in den Vektor pET22b(+) subkloniert. pCR<sup>®</sup>2.1MVP2 wird dazu als Template in einer weiteren PCR eingesetzt. Der Expressionsvektor pET22b(+) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Martin Giersberg, Fa. Novoplant, Gatersleben. Das 1739 bp große Insert wird mit Hilfe flankierender Primer (VP2-M-Eco, VP2-M-BamHIfwd) und der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Amplifizierungsprogramm sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die gewünschte Bande wird aus dem Agarosegel extrahiert und das eluierte Fragment zur Herstellung überhängender Enden mit EcoRI und BamHI verdaut. Gleichzeitig wird vorbereitend für die anschließende Ligationsreaktion der Vektor pET22b(+) mit EcoRI und BamHI linearisiert. Mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) werden die Restriktionsenzyme nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C entfernt.

**Tabelle 12: PCR für die Subklonierung von VP2**

Ansatz	50 $\mu$ l	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
10xPCR-Puffer	5,0 $\mu$ l	25 x	95 °C	5 min
Pfu-Polymerase	0,5 $\mu$ l		95 °C	30 s
VP2MBamHI	0,4 $\mu$ l		56 °C	1 min
VP2MEcoRI	0,4 $\mu$ l		72 °C	2 min 30 s
dNTP	0,4 $\mu$ l		72 °C	10 min
Template	0,25 $\mu$ l		4 °C	$\infty$
Aqua bidest.	38 $\mu$ l			

#### 3.2.6.4 Plasmidligation

Zur kovalenten Verknüpfung von Vektor- und Fragment-DNA wird nach dem in Tabelle 13 dargestellten Schema ein Ligationsansatz hergestellt und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert.

**Tabelle 13: Pipettierschema des Ligationsansatzes**

Ansatz	20 µl
Vektor	2 µl
Fragment	5 µl
10xLigasepuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
Aqua bidest.	10 µl

#### 3.2.6.5 Transformation

Alle Primärtransformationen erfolgen in den *E.coli* K12-Stamm XL-1Blue. Für die Expression des VP2 Proteins werden die aufgereinigten Plasmide pET22b(+)JMVP2 in den Stamm BL21CodonPlus(DE3)RIL transformiert. Chemischkompetente *E.coli*-Zellen des genannten Stammes, freundlicherweise von Dr. Martin Giersberg, Fa. Novoplant, Gatersleben zur Verfügung gestellt, werden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 µl des Ligationsansatzes erfolgt eine Inkubation auf Eis für 30 min. Es folgt ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C im Wasserbad und eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wird der Ansatz mit 1 ml vorgewärmten S.O.C.-Medium aufgefüllt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienzellen werden für 10 s bei 12000 rpm pelletiert und nach vorsichtigem Dekantieren in dem sich noch im Eppendorfgefäß befindlichen Restmedium resuspendiert. Davon werden 100 µl mit einem Drigalskispatel auf LB-Platten (Zusatz 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und 12-24 h bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien werden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert und - wie in den folgenden Abschnitten beschrieben - analysiert und selektiert. Zur Kryokonservierung werden 850 µl der Bakterienkultur mit 150 µl sterilen Glycerols (100 %) versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.6.6 Präparation der Plasmid-DNA aus kleinen Bakterienpräparationen (Mini-Präp)

Durch alkalische Lyse bakterieller Zellen kann die Plasmid-DNA nach Ausfällen der restlichen zellulären Bestandteile, einschließlich chromosomaler DNA, isoliert werden. Zu diesem Zweck werden ausgehend von Einzelkolonien Kulturen in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von diesen Kulturen werden dann 1,5 ml in eine Eppendorfgefäß überführt und 2 min (7000 rpm) bei Raumtemperatur sedimentiert. Das Bakteriensediment wird durch alkalische Lyse nach einer Standardmethode von SAMBROOK und RUSSEL (2001) aufgeschlossen. Die DNA wird in 50 µl Wasser aufgelöst und bei -20 °C gelagert. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wird die DNA-Lösung bei 260 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Analyse der Klone erfolgt mittels Restriktionsendonukleasenverdaus (3.2.6.2) und Sequenzierung des Vektorinserts. Die Sequenzen werden nach der Didesoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode nach SANGER et al. (1992) durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung Leipzig (IZKF) ermittelt.

### 3.2.7 Genexpression

Eine schnelle und effiziente Herstellung von Proteinen ist mit Hilfe bakterieller Expressionssysteme möglich. Für die Expression mit dem pET-System wird der Wirtstamm BL21CodonPlus(DE3)RIL verwendet. Die Expression von *lacZ*-Promotor regulierten Genen findet in geringem Umfang auch ohne die Anwesenheit des synthetischen Induktors IPTG statt. Der Zusatz von Glukose zum Nährmedium soll diese Basisexpression verhindern (DE BELLIS u. SCHWARTZ 1990). Eine Einzelkolonie von pET22b(+)JMVP2 tragenden BL21CodonPlus(DE3)RIL Zellen wird in 50 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin, 10 mM Glucose) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Vorkultur wird 1:10 mit LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin, 10 mM Glucose, 1x Phosphatpuffer) verdünnt und bei 37 °C weitergeschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 erfolgt die Induktion der Expression des rekombinanten CnMV-VP2-Proteins mit IPTG (Endkonzentration 50 µM). Die Bakteriensuspension wird für weitere 3 h bei 26 °C geschüttelt (175 rpm). Durch die Entnahme von Aliquots vor und zu unterschiedlichen Zeiten nach Induktion kann eine Induktionskinetik verfolgt werden. Anschließend werden die Zellen bei 3000 x g für 15 min pelletiert. Die Aufreinigung des exprimierten CnMV-VP2-Proteins ist unter Punkt 3.2.8 beschrieben.



### 3.2.8 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das rekombinant hergestellte CnMV-VP2 Protein trägt am C-terminalen Ende eine Markierung (Tag), bestehend aus 6 Histidinresten. Durch den His-Tag lässt sich das CnMV-VP2 Protein affinitätschromatographisch über Ni-Chelat-Säulen aufreinigen. Bei der Proteinreinigung durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) wird ausgenutzt, dass bestimmte Aminosäuren, v.a. Histidin, pH-abhängig Komplexe mit divalenten Metallionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) bilden. Diese Bindung ist durch Änderung des pH-Wertes oder Zusatz von Imidazol reversibel. Der zur Proteinexpression verwendete Vektor pET22b(+)-M-VP2 enthält ein pelB-Exportsignal. Aus diesem Grund erfolgt die Aufreinigung des rekombinanten VP2-Proteins getrennt aus dem periplasmatischen und cytoplasmatischen Extrakt. Zur Herstellung des periplasmatischen Extraktes wird das aus Kapitel 3.2.7 erhaltene Zellpellet mit destilliertem Wasser vorsichtig gewaschen und anschließend in PE-Puffer (40 ml pro 1 l Kultur) zu einer homogenen Lösung resuspendiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen ab diesem Schritt bei 4 °C. Die Lösung wird zweimal für 15 min bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand (periplasmatischer Extrakt) über Nacht gegen Bindepuffer (Zusatz von 2 mM PMSF) dialysiert. Die Dialyse dient dazu, das im Bindepuffer enthaltene EDTA zu entfernen. EDTA würde die weitere Reinigung über Ni-NTA-Agarose durch die Komplexbildung der Ni-Ionen stören. Nach der Dialyse wird der periplasmatische Extrakt nochmals für 20 min bei 14 000 x g und 4 °C zentrifugiert, um eventuell präzipitierte Proteine zu entfernen. Für die Reinigung des im Zytoplasma verbleibenden VP2 wird das Zellpellet aus der Zentrifugation zur Herstellung des periplasmatischen Extraktes in 15 ml Bindepuffer (Zusatz von 2 mM PMSF) resuspendiert und einer Ultraschallbehandlung (20 min, 100 %, 0,5 Zyklus, Eiswasserbad) unterzogen. Der Zelldetritus wird durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 50 000 x g vom cytoplasmatischen Extrakt abgetrennt. Beide Extrakte liegen jetzt in Bindepuffer vor und werden im Batchverfahren (Becherglas) mit etwa 2 cm<sup>3</sup> Ni-NTA-Agarose (His-Bind-Resin, Novagen) unter ständigem Rühren 2 h equilibriert. Das Gemisch wird über eine 10 ml Leersäule mit Fritte gegeben, auf der sich die Agarose absetzt. Der Durchlauf wird nach Entnahme eines Aliquots verworfen. Die Ni-NTA-Agarose wird nacheinander mit jeweils zwei Säulenvolumen Bindepuffer, Waschpuffer I und II versetzt. Das Waschen mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen dient dazu, andere

histidinhaltige Proteine, wie z. B. Metalloproteasen, zu entfernen. Das rekombinante CnMV-VP2 Protein wird mit 4 x 1 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die erhaltenen Fraktionen (Rohextrakt, Durchlauf, Waschen, Eluate) werden anschließend mittels Proteinbestimmung, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.9.1) und Western Blot (3.2.9.3) analysiert. Die Langzeitlagerung des rekombinanten Proteins im Elutionspuffer erfolgt aliquotiert bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.9 Proteinanalytik

#### 3.2.9.1 Denaturierende Proteingelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Analyse und Größenbestimmung werden Proteine mittels SDS-Page im diskontinuierlichen Puffersystem (LAEMMLI 1970) aufgetrennt. In Abhängigkeit von den zu untersuchenden Proben und der jeweiligen Fragestellung kommen selbst hergestellte Acrylamidgele (10-12 %) oder kommerziell erhältliche Gradientengele zur Anwendung. Die Proteinproben werden zunächst im Probenpuffer nach Laemmli erhitzt und kurz zentrifugiert. Nach dem Auftragen der Proben (Probenvolumen: 15-20  $\mu\text{l}$ ) werden die Gelplatten in die Elektrophoresekammer Protean III (Biorad Laboratories, München) eingespannt und der SDS-Laufpuffer (1x) in die Kammer gefüllt. Das Einwandern der Proben in das Sammelgel erfolgt bei 70 V und die Auftrennung im Trenngel bei 140 V.

#### 3.2.9.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Zum Nachweis der Proteinbanden wird das Gel über Nacht in einer kolloidalen Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung (Roti®-Blue, Roth) geschüttelt. Der kolloidale Farbstoff bindet mit hoher Spezifität und Sensitivität an Proteine und nur minimal an der Gelmatrix. Eine Entfärbung ist nicht notwendig. Anschließend wird das Gel unter mehrmaligem Wechsel von A. bidest gewaschen. Zur Archivierung der Gele werden diese getrocknet und anschließend mittels Scanner digitalisiert. Hierzu werden die Gele für eine halbe Stunde in einer wässrigen Ethanol/Glycerin-Lösung bei Raumtemperatur equilibriert. Zur Trocknung werden die Gele für ein bis zwei Tage zwischen zwei Cellophanfolien auf Trockenrahmen gespannt.

### 3.2.9.3 Western-Blot

Nach der SDS-Page werden die Proteine auf PVDF-Membran geblottet. Zum Transfer der Proteine werden zwei in Transfer-Puffer getränkte Filterpapierlagen vorgelegt. Darauf wird die zuvor mit Methanol benetzte PVDF-Membran gelegt, gefolgt von dem in Transfer-Puffer equilibrierten SDS-Page-Gel. Bedeckt wird das Ganze noch einmal von zwei Lagen in Transferpuffer getränktem Filterpapier. Der Transfer erfolgt nach Aufsetzen der oberen Elektrodenplatte für 35 min bei 10 V in einer semi-dry Elektroblothing-Apparatur. Anschließend wird die Apparatur abgebaut und die PVDF-Membran entnommen. Vor dem Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern werden unbesetzte Bindungsstellen der Membran zunächst durch eine Inkubation mit 1x Roti® Block-Lösung (Roth, Karlsruhe) über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Membran wird anschließend mit einem für den Tag beziehungsweise das Protein spezifischen Antikörper oder zu untersuchenden Seren, verdünnt in PBS/Tween 0,1 % bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (PBS/Tween 0,1 %) wird die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-markierten sekundären Antikörper 1 h inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrritten mit PBS/Tween 0,1 % kann die Membran mit dem Substrat TMB (Sigma, Saint Louis, USA) bedeckt werden. Die Substratreaktion wird durch gründliches Spülen mit Wasser gestoppt.

### 3.2.9.4 Proteinbestimmung

Bei der quantitativen Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) wird das sich verschiebende Absorptionsmaximum von Proteinen (von 465 bis zu 595 nm) durch die Bindung an den Farbstoff Coomassie-Blau ausgenutzt. Zur Erstellung einer Eichkurve wird eine Verdünnungsreihe von bovines Serumalbumin (BSA V) in PBS im Bereich von 5 bis 100 µg hergestellt und nach Bradford-Reaktion bei 540 nm die Absorption spektralphotometrisch gemessen. Dazu werden 5 µl der Proteinlösung mit 1000 µl Bradford-Reagenz versetzt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert (5 µl PBS + 1000 µl Bradford-Reagenz). Somit können die ermittelten Extinktionswerte der zu untersuchenden Proben mit Hilfe der BSA-Eichkurve in die entsprechenden Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

### 3.2.10 Herstellung von Hyperimmunseren

Zwei Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer werden zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen CnMV mit dem aus Punkt 3.2.2.3 gewonnenen Antigen nach folgendem Schema immunisiert.

**Tabelle 14: Immunisierungsschema zur Herstellung polyklonaler Antikörper**

Tag	Bluten	Proteinmenge	Adjuvans bzw. Puffer	Applikationsart
0	x	168 µg	FAIC	i.d.
14.		250 µg	PBS	i.m.
21.	x			
28.		330 µg	PBS	i.m.
45.	x			

Die terminale Entblutung erfolgt durch Herzpunktion am narkotisierten Tier. Zur Narkose werden zuvor Ketamin (60 mg/kg) und Xylazin (3 mg/kg) in einer Mischspritze intramuskulär verabreicht. Das Immunserum wird nach Gerinnung und Kontraktion des Koagulats (bei 4 °C über Nacht) mittels Zentrifugation (15 min, 3000 g, 4 °C) gewonnen.

Die Herstellung polyklonaler Antikörper im Kaninchen wurde dem Sächsischen Sozialministerium in Dresden angezeigt (AZ 24-9168.22-02-V4/04).

### 3.2.11 Serumneutralisationstest (SNT)

Die Seren werden vor der Verwendung im Serumneutralisationstest 30 min bei 56 °C inaktiviert und anschließend logarithmisch zur Basis zwei mit Zellkulturmedium im Doppelansatz verdünnt. Nach Zugabe von 100 TCID<sub>50</sub>/0,1 ml CHV 11 wird das Serum-Virus-Gemisch für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Athmosphäre inkubiert. Anschließend werden je Well 100 µl des Gemisches auf MDCK-Zellen übertragen und die Platten für 48 bis 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Athmosphäre inkubiert. Pro Testansatz wurden negative, stark und schwach positive Kontrollseren sowie Zellkontrollen mitgeführt. Anhand der Virusrücktitration wird die tatsächlich eingesetzte Virusdosis zur Kontrolle bestimmt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch. Die Beechung der Serumneutralisationstiter wurde nach der Methode von KAERBER (1931) vorgenommen. Seren mit einem Titer von unter 1:4 werden als negativ bezeichnet.

### 3.2.12 Indirekter Immunofluoreszenztest (IFT)

Im Rahmen der serologischen Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen CnMV werden in Mikrotiterplatten WRCC-Zellen ausgesät und mit einer MOI von 0,1 mit CnMV infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h werden die Zellen nach Ausschlagen des Kulturmediums sowie zweimaligem Waschen mit PBS mit einem eiskalten Aceton:Methanol (1:1) für 15 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert. Nach Abtrocknen der Platten an der Luft können diese bis zum Gebrauch bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden oder werden sofort weiterverwendet. Unspezifische Bindungsstellen werden zunächst durch eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 1 % Roti® Block-Lösung in PBS abgesättigt. Pro Well werden 100  $\mu\text{l}$  der Serumverdünnung gegeben und für mindestens 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion des primären Antiköpers erfolgt nach dreimaligem Waschen mit PBST mit einem 1:200 verdünnten sheep-anti-dog-IgG-FITC-Konjugat. Für die Bestimmung des Titors der im Kaninchen gewonnenen Hyperimmunseren wird der 1:100 verdünnte goat-anti-rabbit-IgG-Cy2 konjugierte Antikörper zur Detektion verwendet. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 h im Dunkeln werden die Platten gewaschen und durch Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  PBS je Well vor Austrocknung geschützt. Die Auswertung der antigenspezifischen Fluoreszenz erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop und wird digital dokumentiert. Alle aus einem ersten Screening bei einer Verdünnung von 1:10 positiv getesteten Seren werden in einem zweiten Test im Doppelansatz titriert.

### 3.2.13 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen CnMV

Optimale Konzentrationen des Coating-Antigens, der Seren und des Konjugats werden zuvor durch checkerboard-Titrations bestimmt. Jedes Well einer Maxisorp-Platte (Greiner) wird mit 200 ng des Antigens verdünnt in Bindepuffer über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nichtadsorbiertes Antigen wird durch Waschen mit PBS/Tween 0,1 % entfernt und die Platte wird mit 150  $\mu\text{l}$  je Well einer 3 %igen BSA/PBS-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Platten werden vor der Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  je Well der zu testenden Serumverdünnung dreimal mit 300  $\mu\text{l}$  PBS/Tween 0,1 % gewaschen. Die zu testenden Seren werden beginnend ab 1:10 logarithmisch zur Basis zwei in der Blocking-Lösung verdünnt. Die Inkubation der Platte mit den Seren erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschens wird 100  $\mu\text{l}$  des 1:5000

verdünnten peroxidase-markierten anti-dog-IgG-Konjugats zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wird gewaschen und es folgt die Zugabe des Substrates TMB. Nach 10-minütiger Inkubation in der Dunkelheit wird die Farbreaktion mit 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Extinktion spektralphotometrisch bei 450 nm gemessen.

### 3.2.14 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgt mit SPSS 11.5 für Windows. Die Merkmale Geschlecht, Alter, Rasse, Zwingergröße, Fruchtbarkeitsstörungen und Zahl der Ausstellungsbesuche werden einzeln unter Anwendung des Chi-Quadrat-Tests im Hinblick auf Signifikanz mit der Seroprävalenz von CHV-1 untersucht. Als Signifikanzniveau wird bei zweiseitiger Fragestellung eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ( $p < 0,05$ ) vorgegeben.

Die Bestimmung des Konfidenzintervall für die Seroprävalenz in der Grundgesamtheit erfolgt mithilfe der Binomialverteilung unter Voraussetzung einer statistischen Sicherheit von 95 % nach folgender Formel:

$$p \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Seroprävalenz  $p$ :

$$p = \frac{k}{n}$$

$k$  = Anzahl seropositiver Seren

$n$  = Gesamtzahl der untersuchten Seren

Die Odds Ratio lässt sich mit „relative Chance“ übersetzen und ist eine Möglichkeit, die Anteilswerte innerhalb einer Vierfeldertafel miteinander zu vergleichen. Der sich ergebende Faktor ist Ausdruck für die Stärke des Unterschieds zwischen zwei Gruppen. Die Bestimmung der Odds Ratio (OR) erfolgt in dieser Arbeit für das Verhältnis des Geschlechts zum serologischen Status nach folgender Formel:

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

Dabei stehen die Buchstaben für die jeweiligen Anteilswerte in der Vierfeldertafel.

	weiblich	männlich	
seropositiv	a	b	a+b
seronegativ	c	d	c+d
	a+c	b+d	

Die Bestimmung des Konfidenzintervall für die Odds Ratio (OR) erfolgt unter Voraussetzung einer statistischen Sicherheit von 95 % nach folgender Formel:

$$Intervall = (e^{x_1}; e^{x_2})$$

$$x_1 = \ln OR + 1,96 \cdot s$$

$$x_2 = \ln OR - 1,96 \cdot s$$

$$s = \sqrt{\left( \frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d} \right)}$$

## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Verbreitung des caninen Herpesvirus und des Canine Minute Virus (canines Parvovirus Typ-1) unter Zuchthunden in Deutschland zu untersuchen. Die Bestimmung der Seroprävalenz von CHV-1 und CnMV erfolgt mit indirekter Immunofluoreszenz und Serumneutralisation. Um die Nachweismöglichkeiten von CnMV zu verbessern und zu vereinfachen, war es ein Teilziel der Arbeit, das Oberflächenprotein VP2 von CnMV rekombinant herzustellen und dessen Einsatz im ELISA zu testen.

### 4.1 Virusanzucht

#### 4.1.1 Virusvermehrung

##### CHV-1 auf MDCK

Der cytopathische Effekt von CHV-1 auf CnMV ist gekennzeichnet durch initiale Abrundung der Zellen an fokalen Stellen des Zellmonolayers. Es kommt zentral in den Plaques zur Ablösung und Lyse der Zellen. Dieser Prozess setzt sich mit fortschreitender Infektionszeit nach peripher fort. Ein 100 %iger cpE ist gekennzeichnet durch vollständige Ablösung der Zellen vom Boden und deren Lyse. In Abbildung 29 ist die Entwicklung des für CHV-1-typischen cpE fotografisch festgehalten worden.

Zu Beginn der Arbeit stellte sich das Problem, dass der verwendete CHV-1-Stamm bedingt durch die lange Lagerung einen sehr niedrigen Titer ( $10^{0,125}$  TCID<sub>50</sub> /100 µl) hatte. Nach zweimaliger Passage gelang es, den Titer auf eine TCID<sub>50</sub> von  $10^{3,63}$ /100 µl zu erhöhen. Die im SNT verwendeten Viruspassagen hatten Virustiter im Bereich von  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/100 µl.

Durch den membranschädigenden Gefrier- und Tauprozess verliert ein Großteil der Virionen seine Hülle und damit seine Infektiosität. Ähnliches konnte später beobachtet werden. Der Titer eines Virusaliqots sank während einer sechsmonatigen Lagerung bei  $-80$  °C von  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/100 µl auf Null.

In einem anderen Infektionsversuch wurde der Titer getrennt in Medium und Zellen bestimmt. Extrazellulär betrug der Titer 20 h p.i. nur  $10^{0,88}$ /1 ml. Intrazellulär wurde



zum selben Zeitpunkt eine  $TCID_{50}$  von  $10^{3,16}/1$  ml ermittelt. Die Ergebnisse bestätigen die in der Literatur von AURELIAN (1969) beschriebenen Beobachtungen, dass die Viren zellassoziiert auftreten. Erst bei großflächiger Zelllyse werden die Viren in das Medium abgegeben.

### **CnMV auf WRCC**

Der cpE von CnMV auf WRCC-Zellen ist charakterisiert durch Zellabrundung, Ausbildung langer strahlenförmiger Zellfortsätze und Zelllyse mit Ablösung der Zellen vom Boden. Der cpE tritt durchschnittlich nach 3 bis 4 Tagen auf. Im Anhang sind in Abbildung 30 Bilder des für CnMV typischen cpE zusammengestellt.

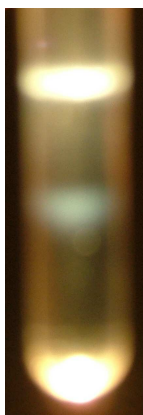
4 Tage nach Infektion von WRCC-Zellen mit einer MOI von 2,1 betrug der Virustiter  $10^5$   $TCID_{50}/100$   $\mu$ l. Für die Herstellung des Immunisierungsantigens zur Produktion polyklonaler Antikörper im Kaninchen wurde insgesamt 1 l Zellsuspension mit CnMV infiziert.

### **CnMV auf MDCK**

WRCC-Zellen gelten als die einzig permissive Zelllinie für CnMV. In der Literatur berichtet MOCHIZUKI et al. (2002) von der erfolgreichen Anzucht von CnMV auf MDCK. Die Infektion von den in unserem Labor verwendeten MDCK-Zellen mit CnMV führte nicht zur Ausprägung eines cpE.

### 4.1.2 Virusaufreinigung

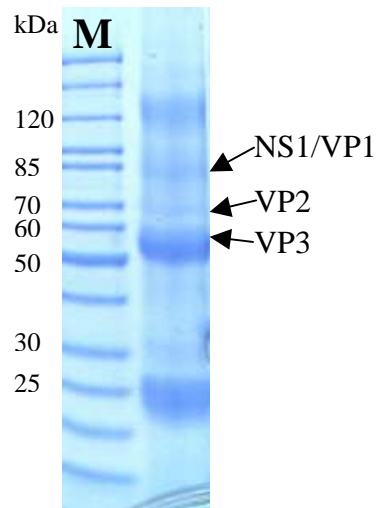
Für die Immunisierung der Kaninchen zur Herstellung von Hyperimmunseren werden insgesamt mindestens 1,5 mg virales Antigen benötigt. Um diese Menge herzustellen, wurde insgesamt 1 l Zellsuspension ( $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml) mit CnMV infiziert und ausgesät. Nach 4 Tagen Inkubation entwickelte sich ein vollständiger cpE. Das Protokoll zur Aufreinigung setzt sich aus verschiedenen konzentrierenden und reinigenden Schritten zusammen. Nach einem zweimaligen Gefrier- und Tauzyklus befindet sich die Mehrheit der Virionen im Medium und wird über Nacht mit PEG präzipitiert. Durch die Behandlung von CnMV mit Chloroform verlieren die Virionen ihre Infektiosität nicht. Alle Parvoviren sind chloroformstabil. Es folgt die Ultrazentrifugation über einen isopyknischen CsCl-Gradienten. Während der 21-stündigen Zentrifugation bildet sich im Röhrchen ein Dichtegradient aus. Am Boden des Röhrchens ist die Dichte der Flüssigkeit größer als im oberen Teil. Die Virionen sammeln sich in derjenigen Schicht an, die ihrer eigenen Dichte entspricht (siehe Abbildung 6). Die Dichte von CnMV ist durch die Arbeit von MACARTNEY et al. (1988) bekannt und beträgt  $1,40 - 1,44 \text{ g/cm}^3$ . Reife Partikel haben eine höhere Dichte als leere Partikel. Die Banden wurden abgezogen und pelletiert. Der Proteingehalt des resuspendierten Pellets betrug  $2,8 \text{ mg/ml}$ . Zur Überprüfung der Reinheit wurde das Antigen in der SDS-Page (siehe Abbildung 7) untersucht. Vier der sieben sichtbaren Banden entsprechen nach den Molekulargewichten viralen Proteinen von CnMV (Tabelle 3). Bei der Bande im Bereich von ca. 130 kDA handelt es sich wahrscheinlich um Dimere beziehungsweise Aggregate von VP2. Im Western Blot reagieren sowohl



seropositive Hundeseren als auch die Hyperimmunseren der Kaninchen mit dieser Bande. Durch den Vergleich mit nichtinfizierten WRCC-Zellen im Western Blot konnte ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um zelluläre Proteine handelt (siehe Abbildung 8).

**Abbildung 6 : Bild nach Ultrazentrifugation über CsCl-Gradienten**

*In dem dargestellten Röhrchen für einen SW41 Rotor(Beckmann) wurden 9 ml CsCl-Lösung mit einer eingestellten Dichte von  $1,39 \text{ g/cm}^3$  mit 1 ml Virussuspension überschichtet und anschließend für 21h bei 40 000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die beiden opalisierenden Banden werden einzeln durch seitliches Einstechen mit einer Kanüle abgezogen.*



**Abbildung 7: SDS-PAGE des Immunisierungsantigen**

Zur Überprüfung der Reinheit wurde die aufkonzentrierte Virussuspension in der SDS-Page analysiert. Es sind insgesamt sieben Banden zu sehen. Vier dieser Banden können den viralen Proteinen NS1, VP1, VP2 und VP3 von CnMV zugeordnet werden. Zusätzlich sind zwei zarte Banden im Bereich von ca. 40 und 35 kDa zu sehen, die wahrscheinlich Verunreinigungen mit Zellproteinen von WRCC darstellen. Im Western Blot reagieren die im Kaninchen hergestellten Hyperimmunsereen sehr stark mit der obersten Proteinbande (ca. 130 kDa). Es handelt sich hier möglicherweise um Dimere von VP2. **M**: Marker; PageRuler™ Protein Ladder, Fermentas.

## 4.2 Herstellung von polyklonalen Antikörpern im Kaninchen

### 4.2.1 Immunisierung und Gewinnung des Blutes

Das Immunisierungsprotokoll zur Herstellung polyklonaler Antikörper sieht initial eine intradermale Injektion von aufkonzentriertem und aufgereinigtem CnMV zusammen mit inkompletten Freund's Adjuvans vor. Die Gesamtmenge wurde nach Rasur und Desinfektion zwischen den Schulterblättern auf 10-15 Depots verteilt. Nach zwei und vier Wochen wurde mit ansteigenden Proteinmengen geboostert. Die errechnete Menge an Proteinlösung wurde bei den Boosterungen mit PBS auf ein Gesamtvolumen von ca. 0,5 ml verdünnt und intramuskulär verabreicht. Um individuelle Unterschiede in der Immunantwort auszugleichen und die Gesamtmenge an Serum zu erhöhen, wurden zwei Kaninchen parallel immunisiert.

Bei der terminalen Entblutung konnten von beiden Kaninchen insgesamt 115 ml Blut und daraus 58 ml Serum gewonnen werden. Die Lagerung erfolgt bis zur weiteren Verwendung aliquotiert bei -20 °C.

### 4.2.2 Titerbestimmung

Die Analyse der Seren erfolgte im Serumneutralisationstest und im indirekten Immunofluoreszenztest für beide Kaninchen getrennt. Die Titer sind in Tabelle 15 aufgelistet.

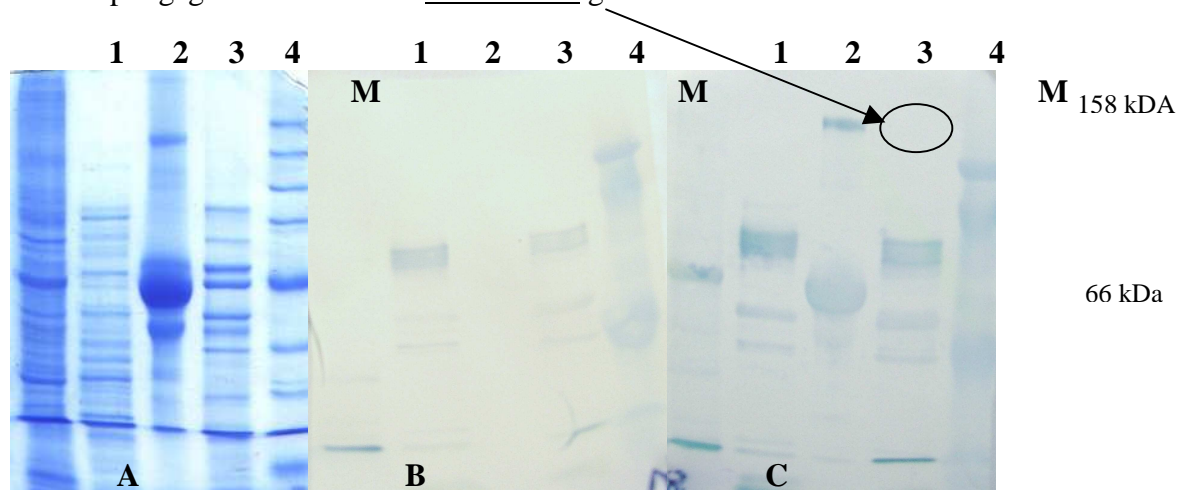
**Tabelle 15: Titerbestimmung Hyperimmuseren**

	Kaninchen 1			Kaninchen 2		
	NB	ZwB	EB	NB	ZwB	EB
IFT	negativ	negativ	1:20	negativ	n.u.	1:160
SNT	ct	1:20	1:40	negativ	1:100	1:320

*NB – Nullblutung, ZwB – Zwischenblutung, EB – Endblutung, IFT – indirekter Immunofluoreszenztest, SNT – Serumneutralisationstest, ct – cytotoxisch, n.u. - nicht untersucht.*

### 4.2.3 Einsatz der Hyperimmuseren in ELISA und Western Blot

Die sehr guten Ergebnisse bei den ersten Tests (siehe Anhang 9) des Hyperimmuseren im ELISA mit dem rekombinanten CnMV-VP2 mussten in Frage gestellt werden, da die Seren in späteren Tests starke Kreuzreaktionen mit diversen Bakterien- und Hefeproteinen sowie mit Pflanzenextrakten zeigten (persönliche Mitteilung von Dr. Marcus Riehl, Fa. Novoplant, Gatersleben, Februar 2005). In Abbildung 8 ist zu sehen, dass die hohen Extinktionen durch *E.coli* spezifische Antikörper bedingt sind. Auch hier sind Antikörper gegen die Bande bei ca.130 kDa gebildet worden.



**Abbildung 8: SDS-PAGE und Western Blot mit den Hyperimmuseren**

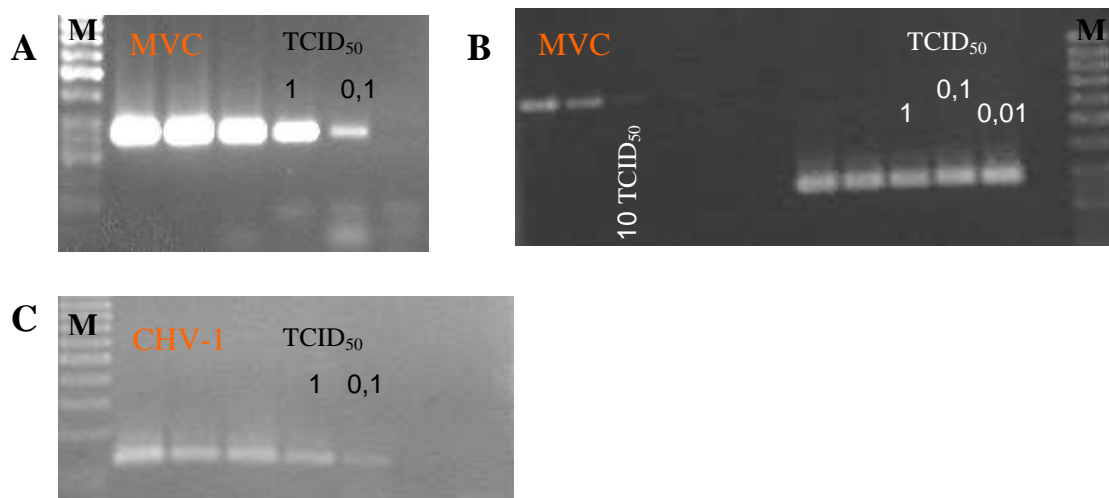
*A: In der SDS-Page wurden nichtinfizierte WRCC-Zellen (1), *E.coli* (2), CnMV (3) und das rekombinante CnMV-VP2 (4) aufgetragen. B: Western Blot mit Nullserum von Kaninchen 2. C: Western Blot mit Endserum von Kaninchen 2. Beide Seren wurden in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. M: Marker, Broad Range (A) und Prestained (B und C), NEB.*

### 4.3 Sensitivität und Spezifität der diagnostischen PCR

Zur Optimierung der analytischen Sensitivität der PCR zum Nachweis von CnMV und CHV-1 wurden verschiedene  $MgCl_2$ -Konzentrationen (1,5-3,5 mM), Primer Konzentrationen (0,2 und 0,4  $\mu M$ ), Annealing-Temperaturen (47-68 °C) und Anzahl der Zyklen (35,40) getestet. Als Optimum wurden die in Tabelle 9 dargestellten Reaktionsbedingungen ermittelt.

Die analytische Sensitivität des Nachweises von CnMV mit dem Primerpaar CnMV12s und CnMV5as wurde experimentell ermittelt und beträgt 0,1 TCID<sub>50</sub>/100  $\mu l$ . Die Sensitivität kann durch eine vorgeschaltete PCR mit den Primern CnMV12s und CnMV18as im Sinne einer Seminested-PCR auf 0,01 TCID<sub>50</sub>/100  $\mu l$  erhöht werden.

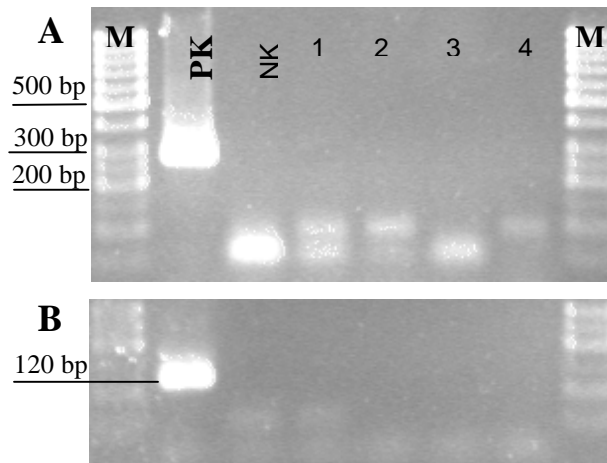
Die Nachweisgrenze der PCR für CHV-1 mit dem aus der Literatur entnommenen Primerpaar CHVgBr und CHVgBf liegt bei 1 TCID<sub>50</sub>/100  $\mu l$ .



#### Abbildung 9: Analytische Sensitivität der diagnostischen PCR

Die Bestimmung der Sensitivität erfolgte mit aus Zellkulturüberstand aufgereinigter viraler DNA. Die DNA wurde logarithmisch zur Basis 10 verdünnt. Es sind die Verdünnungen, die 1 und 0,1 TCID<sub>50</sub> entsprechen, beschriftet. A: PCR mit Primerpaar CnMV12s und CnMV5as. B: Seminested-PCR zum Nachweis von CnMV. Am Anfang des Gels sind die Amplifikate aus der ersten PCR mit den Primern CnMV12s und CnMV18as aufgetragen. Diese Produkte wurden als Template in einer zweiten PCR mit den Primern CnMV12s und CnMV5as eingesetzt. Dadurch erhöht sich die Sensitivität auf 0,01 TCID<sub>50</sub>.

C: Darstellung Sensitivität für den Nachweis von CHV-1. M : Marker.



**Abbildung 10: Spezifität der diagnostischen PCR**

Darstellung der Spezifität der PCR zum Nachweis von **A:** CnMV mit dem Primerpaar CnMV12s und CnMV5a und **B:** CHV-1 mit dem Primerpaar CHVgBr und CHVgBf.

In der ersten und der letzten Reihe befindet sich der 50 bp-Marker. **PK:** Positivkontrolle;

**NK:** Negativkontrolle;

**1:** bei (A) CHV-1 bei (B) CnMV, **2:** felines Herpesvirus, **3:** canines Parvovirus Typ 2, **4:** porcines Parvovirus.

## 4.4 Untersuchung des Probenmaterials

### 4.4.1 Untersuchung Organproben

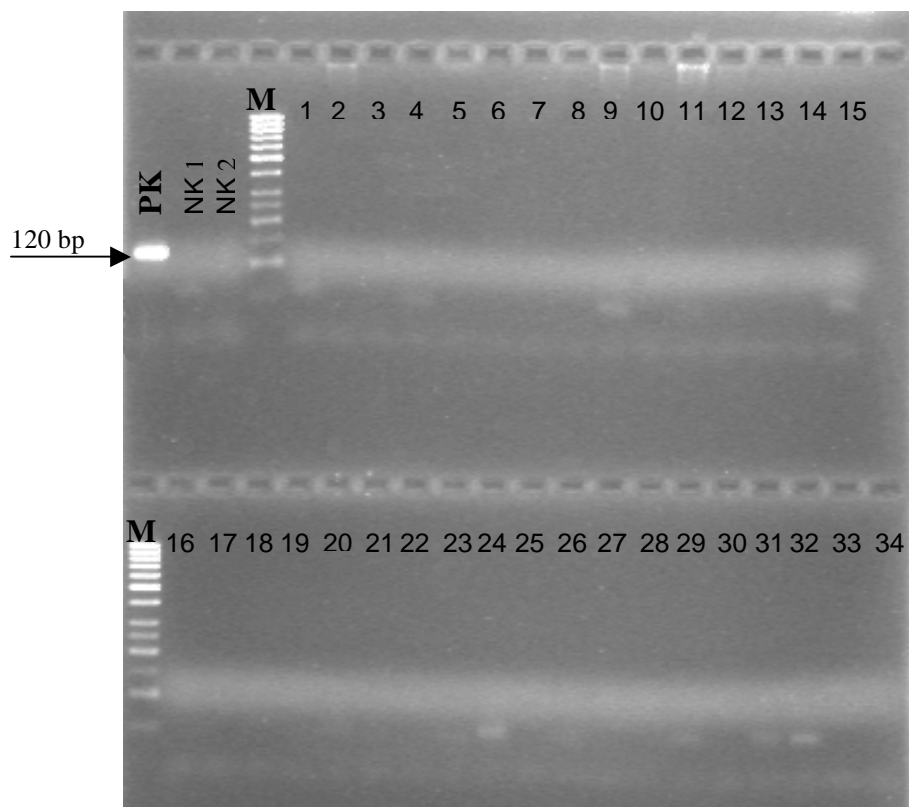
Aus 14 Würfen mit akut auftretender Welpensterblichkeit wurden insgesamt 37 Welpen zur Untersuchung eingeschickt. Von jedem Welpen wurden folgende Organproben entnommen und mit PCR auf CHV-1 und CnMV untersucht: Thymus, Lunge, Herz, Leber, Niere, Milz und Jejunum. Im Anhang sind in Tabelle 24 die Daten und die Ergebnisse zu den einzelnen Würfen und Welpen zusammengefasst dargestellt. In keinem Fall konnte CHV-1 oder CnMV nachgewiesen werden.

### 4.4.2 Untersuchung Spermaproben

Untersuchungen hinsichtlich des Nachweises des caninen Herpesvirus in Hundesperma gibt es nicht. Das bovine Herpesvirus wird über das Sperma beim Deckakt übertragen. Rindersperma wirkt inhibitorisch in der PCR. In Voruntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass auch Hundesperma eine inhibitorische Wirkung beim Nachweis von CHV-1 von der PCR hat. Die Sensitivität der PCR reduzierte sich beim Einsatz von Vollsperma um den Faktor 10. Wird nur das Seminalplasma untersucht, tritt eine geringere Inhibition auf.

Insgesamt konnten Spermaproben von 34 Hunden in die Untersuchung einbezogen werden. 31 Proben davon wurden von Frau Prof. Günzel-Apel, Hannover zur Verfügung gestellt. Drei Proben wurden von Tierarztpraxen eingesandt. In Anhang 1 sind die Daten zu jeder Probe, soweit bekannt, sowie die Ergebnisse zusätzlicher serologischer Untersuchungen tabellarisch zusammengefasst.

Es erfolgte die Modifikation des DNA-Aufreinigungsprotokolls gemäß den Empfehlungen des Herstellers (siehe 3.2.3). Das Sperma wurde vor der DNA-Aufreinigung mit dem Puffer X2 vorbehandelt. In der anschließenden PCR zum Nachweis von CHV-1 war das Ergebnis aller 34 Proben negativ.



**Abbildung 11: Ergebnisse der PCR auf CHV-1 bei 34 Spermaproben**

In der oberen Reihe sind zunächst die Kontrollen auf das Gel aufgetragen. PK: Positivkontrolle CHV-1. NK 1: Negativkontrolle 1, CnMV; NK 2: Negativkontrolle 2; A. bidest. Bei dem Marker (M) handelt es sich um einen 50 bp-Marker. Die Größenangabe des Fragmentes steht links neben der Abbildung. Dann folgen die PCR-Produkte aller untersuchten 34 Spermaproben. In Anhang 1 dieser Arbeit sind die Spermaproben und die dazu zur Verfügung stehenden Daten entsprechend der Reihenfolge im Gelbild aufgelistet.

#### 4.4.3 Untersuchung Kotproben

Canine Parvoviren werden über den Kot ausgeschieden. Das Canine Minute Virus (CnMV) wurde 1967 aus dem Kot eines klinisch unauffälligen Hundes isoliert. Deshalb erfolgte die Untersuchung der Kotproben mittels PCR nur für CnMV. Alle 16 eingesandten Kotproben waren in der PCR negativ für CnMV.

#### 4.4.4 Untersuchung Tupferproben

Herpesviren werden über die Schleimhäute und ihre Sekrete ausgeschieden. Die eingesandten Tupferproben stammen von Hunden mit Verdacht auf akute Herpesvirusinfektion. Insgesamt konnten 37 Tupferproben untersucht werden. Die Abstriche erfolgten an folgenden Lokalisationen: Vagina (n = 18), Rachen (n = 12), Rachen und Vagina (n = 2), Nase (n = 1), unbekannte Lokalisation (n = 4). Bei einzelnen Proben wurde parallel zur Untersuchung mit PCR versucht, Viren in Zellkultur zu isolieren. Das PCR-Ergebnis sowie die Virusisolierung aller Tupferproben war negativ.

### 4.5 Herstellung des rekombinanten VP2 von CnMV

Für die Herstellung und Entwicklung eines diagnostischen Testes zum Nachweis von CnMV wird virales Antigen in ausreichender Menge und hoher Reinheit benötigt. Hierzu wurde das pET-Expressionssystem (Fa. Novagen, UK) ausgewählt. Prokaryotische Expressionssysteme haben den Vorteil, dass die Kultivierung von *E.coli* einfach und mit geringem technischen Aufwand möglich ist. Das erste rekombinante Protein liegt bei optimalem Verlauf innerhalb relativ kurzer Zeit nach Auswahl der Oligonukleotide für die Klonierung vor. Etablierte Expressions- und Aufreinigungsprotokolle erlauben eine kontinuierliche und standardisierte Produktion des gewünschten Proteins in hoher Ausbeute.

#### 4.5.1 Klonierung des VP2-Gens von CnMV

Zunächst erfolgte der Einbau des VP2-Gens in den Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO. Durch das *lacZ $\alpha$* -Gen im Vektor ist die Identifizierung positiver Klone durch Blau-Weiß-Selektion erleichtert. Mehrere weiße Kolonien wurden zufällig gepickt und die daraus aufgereinigten Plasmide analysiert. Nach Restriktionsverdau und Sequenzierung verblieb von den zehn ausgewählten Kolonien nur eine mit vollständig und korrekt

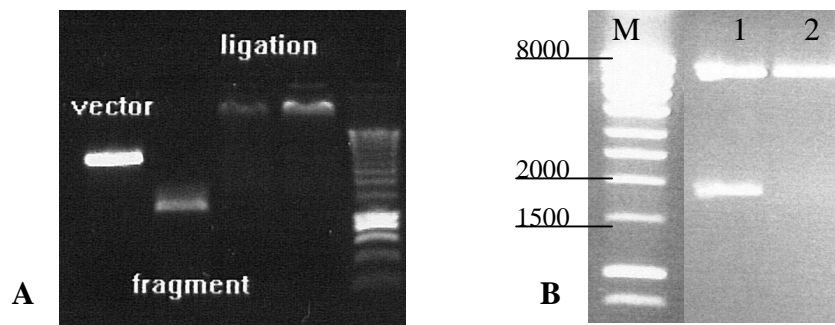


eingebautem VP2-Gen. Die Subklonierung erfolgte parallel in drei verschiedene Expressionsvektoren. Alle ausgewählten Vektoren ermöglichten die Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Metallaffinitätschromatographie durch einen endständigen His-Tag. Beim Vektor pET16b befindet sich der His-Tag N-terminal und lässt sich später vom aufgereinigten Protein enzymatisch abspalten. Der Vektor pET22b(+) zeichnet sich durch einen C-terminalen Hexahistidinrest aus, der sich nicht abspalten lässt und besitzt zusätzlich eine Signalsequenz für den Transport des Proteins in den periplasmatischen Raum. Die Expression wird bei beiden durch den *T7lac*-Promotor kontrolliert.

Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marcus Riehl und Dr. Martin Giersberg von der Fa. Novoplant, Gatersleben, die sich auf die Expression rekombinanter Proteine in Pflanzen spezialisiert haben, der Versuch gestartet, das VP2-Gen von CnMV in den Vektor PiCH 10990 zu klonieren und damit Tabakpflanzen zu infizieren. Trotz mehrfacher Wiederholungen gelang es jedoch nicht, das Gen in den Vektor einzubauen. Innerhalb des VP2-Gens von CnMV befinden sich zwei natürliche Schnittstellen für das Restriktionsenzym *BsaI*. In der folgenden Ligationsreaktion konnten die vier so entstandenen Fragmente nicht in der korrekten Reihenfolge und Orientierung verbunden werden. Es wuchsen keine Kolonien.

Der Vektor pET16b wurde trotz erfolgreicher Ligation und Transformation nicht weiter verwendet, da sich in der weiteren Analyse keine positiven Klone identifizieren ließen. Die Klonierung und Ligationsreaktion des VP2-Gens von CnMV in den Vektor pET22b(+) ist in Abbildung 12A dargestellt.

Zur Überprüfung, ob die aufgereinigten Expressionsplasmide pET22b(+)JMVP2 das gewünschte Fragment enthielten, wurde eine Restriktionsanalyse mit *EcoRI* und *BamHI* durchgeführt und anschließend die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Positive Klone sind im Gelbild dadurch zu erkennen, dass zusätzlich zum linearisierten Vektor (Bande bei ca. 3200 bp) das ca.1700 bpVP2-Genfragment als zweite Bande im Agarosegel zu sehen ist (siehe Abbildung 12 B).



**Abbildung 12: Klonierung und Analyse der transformierten Plasmide**

Der Vektor pET-22b(+) und das zu inserierende Fragment wurden in Vorbereitung für die folgende Ligationsreaktion mit EcoRI und BamHI geschnitten. In Bild A sind Vektor und Fragment linearisiert auf das Gel aufgetragen. Das daraus entstandene Ligationsprodukt ist auf Spur drei und vier zu sehen. Nach Transformation des Plasmids in *E.coli* müssen die positiven Klone herausgesucht werden. 20 Kolonien wurden zufällig gepickt und vermehrt. Anschließend wurden die Plasmide aufgereinigt und mit EcoRI und BamHI verdaut. Bild B zeigt das Ergebnis nach Verdau. In Spur 1 befindet sich ein positiver und in Spur 2 ein negativer Klon. Die obere Bande stellt den linearisierten Vektor (ca.7200 bp) dar. Das korrekt inserierte Fragment (1737 bp) wird als zweite Bande sichtbar. M: Smart Ladder (Eurogentec).

Um sicherzustellen, dass die inserierten Fragmente im korrekten Leseraster und ohne Sequenzabweichungen im Plasmid vorliegen, wurde dieser Abschnitt der Plasmid-DNA mit Standard-Oligonukleotiden für das entsprechende Plasmid (T7 Promotor- und T7 Terminator-Primer) sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen ergab den korrekten und vollständigen Einbau der VP2-Gens von CnMV in das Expressionsplasmid. Der schematische Aufbau des Expressionsvektors ist in Abbildung 31 dargestellt.

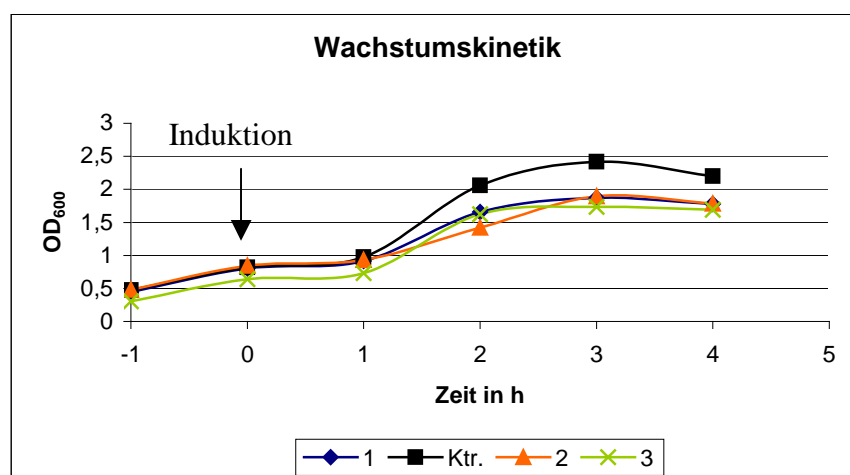
Das Expressionsplasmid wurde in den *E.coli* Expressionsstamm BL21Codon-Plus(DE3)RIL transformiert. Es erfolgte zunächst eine Testexpression im kleinen Maßstab zur Bestimmung der Ausbeute. Nach Bestimmung der optimalen Expressionsbedingungen wurde die Expression im 5 l-Ansatz wiederholt.

### 4.5.2 Induktionskinetik

Die Bestimmung der  $OD_{600}$  ist nicht nur eine einfache und schnelle Methode, um den optimalen Zeitpunkt der Induktion zu bestimmen. Während der Expression können Verlaufsmessungen des Wachstums schon Hinweise auf den Erfolg der Proteinsynthese geben. Die Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit der induzierten BL21-CodonPlus(DE3)RIL im Vergleich zur Kontrolle ist auf eine verstärkte Aktivierung des Proteinsyntheseapparates zur Herstellung des rekombinanten Proteins zurückzuführen.

Die Zellen der Kontrolle können ihre Stoffwechselaktivitäten auf die Zellteilung konzentrieren. Aus der Graphik ist weiterhin ersichtlich, dass das rekombinante CnMV-VP2 nicht toxisch für die Zellen ist.

Aufgrund der eintretenden Sättigung der Wachstumskurve kann die Gesamtdauer der nachfolgenden Großexpressionen auf 3 h begrenzt werden.



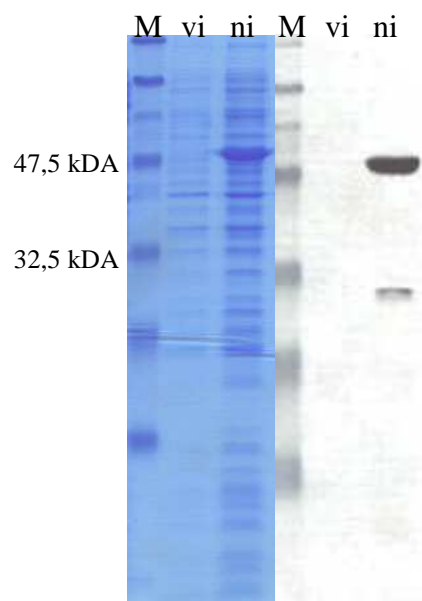
**Abbildung 13: Wachstumskurve nach Induktion mit IPTG**

Bei der Testexpression wurde die Vorkultur von pET22b(+)*JMVP2* tragenden BL21CodonPlus(DE3)RIL Zellen 1:10 mit frischem LB-Medium verdünnt und bei 37 °C inkubiert. Es wurden vier Erlenmeyerkolben parallel beimpft. Bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,8 erfolgte bei drei Kolben die Induktion mit IPTG (Endkonzentration 50  $\mu$ M) zum Zeitpunkt 0 h. Der vierte Kolben mit BL21 wurde zur Kontrolle nicht induziert. Alle Kolben wurden für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der  $OD_{600}$  erfolgte stündlich.

### 4.5.3 Expression des rekombinanten CnMV-VP2

Um die Löslichkeit des rekombinanten CnMV-VP2 zu erhöhen, erfolgte die Expression nach Induktion mit 50  $\mu$ M IPTG bei 26 °C für drei Stunden (3.2.7).

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, tritt im SDS-Gel nach der Induktion eine deutliche Bande mit einer Größe von ca. 48-50 kDa auf. Im sich daran anschließenden Western Blot mit einem anti His-Konjugat konnte bestätigt werden, dass es sich bei dieser Bande um das rekombinante Protein handeln muss. Das Protein ist deutlich kleiner als erwartet. Die in der Literatur angegebenen Molekulargewichte für die viralen Proteine von CnMV wurden in Tabelle 3 aufgeführt. Bei der zweiten Bande im Western Blot im Bereich von ca. 30 kDa handelt es sich um die Chloramphenicol Acetyl Transferase. Dieses histidinreiche Protein ist für die Chloramphenicol-Resistenz der verwendeten BL21 verantwortlich und wird durch das anti His-Konjugat erkannt.



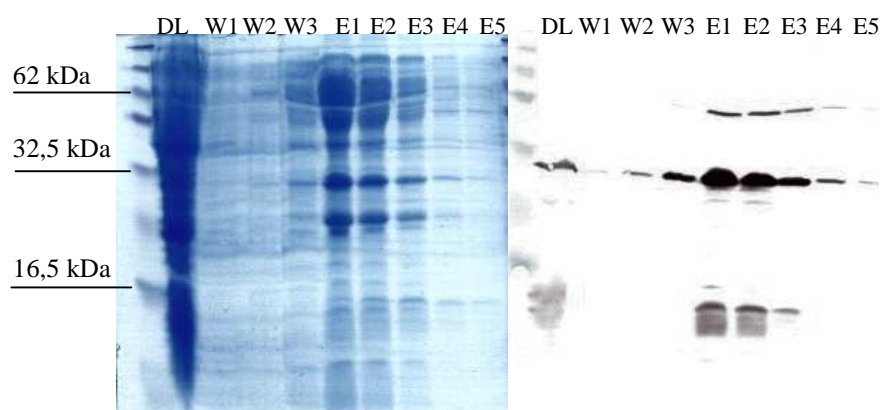
**Abbildung 14: Induktion der Expression mit IPTG**

*Aufgetragen ist das Zellysate von BL21CodonPlus(DE3)Ril in der SDS-PAGE und Western Blot mit anti His-Konjugat unmittelbar vor und 3 h nach Induktion der Expression mit IPTG. vi: vor Induktion; ni: nach Induktion. M: Marker.*

#### 4.5.4 Proteinaufreinigung

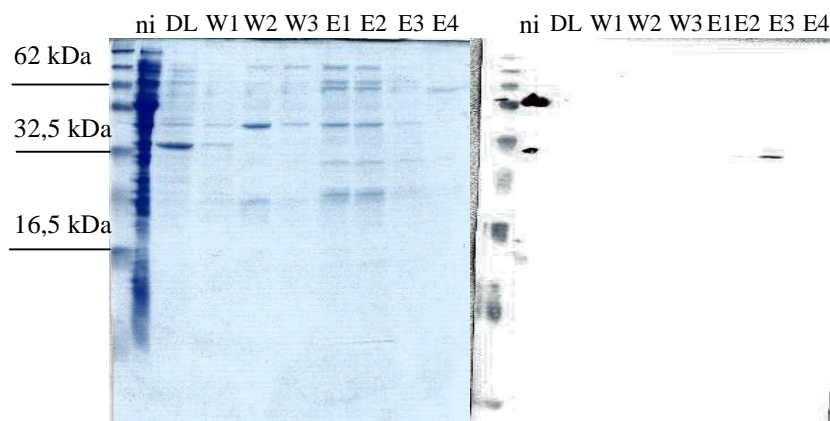
Insgesamt wurden 5 l Medium mit Bakterien infiziert und nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,8 die Expression mit IPTG (Endkonzentration 50  $\mu$ M) induziert. Nach 3-stündiger Inkubation bei 26 °C wurde das Zellysate zentrifugiert. Im ersten Schritt wurde der cytoplasmatische vom periplasmatischen Extrakt getrennt. Die Aufreinigung des rekombinanten CnMV-VP2 erfolgte jeweils getrennt über Ni-NTA Säulen (siehe 3.2.8). Die C-terminale Lage des His-Tags bewirkt, dass nur vollständig translatierte

Proteine mit den Nickelionen eine Bindung eingehen können. Durch das peLB-Signalpeptid sollte das exprimierte CnMV-VP2 in den periplasmatischen Raum transportiert werden. Der Vorteil dieser Translokation liegt in der verbesserten Löslichkeit des exprimierten Proteins und der einfacheren Aufreinigung infolge geringerer Kontamination mit *E.coli*-Proteinen. Die Analyse in der SDS-PAGE und im Western Blot (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16) zeigte jedoch, dass dieser Transport nicht stattgefunden hat. Das rekombinante Protein befindet sich nur im Cytoplasma und ist stark mit *E.coli*-Proteinen kontaminiert. Trotz des sich im Puffer befindlichen Imidazol ist der Reinigungseffekt des dreimaligen Waschens nur ungenügend. Im Western Blot sind in den Eluaten E1 bis E4 2 bis 5 Banden zu sehen. Bei den obersten beiden Banden handelt es sich um das rekombinante CnMV-VP2 und die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase. Nach der Induktion (Abbildung 16) ist die Bande im Bereich von 48-50 kDa sehr dick. In den Eluaten (Abbildung 15) fällt sie etwas dünner aus, ein Hinweis darauf, dass sich die Löslichkeit des Proteins im Vergleich mit den ersten Testexpressionen deutlich verbessert hat. Das Problem bei den ersten Expressionsversuchen war, dass nach der Induktion eine Bande zu sehen war, die in den Eluaten nicht mehr nachweisbar war. Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben sich unlösliche Aggregate des Proteins, so genannte Inclusionbodies gebildet (Ergebnisse nicht dargestellt). Die unteren Banden stellen Kontaminationen oder Bruchstücke dar.



**Abbildung 15: Cytoplasmatischen Aufreinigung von CnMV-VP2**

**DL:** Durchlauf; **W1-W3:** Waschschrte 1 bis 3; **E1-E5:** Elution des rekombinanten CnM-VP2 aus der Ni-NTA Matrix.



**Abbildung 16: Periplasmatischen Aufreinigung von CnMV-VP2**

*ni: 3h nach Induktion; DL: Durchlauf; W1-W3: Waschschrte 1 bis 3; E1-E5: Elutionsfraktionen des rekombinanten CnMV-VP2 aus der Ni-NTA Matrix.*

Zusätzlich wurden die Proteingehalte der einzelnen gewonnenen Eluate bestimmt (3.2.9.4) und tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 16). Nach Auswertung aller Ergebnisse wurden die Eluate E1 bis E4 des cytoplasmatischen Extrakts gepoolt und aliquotiert bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 16: Proteinkonzentration der Eluate**

Proteinkonzentration in mg/ml	E1	E2	E3	E4	E5
cytoplasmatischer Extrakt	2,4	1,9	0,5	0,1	0,2
periplasmatischer Extrakt	1,5	2,3	0,5	0,2	-

*Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford. Der Proteingehalt wurde nach der Bestimmung der Extinktion bei 595 nm durch Ablesen an einer Proteineichkurve in mg/ml ermittelt.*

## 4.6 Serumneutralisationstest (SNT)

### 4.6.1 Untersuchungen zum Zusatz von Komplement

Der Serumneutralisationstest ist Goldstandard zur Bestimmung von Antikörpern gegen CHV-1. In der Literatur sind Protokolle zur Durchführung des Testes mit und ohne den Zusatz von Meerschweinchenkomplement beschrieben. In einem Vorversuch wurden 16 zufällig ausgewählte Hundeseren nach deren Inaktivierung bei 56 °C für 30 min vergleichend mit und ohne den Zusatz von 50 µl Meerschweinchenkomplement je Well im Serumneutralisationstest getestet. Das Komplement wurde vergleichend in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:30, 1:100, 1:250, 1:500) eingesetzt.

Von den 16 untersuchten Hundeseren waren 10 sowohl mit und ohne den Zusatz mit Komplement seronegativ. Bei den restlichen 6 seropositiven Seren (A-F) war das Bild, wie in Abbildung 18 ersichtlich, uneinheitlich.

Die Zugabe von Komplement führte bei Serum D und E zunächst zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Titer, gefolgt von einem Abfall der Titer bei einer Konzentration von 1:30 bzw. 1:100, wohingegen der Titer von Serum A nur bei Erreichen einer Komplementkonzentration von 1:30 um eine Stufe anstieg und ansonsten konstant blieb. Eine Tendenz zum Abfall des Titers bei steigenden Konzentrationen war bei Serum F ersichtlich. Die Wirkung des Zusatzes von Komplement auf die Titerhöhe scheint individual unterschiedlich zu sein. Eine generelle Erhöhung der Titer findet nicht statt. Da sich das Verhältnis seronegativer zu seropositiven Seren im Vergleich zur Kontrolle ohne den Zusatz von Komplement in allen Verdünnungsstufen nicht veränderte, wurde auf den Zusatz von Komplement verzichtet.

### 4.6.2 Untersuchung der Seren

Insgesamt wurden 429 Seren zur Untersuchung eingesandt. Sechs Seren konnten aufgrund zu geringer Mengen nicht untersucht werden. Weitere sechs Seren erwiesen sich in der Zellkultur als cytotoxisch. Seren mit einem Titer von  $\geq 1:4$  wurden als positiv gewertet. Der Titer 1:4 ist methodenbedingt der untere Grenztiter. Von den 423 untersuchten Hundeseren wurden bei 119 Antikörper gegen CHV-1 festgestellt, das entspricht einem Anteil von 28,1 %. Bezogen auf die Gesamtzahl der eingesandten Seren beträgt die Seroprävalenz 27,7 %. Das Konfidenzintervall in der Grund-

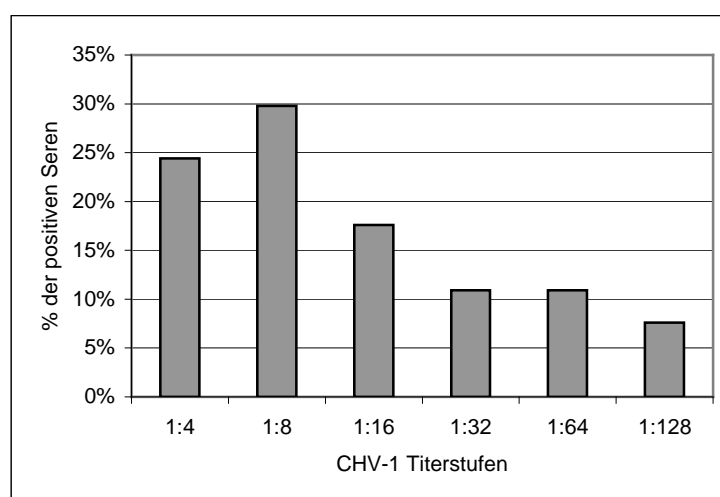
gesamtheit, das heißt alle Zuchthunde in Deutschland, liegt mit 95 %iger Sicherheit bei  $28,1 \pm 4,4$  %. Die geographische Herkunft der Seren wird in Abbildung 28 dargestellt.

Von den 40 Seren der Mutterhündinnen aus der Münchener Impfstudie aus dem Jahre 1998 hatten 24 neutralisierende Antikörper gegen CHV-1. Das sind 60 %. Der Anteil der positiven Seren aus dem Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover beträgt 15,4 % (4/26).

**Tabelle 17: Seroprävalenz von CHV-1 unter Zuchthunden in Deutschland**

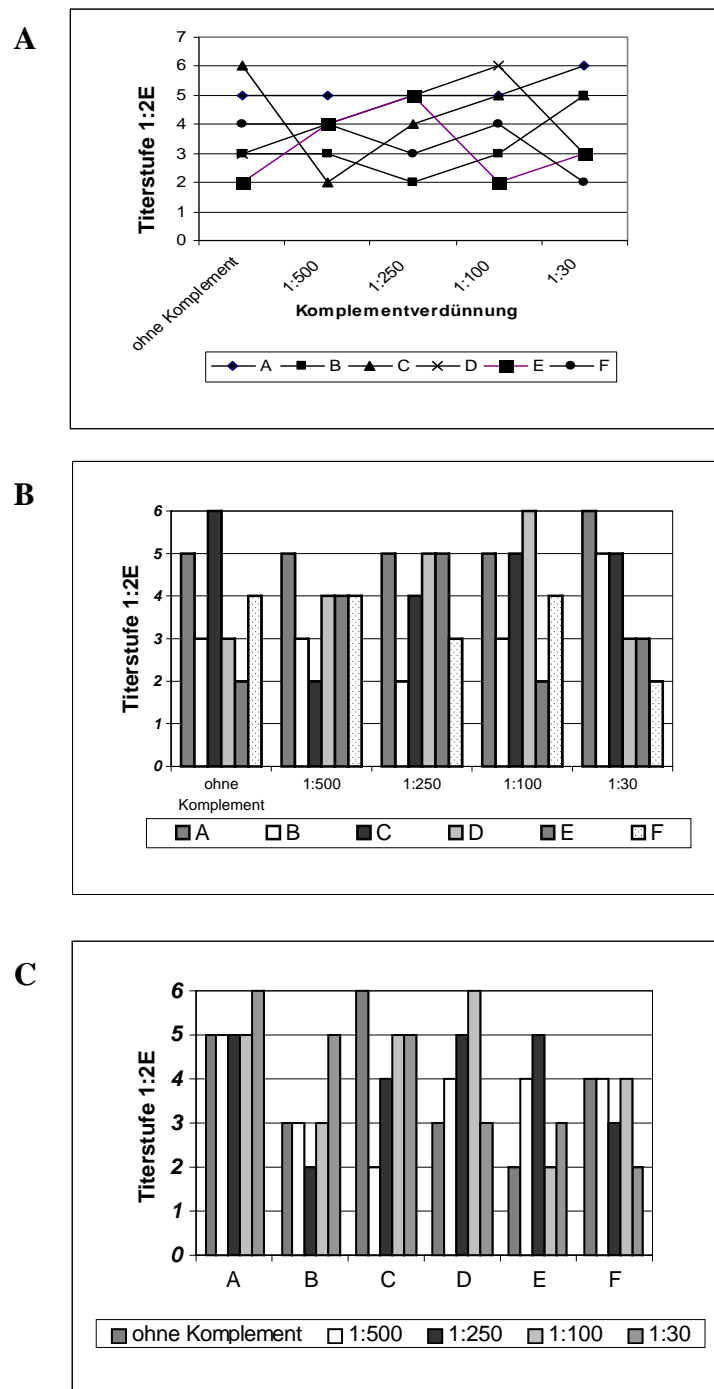
	Anzahl n Seren	Anzahl n seropositiver Seren	Prozent
Seroprävalenz (alle Seren)	429	119	27,7 %
Seroprävalenz (auswertbare Seren)	423	119	28,1 %
<u>davon aus:</u>			
Münchener Impfstudie	40	24	60 %
Institut für Reproduktionsmedizin, TiHo Hannover	26	4	15,4 %

Der höchste Antikörpertiter in dieser Studie war 1:128 und kam bei 9 Hunden vor. Die Titer der positiven Seren kamen in folgender Verteilung vor: 1:4 (n = 29), 1:8 (n = 34), 1:16 (n = 21), 1:32 (n = 13) und 1:64 (n = 13).



**Abbildung 17: Häufigkeit und Verteilung der Antikörpertiter gegen CHV-1**

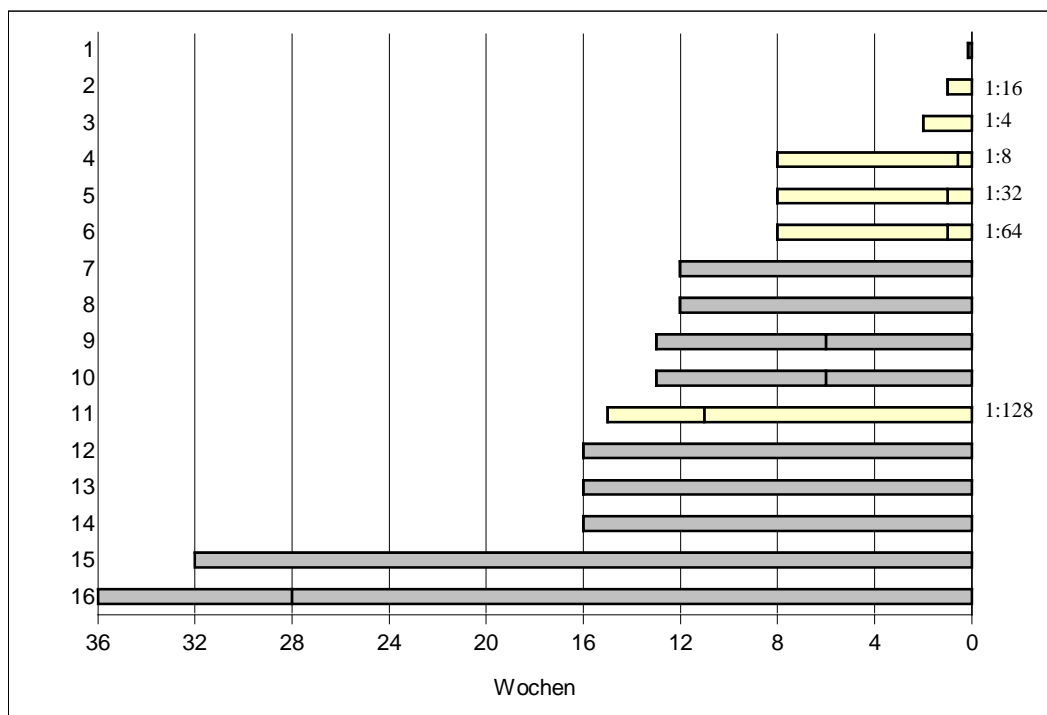




**Abbildung 18: SNT mit und ohne Zusatz von Komplement.**

Insgesamt wurden in einem Vorversuch exemplarisch 16 Hundeseren untersucht. In den Abbildungen sind nur die Ergebnisse der 6 seropositiven Seren A bis F dargestellt. In Abbildung A und B sind die CHV-1-Antikörpertiter den verschiedenen Versuchen mit und ohne den Zusatz von Komplement zugeordnet. Abbildung C: Darstellung der Titer ein und desselben Serums in den verschiedenen Versuchsansätzen mit ansteigender Komplementkonzentration.

Seit 2003 gibt es in Deutschland eine Impfung gegen das canine Herpesvirus auf dem Markt. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Serumneutralisationstest lässt sich nicht zwischen Impf- und Infektionstiter unterscheiden. Von 16 Seren ist vorberichtlich bekannt, dass die Hunde ein- ( $n = 9$ ) oder zweimal ( $n = 7$ ) geimpft wurden. Bei 10 der 16 Hunde konnten keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden. Sechs Tiere, deren erste Impfung maximal 15 Wochen vor Blutentnahme erfolgte, reagierten im Serumneutralisationstest positiv. Die Höhe der Antikörpertiter und der zeitliche Abstand zwischen Impfung(-en) und Blutentnahme sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt. Ab einer Woche nach Impfung ist eine Antikörperantwort nachzuweisen. Bei zwei Hunden sind zwölf und dreizehn Wochen nach Impfung trotz Boosterung nach sechs Wochen keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Das Serum mit der Nummer 11 wies nach Impfung in der 15. und 11. Woche vor Blutentnahme mit 1:128 den höchsten Antikörpertiter auf.



**Abbildung 19: CHV-1-Titer nach Impfung**

Die Blutentnahme geschah zum Zeitpunkt Null. Die Balken stellen den Abstand der Impfung zur Blutentnahme dar. Bei den Serennummern 4, 5, 6, 9, 10, 11 und 16 erfolgte eine Boosterung, deren Zeitpunkt innerhalb des Balkens durch einen senkrechten Strich markiert ist. Die Farbe grau signalisiert seronegative Seren. Gelb markiert sind die positiven Seren mit nebenstehender Angabe der Titerhöhe.

Insgesamt wurden Serumpaarprouben von 22 Hunden eingesandt und untersucht. Bei 21 Hunden waren weder in der ersten noch in der zweiten Serumprobe neutralisierende Antikörper gegen CHV-1 nachzuweisen. Eine vierjährige Teckelhündin (Nr. 17) hatte eine positive zweite Blutprobe mit einem Titer von 1:8. Zur Vorgeschichte ist nichts bekannt. Die Blutproben wurden in einem Abstand von 14 Tagen entnommen.

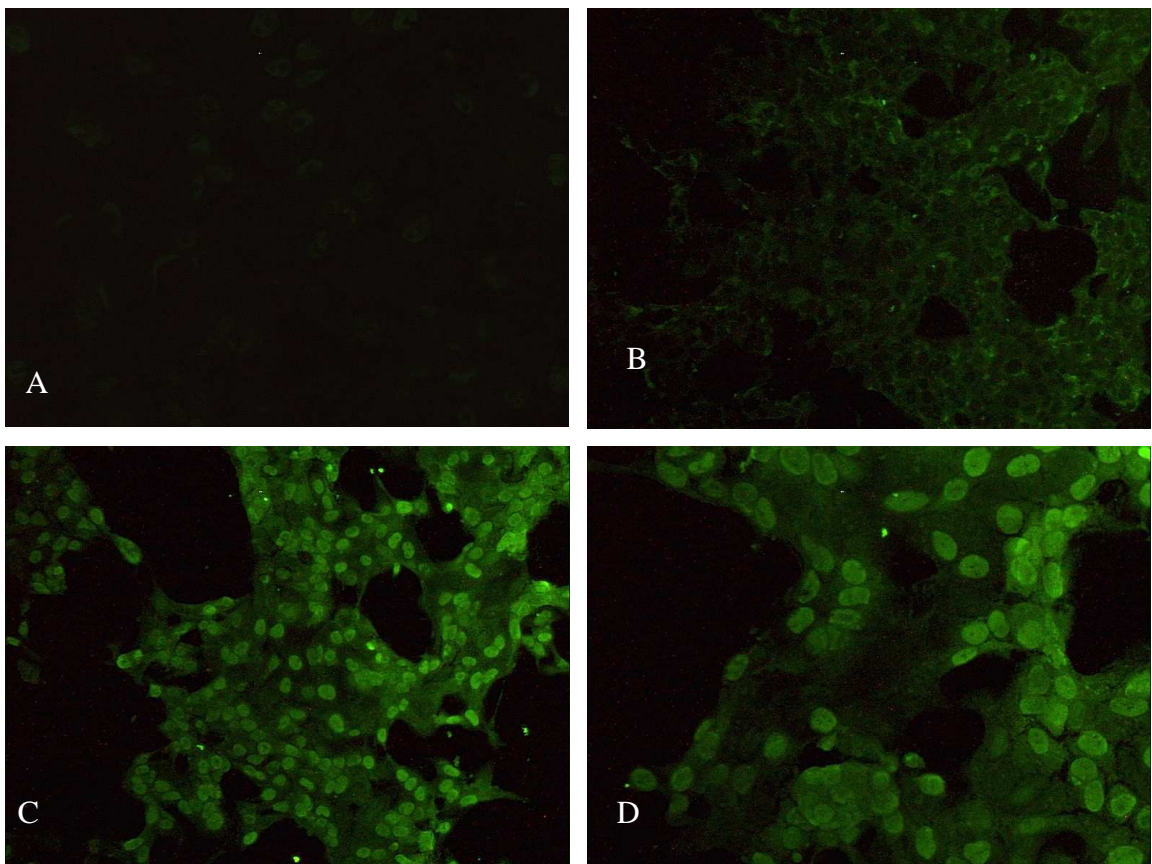
**Tabelle 18: Übersicht aller 22 Hunde mit Serumpaarprouben**

Nr.	Tgb.Nr.		Nr.	Tgb.Nr.	
	1. Serumprobe	2. Serumprobe		1. Serumprobe	2. Serumprobe
1.	220	240	12.	377	405
2.	269	270	13.	382	407
3.	271	285	14.	387	401
4.	273	279	15.	392	409
5.	267	281	16.	420	421
6.	318	319	17.	505	538 (1:8)
7.	320	321	18.	556	635
8.	322	323	19.	557	634
9.	324	325	20.	665	695
10.	330	397	21.	666	697
11.	372	403	22.	667	696

*Bei 20 Hunden konnten in beiden Serumproben keine Antikörper gegen CHV-1 und CnMV nachgewiesen werden. Eine Serokonversion für CHV-1 trat bei Hund 17 auf. Der Titer ist hinter der Tagebuchnummer in Klammern angegeben*

#### 4.7 Indirekte Immunofluoreszenz

Von den insgesamt 429 Hundeseren, die für diese Arbeit zur Verfügung standen, konnten 6 aufgrund zu geringer Menge nicht im Immunofluoreszenztest untersucht werden. 24 Seren der verbliebenen 423 Seren zeigten die für alle Parvoviren spezifische nukleäre Fluoreszenz bei einer Verdünnung von 1:10. Das entspricht einer Seroprävalenz von 5,7 %. Der Anteil seropositiver Hunde in der Grundgesamtheit aller Zuchthunde in Deutschland liegt nach Bestimmung des Konfidenzintervalls mit 95 %iger Sicherheit zwischen 3,5 % und 7,9 %. Der Anteil positiver Seren aus der Münchener Impfstudie aus dem Jahre 1998 liegt bei 10 % (4 von 40). Keines der 26 Seren aus dem Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover zeigte eine nukleäre Fluoreszenz bei einer Verdünnung von 1:10.



**Abbildung 20: IFT zum Nachweis von CnMV--spezifischen Antikörpern**

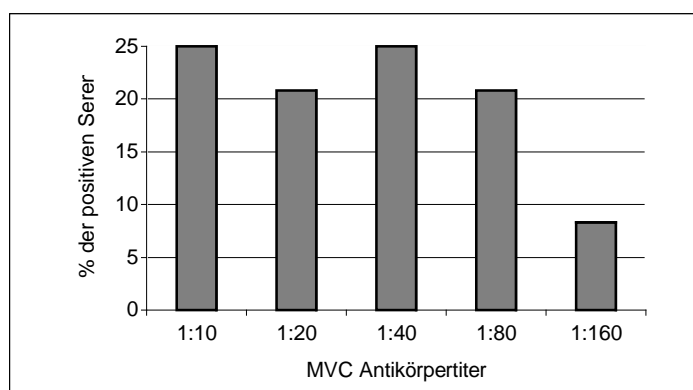
*A: Zellkontrolle, WRCC-Zellen nichtinfiziert (200x); B: negatives Hundeserum (200x); C: Positives Serum, deutliche Fluoreszenz der Zellkerne (200x); D: positives Serum, Fluoreszenz der Zellkerne bei 400x Vergrößerung.*

**Tabelle 19: Seroprävalenz von CnMV unter Zuchthunden in Deutschland**

	Anzahl n Serum	Anzahl n seropositiver Serum	Prozent
Seroprävalenz (alle Serum)	429	24	5,6 %
Seroprävalenz (auswertbare Serum)	423	24	5,7 %
<u>davon aus:</u>			
Münchener Impfstudie	40	4	10 %
Institut für Reproduktionsmedizin, TiHo Hannover	26	0	0 %

Zunächst wurden alle Serum in einem ersten Screening bei einer Verdünnung von 1:10 getestet. Alle positiven Serum wurden in einem zweiten Test zur Bestimmung des Titers im Doppelansatz logarithmisch zur Basis zwei verdünnt.

Zwei Hundeserum wiesen einen Titer von 1:160 auf. Je 6 Serum hatten einen Titer von 1:10 und 1:40. Die Titerstufen 1:20 und 1:80 traten jeweils 5mal auf.

**Abbildung 21: Häufigkeit und Verteilung der Antikörper gegen CnMV**

Alle für CnMV seropositiven Serum und die dazu bekannten Daten sind im Anhang in Tabelle 26 tabellarisch aufgeführt. Bei sieben Serum (7/24, 29,2 %) sind Antikörper sowohl gegen CnMV als auch gegen CHV-1 nachweisbar. Das sind 1,6 % aller Serum und 5,9 % der für CHV-1 positiven Serum.

## 4.8 Analyse der Riskofaktoren

Nach der Ermittlung der Seroprävalenz für CHV-1 und CnMV unter Zuchthunden in Deutschland wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich anhand der über die Seren zur Verfügung stehenden Daten Risikofaktoren ableiten lassen, die für die Seropositivität signifikant sind. Aufgrund der zu geringen Anzahl der für CnMV seropositiven Seren beschränkt sich die statistische Analyse für CnMV auf die rein deskriptive Beschreibung der Fälle. Eine statistische Analyse würde keine für die Grundgesamtheit gültigen Aussagen zulassen. Aus diesem Grund beziehen sich alle folgenden Ausführungen nur auf CHV-1. Für die Tierärzte und Züchter wurde ein Probenbegleitschein zur Verfügung gestellt, indem u. a. Angaben zur Rasse, Geschlecht, Alter, Impfung gegen Herpes, Zwingergröße und Ausstellungsbesuche erfragt wurden. Zum Teil wurden Seren ohne oder nur mit zum Teil ausgefüllten Probenbegleitscheinen eingeschickt, so dass viele Datensätze unvollständig sind. Bei den einzelnen Merkmalen wird die Anzahl der auswertbaren Datensätze für dieses Merkmal aufgeführt. Die Merkmale wurden einzeln im Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz überprüft.

### 4.8.1 Geschlecht

Von den 429 Seren fehlen von neun Tieren (2 %) die Angaben zum Geschlecht. 331 (77,2 %) Seren stammen von Hündinnen, 89 (20,7 %) von Rüden. 12 der 89 Rüden (13,5 %) waren für CHV-1 seropositiv. Bei den weiblichen Tieren betrug die Prävalenz 29,9 % (99/331). Zieht man die jeweils sechs Seren ab, die cytotoxisch waren oder aufgrund der zu geringen Menge nur im Immunofluoreszenztest untersucht werden konnten, erhöht sich der Anteil seropositiver Hündinnen auf 31 % (99/319). Die Odds Ratio beträgt 2,9 (Konfidenzintervall 1,5-5,6). Die Chance, dass das Serum einer Hündin positiv ist, ist demnach 2,9mal größer als das eines Rüden.

Im Chi-Quadrat-Test erwies sich das Merkmal Geschlecht als hoch signifikant ( $p = 0,001$ ). Aus diesem Grunde erfolgte die Überprüfung der weiteren Merkmale nur anhand der Falldaten der weiblichen Tiere.

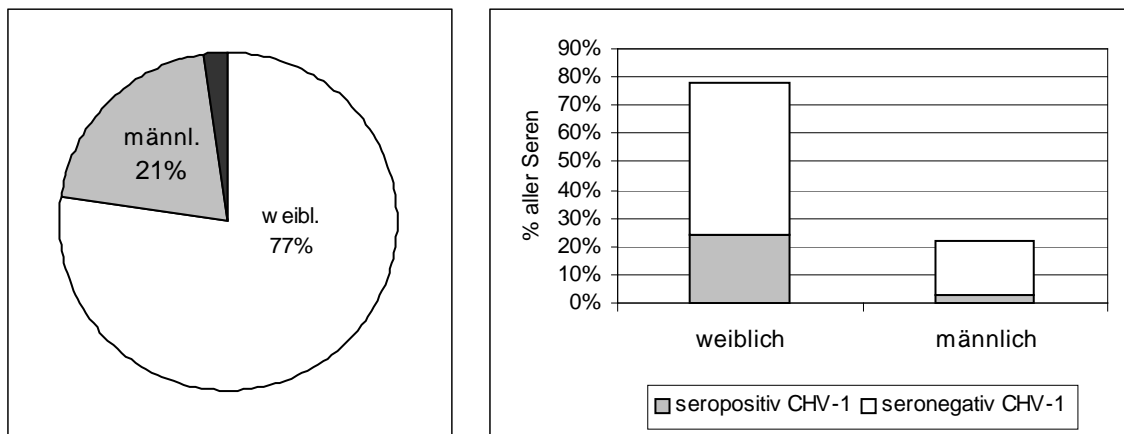


Abbildung 22: Geschlechterverhältnis und Seroprävalenz CHV-1

#### 4.8.2 Rasse

Die Herkunft der 424 von 429 in der Kategorie Rasse auswertbaren Seren verteilte sich auf 69 Rassen. Die zehn am häufigsten vorkommenden Rassen sind in absteigender Reihenfolge: Teckel (n = 43), Deutscher Schäferhund (n = 30), Basset (n = 26), Hovawart (n = 18), Labrador (n = 16), Whippet (n = 15), Coton de Tulear (n = 14), Deerhound (n = 13), Beagle (n = 12) und Collie (n = 11). Die Hunde wurden anhand des für diese Rasse zu erwartenden Durchschnittsgewichtes in kleine (bis 15 kg), mittlere (15-25 kg), große (25-40 kg) und sehr große (> 40 kg) Rassen unterteilt.

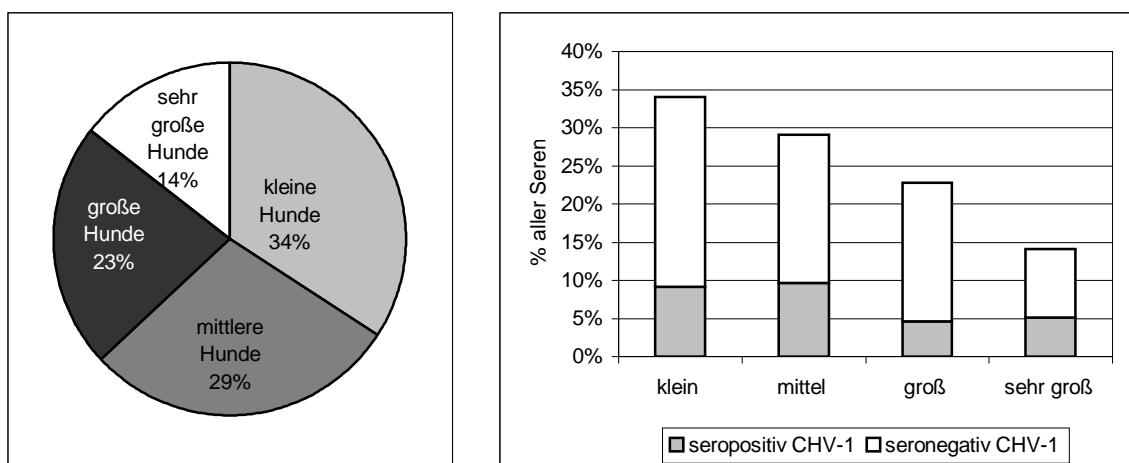


Abbildung 23: Rassenverhältnis und Seroprävalenz von CHV-1

Das Merkmal Rasse bzw. Rassegruppe erwies sich im Chi-Quadrat-Test als nicht signifikant ( $p = 0,083$ ).

### 4.8.3 Alter

Das Alter des Hundes fehlte bei 86 Seren. Das Durchschnittsalter der gültigen 343 Hunde betrug 3,8 Jahre mit einer Standardabweichung von 2,4 Jahren. Der jüngste Hund war 2 Monate alt, der älteste Hund 13 Jahre. Die Hunde wurden in folgende Alterskategorien zusammengefasst: bis 1 Jahr ( $n = 45$ ), 1-2 Jahre ( $n = 25$ ), 3-5 Jahre ( $n = 154$ ) und älter als 5 Jahre ( $n = 119$ ).

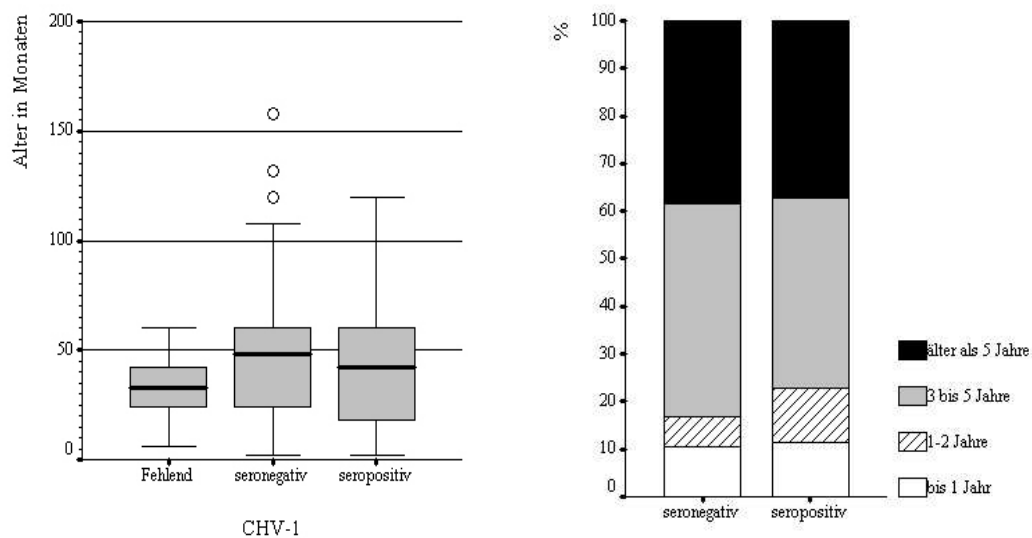


Abbildung 24: Alter der Hunde und Seroprävalenz CHV-1

Das Merkmal Alter bzw. Alterskategorien erwies sich im Chi-Quadrat-Test als nicht signifikant ( $p = 0,542$ ).

### 4.8.4 Zwingergröße

Bei 324 Seren sind im Probenbegleitschein Angaben zur Zwingergröße gemacht worden. Die Durchschnittsgröße der Zwinger lag bei 9,5 Hunden. 50 % der Hunde kamen aus Zwingern, die 4 bis 13 Tiere umfassen. Die Seren wurden anhand der Zwingergröße in die 4 folgenden Kategorien eingeteilt: 1 bis 4 Tiere ( $n = 110$ ), 5 bis 8 Tiere ( $n = 69$ ), 9 bis 13 Tiere ( $n = 76$ ) und über 14 Tiere ( $n = 69$ ). Das Verhältnis der Zwingergröße zur Seroprävalenz ist in Abbildung 25 graphisch dargestellt.

Das Merkmal Zwingergröße erwies sich im Chi-Quadrat-Test als nicht signifikant ( $p = 0,428$ ).



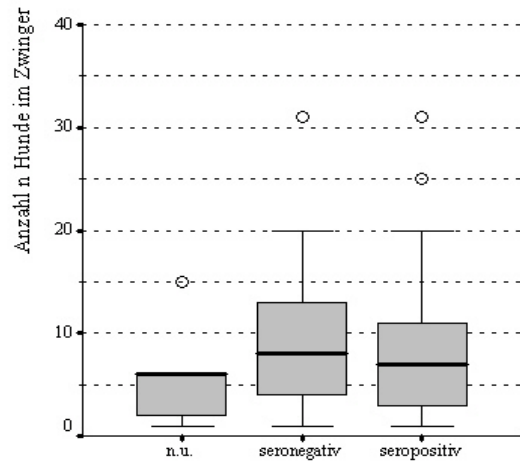
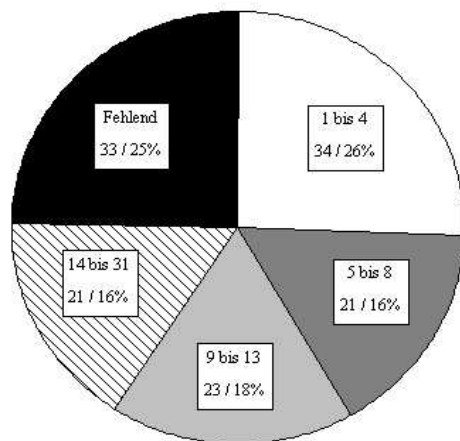


Abbildung 25: Zwingergröße und Seroprävalenz von CHV-1

#### 4.8.5 Ausstellungsbesuche

Von 292 Seren liegen Angaben über die durchschnittlichen Zahl an Ausstellungsbesuchen der Hunde im Jahr vor. 165 Hunde (56,5%) werden mehr als sechsmal im Jahr auf Ausstellungen vorgeführt, 76 Hunde drei- bis fünfmal im Jahr und 43 Hunde ein- bis zweimal. Acht Hunde waren noch nie auf einer Ausstellung.

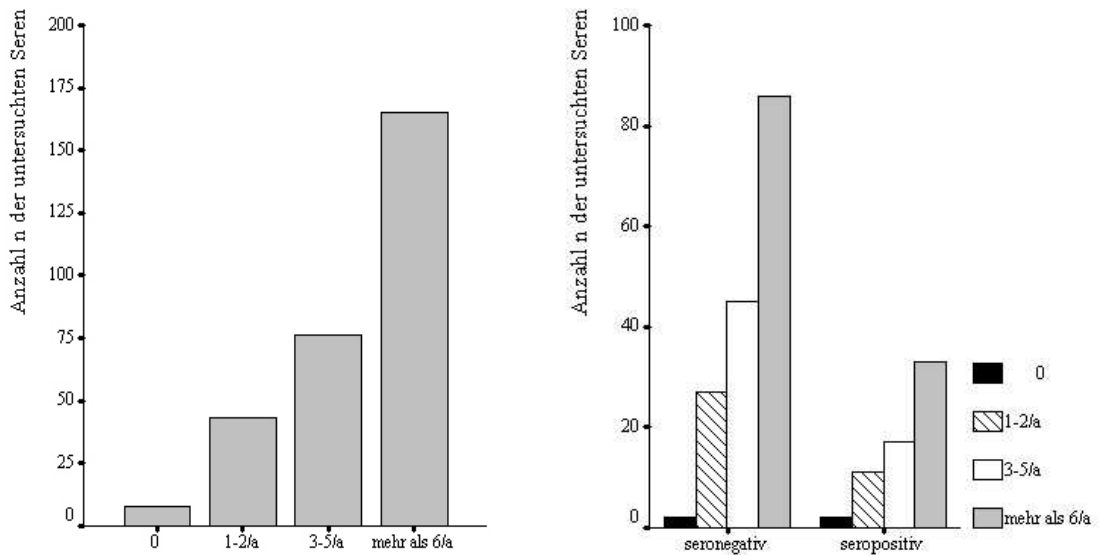


Abbildung 26: Ausstellungsbesuche und Seroprävalenz von CHV-1

Das Merkmal Anzahl der Ausstellungsbesuche erwies sich im Chi-Quadrat-Test als nicht signifikant ( $p = 0,806$ ).

#### 4.8.6 Fruchtbarkeitsstörungen

Es wurden von 63 Hunden Seren zur Untersuchung eingesandt, bei denen Fruchtbarkeitsstörungen aufgetreten sind. Bei 25,4 % dieser Seren konnten Antikörper gegen CHV-1 nachgewiesen werden. CnMV-spezifische Antikörper waren in 6 Seren (9,5 %) vorhanden.

Ein einzelnes klinisches Symptom wurde bei 39 Hunden genannt. Mehrfachnennungen kamen insgesamt 24-mal vor. Kombinationen von zwei Symptomen dominierten mit  $n = 22$ . Die restlichen 2 Hunde hatten ein Symptomtrias aus Infertilität, Totgeburten und Welpensterblichkeit bzw. Totgeburten, Fruchtresorptionen und verlängertem Anöstrus. Die absoluten Häufigkeiten der aufgetretenen klinischen Störungen und der Anteil der Seren davon, bei denen CnMV- oder CHV-1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten, sind in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20: Fruchtbarkeitsstörungen und serologischer Status**

	n	CHV-1	CHV-1 %	CnMV	CnMV %
Fruchtbarkeitsstörungen	63	16	25,4 %	6	9,5 %
Welpensterblichkeit	24	9	37,5 %	2	8,3 %
Totgeburten	23	2	8,7 %	2	8,7 %
Infertilität	17	4	23,5 %	1	5,9 %
lebensschwache Welpen	6	-	-	1	16,6 %
Spätabort	5	-	-	1	20 %
Fruchtresorptionen	5	2	40 %	1	20 %
Anöstrus	2	1	1/2	2	2/2
Ataxie	2	1	1/2	-	-
Missbildungen	1	-	-	-	-
Mumifikation	1	-	-	-	-
vesikuläre Läsionen in der Vagina	1	-	-	-	-
verlängerte Läufigkeit	1	-	-	-	-
Scheinträchtigkeit	1	-	-	-	-
respiratorische Symptome	1	-	-	-	-

Die Prävalenz von CHV-1 ist bei den Symptomkomplexen Welpensterblichkeit mit 37,5 %, Fruchtresorptionen (40 %), Anöstrus (50%) und Ataxie (40 %) bedeutend höher als die ermittelte Seroprävalenz aller in dieser Arbeit untersuchter Seren von 28,1 %. Von den 63 Seren mit vorberichtlich bekannten Fruchtbarkeitsstörungen waren sechs seropositiv für CnMV (9,5 %). Die beiden Seren mit den höchsten Titerstufen von

---

1:160 stammen von Hunden zum einem mit verlängerten Anöstrus und zum anderen mit Welpensterblichkeit und der Geburt lebensschwacher Welpen.

Auffallend ist, dass bei den einzigen beiden Seren mit dem vorherichtlich genannten Problem des Auftretens eines verlängerten Anöstrus, CnMV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Der Anteil seropositiver Seren für CnMV ist bei Hunden mit Fruchtbarkeitsstörungen im Allgemeinen und bei speziellen klinischen Erscheinungen wie z. B. Totgeburten, lebensschwache Welpen und Fruchtresorptionen deutlich höher als die ermittelte Seroprävalenz aller untersuchten Seren von 5,6 %.

## 5 Diskussion

Die Gesunderhaltung von Hunden und ihren Nachkommen gehört zu den Aufgaben der tierärztlichen Kunst. Probleme in diesem Bereich wie Fruchtbarkeitsstörungen und Welpensterblichkeit bedeuten immer einen Rückschlag des bisherigen Zuchterfolges und einen erheblichen finanziellen Verlust. Davon abgesehen bedeutet das Auftreten plötzlicher Todesfälle einzelner oder mehrerer Welpen bis hin zum Verlust des ganzen Wurfes eine starke emotionale Belastung für den Züchter.

Zwei Virusinfektionen scheinen hier eine wesentliche Rolle zu spielen: das canine Herpesvirus und das Canine Minute Virus (canines Parvovirus Typ-1). Ziel der Arbeit war es, die Verbreitung dieser beiden Viren in Deutschland zu untersuchen. Um herauszufinden, wie hoch der Anteil der Hunde ist, die schon einmal Kontakt mit besagten Viren hatten, wurden Seren auf den Gehalt virusspezifischer Antikörper getestet und daraus die Seroprävalenz ermittelt. Fälle von akuter Welpensterblichkeit in den ersten drei Lebenswochen sowie Totgeburten wurden mittels PCR und Virusisolierung auf CHV-1 und CnMV direkt untersucht. Aufgrund der vor allem für Züchter relevanten und brisanten Problematik fanden nur Proben von Zuchthunden beziehungsweise aller sich im Zwinger eines Züchters befindlichen Hunde Eingang in die Untersuchungen.

In Hinblick auf die begrenzte Verfügbarkeit von CnMV und die für die Isolierung benötigte Zelllinie WRCC war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, das Oberflächenprotein VP2 durch rekombinante Genexpression in *E.coli* herzustellen und dessen Einsatz als Antigen im ELISA zu testen.

### 5.1 Seroprävalenz von CHV-1

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Ermittlung der Seroprävalenz von CHV ist der Serumneutralisationstest. Die Bindung spezifischer Antikörper an der Oberfläche des Virus führt zum Verlust der Infektiosität. Obwohl dieser Test Goldstandard für die Bestimmung von Antikörper gegen CHV-1 ist, gibt es kein einheitliches Protokoll zur Durchführung des Tests.

**SNT mit und ohne den Zusatz von Komplement.** In der Literatur sind diverse Protokolle mit und ohne den Zusatz von Meerschweinchenkomplement beschrieben. Für das Respiratorische Syncytialvirus beim Menschen wird Sinn und Nutzen des Zusatzes von Komplement beim labordiagnostischen Nachweis mittlerweile kritisch diskutiert (YODER et al. 2004). In einem Vorversuch wurden vergleichend 16 Seren im Serumneutralisationstest mit und ohne den Zusatz von Komplement getestet. Zunächst wurde bei allen Seren durch eine halbstündige Inkubation im Wasserbad das endogene Komplement inaktiviert. Dann wurde der Test mit mehreren Komplementkonzentrationen parallel durchgeführt. Die von CARMICHAEL (1970) beschriebene generelle zwei- bis achtfache Erhöhung der Antikörpertiter unter dem Zusatz von Komplement konnte jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bei den sechs seropositiven Seren kam es mit steigender Komplementmenge nicht zu einem derartigen Anstieg. Einzelne Seren wiesen sogar eine Erniedrigung des Titers bei bestimmten Konzentrationen von Komplement auf. Generell scheinen für die Wirkung des Komplements individuelle Unterschiede zwischen den Hunden beziehungsweise Seren eine große Rolle zu spielen. Welche Faktoren dabei eine Rolle spielen, ist unbekannt. HAMPAR et al. (1968) vermutet, dass der sehr variable Effekt von Komplement auf den Titer in Beziehung steht zur Infektionsdauer beziehungsweise zum Stadium der Infektion. Wie die neutralisierende Wirkung spezifischer Antikörper in vitro durch den Zusatz von Komplement verstärkt wird, ist nicht vollständig geklärt. Es scheint allein die Größe des Virus-Antikörper-Komplement-Komplexes das Eindringen in die Zelle zu verhindern (YODER et al. 2004).

Nach einer Infektion mit CHV-1 sind neutralisierende Antikörper gegen die Hüllproteine gB, gC und gD in 100 %, 70 % und 77 % der untersuchten Seren nachweisbar. Dabei erfolgt nur die Neutralisation von gC und zum Teil von gB komplementabhängig (XUAN et al. 1991). Alle 10 Seren, die ohne Komplement negativ getestet wurden, hatten auch in allen anderen Testansätzen mit Komplement ein negatives Ergebnis. Dieses war maßgeblich für die Entscheidung, die CHV-1-spezifischen Antikörper in dieser Arbeit im Serumneutralisationstest ohne den Zusatz von Komplement zu bestimmen.

**Interpretation des Untersuchungsergebnisses.** Positive Serumtitere ohne akute klinische Symptome lassen nur die Aussage zu, dass dieser Hund schon einmal Kontakt mit CHV-1 hatte und dass sich das Virus mit hoher Wahrscheinlichkeit noch latent im Körper befindet. Nur ein deutlicher Titeranstieg bei Serumproben, die im Abstand von zwei Wochen genommen werden, sind Hinweise auf eine akute Infektion. Ein negatives serologisches Ergebnis schließt eine Infektion mit CHV-1 nicht aus. Erst ein bis zwei Wochen nach einer CHV-1-Infektion sind spezifische Antikörper im Blut nachweisbar. Der Titer steigt moderat an und fällt nach kürzerer oder längerer Zeit wieder ab.

**Impfung gegen das infektiöse Welpensterben.** Es ist bekannt, dass das canine Herpesvirus nur schwach immunogen ist und die zelluläre Immunantwort größere Bedeutung als die humorale bei der Bekämpfung einer Infektion hat. Zusätzlich scheinen die individuellen Unterschiede in der Stärke der Immunantwort nach Infektion oder Impfung groß zu sein. In Rahmen dieser Arbeit konnten 16 Seren untersucht werden, die nach den Angaben des einsendenden Tierarztes oder Züchters gegen Herpes geimpft worden sind. Wider Erwarten konnten bei 10 der 16 Seren keine Antikörper im Serumneutralisationstest nachgewiesen werden. Bei einem seronegativen Hund erfolgte die Impfung einen Tag vor der Blutentnahme. Es ist in diesem Fall davon auszugehen, dass ein bis zwei Wochen später eine Serokonversion eingetreten und nachweisbar wäre.

**Seroprävalenz.** Insgesamt standen 429 Seren für diese Untersuchungen zur Verfügung. Es wurde eine Seroprävalenz für CHV-1 von 27,7 % und für CnMV von 5,6 % ermittelt. Bezogen auf die auswertbaren Seren steigt der Anteil seropositiver Seren auf 28,1 % und 5,7 %. Ein Teil der Proben wurden von Frau Prof. Günzel-Apel aus dem Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Von den insgesamt 26 Hunden wiesen 4 (15,4 %) CHV-1-spezifische Antikörper auf, wohingegen keine Probe seropositiv für CnMV war. Aus einer Münchener Studie aus dem Jahre 1998, bei der verschiedene Impfschemata zur Grundimmunisierung von Welpen vergleichend getestet wurden, konnten 40 Seren in die Studie einbezogen werden. Der Anteil der CHV-1-positiven Seren ist im Vergleich zur Gesamtprävalenz von nur 27,7 % mit 60 % auffallend hoch. Dass es sich dabei um Antikörper nach Impfung handelt, kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da der Impfstoff gegen das infektiöse Welpensterben erst seit 2003 auf dem deutschen Markt erhältlich ist und die Seren aus dem Jahre 1998 stammen. Durch die lange Lagerung der

Seren sind die Antikörper einiger Proben sicherlich in Mitleidenschaft gezogen, sodass die Prävalenz möglicherweise noch etwas höher einzuordnen ist.

Es handelte sich bei den Münchener Seren um die Muttertiere der damals untersuchten Würfe. Die Proben stammen im engeren Sinne von Einzeltieren. Die Hündinnen leben alle getrennt voneinander bei verschiedenen Züchtern in unterschiedlich großen Zuchten. Eine gegenseitige Ansteckung durch engen Kontakt in einem gemeinsamen Zwinger und dadurch möglicherweise bedingte höhere Prävalenz ist nicht möglich. Ob es vorberichtlich Probleme mit Welpensterblichkeit gab oder Fruchtbarkeitsstörungen aufgetreten sind, ist nicht bekannt. Die einzige Gemeinsamkeit aller untersuchten Hündinnen besteht darin, dass die Blutentnahme in einem relativ kurzem Abstand zur Geburt erfolgte. So wie viele andere Herpesviren auch kann eine latente Infektion mit CHV-1 in Stresssituationen, wie der Geburt, reaktiviert werden und zur Virusausscheidung im Sinne einer Boosterung mit nachfolgendem Anstieg der Antikörper im Blut führen.

Eine Übersicht der weltweit ermittelten Seroprävalenzen des caninen Herpesvirus wurde in Tabelle 7 gegeben. In Deutschland ließen sich 1976 bei 39,1 % der untersuchten Hunde neutralisierende Antikörper feststellen. Eine aktuelle Studie aus Giessen hat eine Prävalenz von 18,81 % ermittelt. Bei Hunden mit vorberichtlich bekannten Reproduktionsstörungen betrug der Anteil seropositiver Tiere 28,8 % (KOENIG et al. 2004). Es ist zu bedenken, dass die Motivation an der hier vorgestellten Studie teilzunehmen, vor allem bei denjenigen Züchtern stärker ausgeprägt gewesen sein wird, bei deren Hunden Fruchtbarkeitsstörungen aufgetreten sind, ohne es im entsprechenden Probenbegleitschein vermerkt zu haben. Eine Überprüfung der darin gemachten Angaben fand nicht statt.

## 5.2 Seroprävalenz von CnMV

In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Antikörper gegen CnMV mit indirekter Immunofluoreszenz vorgenommen. Die ermittelte Seroprävalenz aller untersuchten Seren beträgt 5,6 % und zeigt, dass CnMV ebenfalls in Deutschland verbreitet ist. Im Vergleich zu anderen Ländern ist die Prävalenz jedoch gering. Ähnliche Werte sind aus Japan bekannt (MOCHIZUKI et al 2002). Die Prävalenzen der einzigen beiden bisher untersuchten Länder in Europa, Italien und Türkei, liegen zwischen 13,6 % und 24,17 %. In der Teilgruppe der Seren aus der Münchener Impfstudie ließen sich bei 10 % der Tiere spezifische Antikörper nachweisen, wohingegen keines der vom Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover für diese Studie zur Verfügung gestellten Hundeseren seropositiv war. Ob es sich hier um ein zufälliges Ereignis handelt oder ob es möglicherweise ein Nord-Süd-Gefälle in der Durchseuchungsrate gibt, müsste durch die Untersuchung einer größeren Anzahl von Seren genauer betrachtet werden. In Italien unterschieden sich die Seroprävalenzen in den einzelnen Regionen deutlich voneinander (RINALDO et al. 2000, PRATELLI et al. 1998). Die Ergebnisse der Arbeit bestätigen, dass CnMV weltweit verbreitet ist und im ursächlichen Zusammenhang steht mit Fruchtbarkeitsstörungen beim Hund.

Die Methode der indirekten Immunofluoreszenz zeichnet sich durch eine hohe Spezifität, jedoch nur eine mittelmäßige Sensitivität aus. Unter Umständen ist das Ergebnis einiger Seren falsch negativ. Der Ersatz der indirekten Immunofluoreszenz durch sensitivere Nachweismethoden wie dem ELISA ist erstrebenswert.

Die 24 seropositiven Hunde stammen aus 14 Zwingern. In Zwingern mit hoher Besatzdichte ist die Durchseuchungsrate deutlich höher. Drei Faktoren bedingen in größeren Beständen einen hohen Infektionsdruck: fäkoorale Infektion, mangelnde Hygiene im Zwinger und hohe Tenazität der Parvoviren in der Umwelt.

## 5.3 Risikofaktoren

Neben der Ermittlung der Seroprävalenz für CHV-1 und CnMV war es von Interesse, anhand der über die Seren zur Verfügung stehenden Daten Risikofaktoren abzuleiten, die für die Seropositivität von Bedeutung sind. Die statistische Auswertung der Daten ergab, dass nur das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Serostatus von CHV-1 hat.



**Geschlecht.** Seo et al. (1994) zeigten für Korea eine höhere Prävalenz bei männlichen Tieren (42 %) als bei weibliche Tieren (33 %) auf. Auch für Deutschland konnte KOENIG et al. (2004) einen höheren Anteil männlicher (19,9 %) als weiblicher (18,2 %) seropositiver Hunde aufzeigen. In dieser Arbeit beträgt die Seroprävalenz von CHV-1 unter den Rüden 13,5 % und unter den Hündinnen 29,9 %. Dies erscheint aufgrund der vorherrschenden Gruppenhaltung von Hündinnen in Deutschland nicht unlogisch. In dieser Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Hunde ein einem Zwinger und dem Serostatus nachweisen. Das widerspricht zum Teil den Ergebnissen von KOENIG et al. (2004) und RONSSE et al. (2004). Für die Durchseuchungsrate sind eher die durch die Zwingergröße bedingten schlechteren Hygienebedingungen, die eine Infektion mit CHV-1 erleichtern (RONSSE et al. 2004) als die absolute Anzahl der Hunde von Bedeutung. Rüden werden eher einzeln oder in kleineren Gruppen gehalten, so dass die Infektionsmöglichkeiten durch direkten Kontakt geringer sind.

**Alter.** Obwohl für das Merkmal Alter in dieser Studie kein signifikanter Zusammenhang mit dem serologischen Status von CHV-1 nachgewiesen werden konnte, ist der Anteil der seropositiven zu den seronegativen Tieren in der Altersgruppe von ein bis zwei Jahren größer als in der Altersgruppe unter einem Jahr. RONSSE et al. (2004) konnte ein Ansteigen der Antikörpertiter unter belgischen Zuchthunden in den ersten zwei Lebensjahren beobachten. Das entspricht den Ergebnissen von SEO et al. (1994) und VAN GUCHT et al. (2001).

**Fruchtbarkeitsstörungen.** Die Prävalenz von CHV-1 ist bei den Symptomkomplexen Welpensterblichkeit mit 37,5 %, Fruchtresorptionen (40 %), Anöstrus (50 %) und Ataxie (40 %) bedeutend höher als die ermittelte Seroprävalenz aller in dieser Arbeit untersuchter Seren von 28,1 %. Dagegen ist die Prävalenz für den Komplex Fruchtbarkeitsstörungen generell und im speziellen Leerbleiben und Totgeburten geringer als die durchschnittliche Prävalenz. Die Daten bestätigen, dass die Infektion hauptsächlich durch virushaltige Sekrete während und kurz nach der Geburt und weniger intrauterin stattfinden könnte.

**CnMV.** Die Evaluierung statistisch signifikanter Risikofaktoren für CnMV ist aufgrund der geringen Anzahl seropositiver Seren nicht sinnvoll. Daher werden die Fälle nur rein deskriptiv analysiert. Der Anteil positiver Seren für CnMV ist bei Hunden mit Frucht-

barkeitsstörungen im Allgemeinen und bei speziellen klinischen Erscheinungen wie z. B. Totgeburten, lebensschwachen Welpen und Fruchtresorptionen deutlich höher als die ermittelte Seroprävalenz aller untersuchten Seren von 5,6 %. Auffallend ist, dass bei den einzigen beiden Seren mit im Vorbericht genanntem verlängerten Anöstrus, CnMV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten. Ohne den Ausschluss von anderen Ursachen für einen verlängerten Anöstrus, insbesondere endokrinologischer und diätetischer Natur, ist eine Bewertung, ob und in welcher Art ein ursächlicher Zusammenhang mit den hier gemachten Beobachtungen und einer CnMV-Infektion besteht, nicht möglich.

Alle vorberichtlich genannten Probleme wie Totgeburten, Spätaborte, Leerbleiben und Fruchtresorptionen können zum Komplex der Fruchtbarkeitsstörungen zusammengefasst werden. Bei TORUN und YILMAZ (2005) dominierten in der Türkei Tracheobronchitiden, Enteritiden und hämorrhagische Gastritiden unter den genannten klinischen Problemen der 18 % seropositiven Tiere. Fünf von 18 seropositiven Hunden hatten abortiert. Die Proben stammen jedoch auch von Hunden aus dem Patientengut der Klinik für Innere Medizin einer Universitätstierklinik in der Türkei.

#### **5.4 Prokaryotische Expression von VP2**

Der virologische und serologische Nachweis von CnMV ist bisher nur in wenigen Laboren weltweit möglich. Die dazu benötigten WRCC-Zellen und CnMV an sich sind kommerziell nicht erhältlich und sind bisher nur im Rahmen von Forschungs Kooperationen zwischen einzelnen Arbeitsgruppen ausgetauscht worden. Nachweissysteme, die unabhängig von der Zellkultur von CnMV sind, würden den breiten Einsatz in der Routinediagnostik in verschiedenen Laboren erlauben und fördern dadurch die weitere Erforschung von CnMV. Für den Antikörpernachweis werden folgende Testverfahren genutzt: Hämagglutinationshemmungstest, Serumneutralisation und indirekte Immunofluoreszenz. Gegen den routinemäßigen Einsatz des Hämagglutinationshemmungstestes zum Nachweis von Antikörpern gegen CnMV spricht die Tatsache, dass dazu Blut von Rhesusaffen benötigt wird, das schwer erhältlich ist. Die Vorteile der serologischen Diagnostik mittels ELISA gegenüber der konventionellen indirekten Immunofluoreszenz und der Hämagglutination wären z. B. eine deutliche Reduktion des Arbeitsaufwandes und die sehr guten Möglichkeiten zur Standar-

disierung. Die Methode wäre durch eine Verringerung der beanspruchten Zeit und des Personals wirtschaftlicher und würde eine objektive und untersucherunabhängige Auswertung in der Bestimmung von CnMV-spezifischen Antikörpern erlauben. Die kontinuierliche Herstellung des dafür benötigten Antigens in größeren Mengen durch prokaryotische Genexpression in *E.coli* würde sich sehr gut standardisieren lassen.

**Klonierung und Genexpression.** Der für diese Arbeit verwendete CnMV-Stamm GA3 wurde von SCHWARTZ et al. (2002) vollständig sequenziert und in der Genbank veröffentlicht. Das Gen von VP2 wurde mit modifizierten Oligonukleotiden in einer PCR amplifiziert und anschließend in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert. Der positive Klon wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung ermittelt und das Gen von VP2 in den Expressionsvektor pET22b(+) subkloniert. Nach Transformation von *E.coli* BL21CodonPlus(DE3) RIL mit dem konstruierten Vektor pET22b(+)JMVP2 wurde die Expression des rekombinanten CnMV-VP2 nach Induktion mit IPTG in der SDS-PAGE nachgewiesen.

**Proteinaufreinigung.** Die Reinigung des Proteins erfolgte unter nativen Bedingungen getrennt aus Cyto- und Periplasma über den sich C-terminal befindlichen 6xHis-Tag in einer immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie. Das rekombinante CnMV-VP2 in den Zellextrakten wurde im Batchverfahren an Ni-NTA-Matrix gebunden und nach mehreren Waschschritten mit hohen Konzentrationen von Imidazol eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und der Proteingehalt bestimmt. Die Analyse in SDS-PAGE und Western Blot ergab, dass es sich bei der Bande bei 48-50 kDa um das rekombinante Protein handeln muss. Gründe, warum es deutlich kleiner als erwartet ist, konnten im Rahmen der Arbeit nicht ermittelt werden. Die Analyse des Plasmids mit dem Insert nach Sequenzierung ergab keinen Hinweis auf ein vorzeitiges Start- oder Stoppsignal im Leseraster. Durch den Zusatz von Proteaseinhibitoren (PMSF) wurde versucht, dem proteolytischen Abbau des rekombinanten Proteins entgegenzuwirken. In den SDS-Gelen der Eluate sind zusätzliche Banden zu sehen, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Verunreinigungen mit zellulären Proteinen und um Bruchstücke des rekombinanten CnMV-VP2 handelt. Um die Identität dieser Proteine zu untersuchen, kann man zum einen die Bande ausschneiden und Kaninchen zur Herstellung polyklonaler Antikörper immunisieren. Neue Techniken erlauben auch die Sequenzierung des Proteins und die

Bestimmung der Aminosäuresequenz. Wider Erwarten hat der Transport des synthetisierten Proteins in das Periplasma nicht stattgefunden. Das Proteinmolekül kann zu groß gewesen sein. Ungünstige Ladungsverhältnisse am N-terminalen Ende können auch eine Translokation verhindern (KAJAVA et al. 2000).

**Inclusion Bodies.** Nach Induktion ist zwar eine starke Bande zu sehen, der Proteingehalt im Eluat und damit die Ausbeute ist jedoch relativ gering. Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt das rekombinante CnMV-VP2 zu einem hohen Prozentsatz in Inclusion Bodies vor. Dabei handelt es sich um unlösliche Aggregate des rekombinanten Proteins in denaturierter Form. Inclusion Bodies lassen sich leicht durch Zentrifugation gewinnen und durch den Zusatz von Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff in hohen Konzentrationen auflösen. Das rekombinante Protein kann so mit hoher Ausbeute, jedoch in denaturierter und damit biologisch inaktiver Form gewonnen werden. Eine Zurückfaltung ist theoretisch und praktisch möglich, jedoch schwierig und die Erfolgsaussichten, am Ende ein Protein in aktiver Form zu haben, sind sehr stark vom individuellen Protein abhängig und können sehr gering sein. Um die Löslichkeit und Reinheit zu erhöhen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inkubationstemperatur während der Expression auf 26 °C und die Menge an IPTG zur Induktion der Expression reduziert. Der Vektor pET22b(+) wurde aufgrund seines peLB-Signalpeptids ausgewählt. Durch den Transport des synthetisierten Proteins in das Periplasma werden bessere Bedingungen für eine korrekte Faltung und damit für eine bessere Löslichkeit geschaffen. Eine weitere Alternative wäre noch die Fusion des rekombinanten VP2 mit gut löslichen Proteinen wie Glutathion-S-Transferase oder Thioredoxin.

**Genexpression in *E.coli*.** Die Genexpression in bakteriellen Systemen mit dem Ziel das rekombinante Oberflächenprotein von CnMV herzustellen, erwies sich in dieser Arbeit als nicht geeignet. Ähnliche Probleme, insbesondere die Bildung von Inclusion Bodies bei der prokaryotischen Genexpression in *E.coli* traten auch in anderen Arbeitsgruppen auf (persönliche Mitteilung von L.E. Carmichael, International Parvovirus Meeting 2005, Leipzig Juli 2005; RAYMENT et al. 1990; SODERLUND et al. 1992). Eine andere Möglichkeit wäre der Einsatz von Baculoviren oder Hefen wie *Sacharomyces cerevisiae*. Damit konnten rekombinante Oberflächenproteine von Parvovirus B19 und Mice Minute Virus erfolgreich hergestellt werden (HEEGAARD et al. 2002;

LIVINGSTON et al. 2002; LOWIN et al. 2005). Der Vorteil besteht zusätzlich darin, dass sich die synthetisierten Proteine selbstständig zu Kapsid-ähnlichen Partikeln zusammenlagern können und hervorragende antigene Eigenschaften in immunologischen Nachweissystemen und funktionellen Tests besitzen. Die Nutzung dieser Nachweissysteme erfordert jedoch umfangreiche technische und finanzielle Voraussetzungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar waren.

**Genexpression in Pflanzen.** Die Nutzung von Tabakpflanzen zur Herstellung rekombinanter Proteine ist ein bisher wenig bekanntes, aber sehr interessantes System zur Genexpression verschiedenster Proteine. In dieser Arbeit scheiterte die Produktion des viralen Antigens bereits in der Ligation des viralen Gens von CnMV für VP2 mit dem linearisierten Vektor. Aufgrund zweier natürlichen Schnittstellen des Restriktionsenzym *BsaI* innerhalb des VP2-Gens mussten 4 Fragmente in korrekter Reihenfolge und Orientierung verknüpft werden. Trotz mehrfacher Wiederholung der Ligationsreaktion mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen der einzelnen Reagenten wuchsen nach Transformation in *E.coli* keine Kolonien. Auch der Versuch, durch partiellen Restriktionsverdau die Anzahl der Fragmente auf zwei zu reduzieren, war nicht erfolgreich.

## 5.5 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen CnMV

Die Titerbestimmung der von Kaninchen gewonnenen Hyperimmunseren mittels indirekter Immunofluoreszenz gelang zunächst nicht. Erst bei Verwendung eines sekundären anti-Kaninchen-Antikörpers, der mit dem Farbstoff Cy2 konjugiert war, konnte das CnMV-spezifische Fluoreszenzbild des Zellkerns beobachtet werden. Das Fluoreszenzbild bei Verwendung von Kaninchen- und Hundeseren unterschied sich nicht.

Generell sind die Titer der Hyperimmunseren geringer als erwartet ausgefallen. Deutlich sind auch die individuellen Unterschiede zwischen den Tieren. Das bestätigt die Wichtigkeit, zur Herstellung von Hyperimmunseren mindestens zwei Tiere parallel zu immunisieren. Das verwendete Immunisierungsprotokoll hat sich im Hause bei der Herstellung von Hyperimmunseren gegen Prototheken, Yersinien und porzinen Parvoviren erfolgreich bewährt. Einziger Unterschied besteht in der Wahl von imkompletten anstatt kompletten Freund's Adjuvans bei der ersten Immunisierung.

Komplettes Freund's Adjuvans hat durch den Zusatz von hitzeinaktivierten Mykobakterien einen stärkeren stimulierenden Effekt als das inkomplette Freund's Adjuvans. Die nicht unerheblichen Nebenwirkungen, die auftreten können, haben hinsichtlich von Tierschutzaspekten zu einem Anwendungsverbot als Adjuvans geführt. Der zweite Grund für die niedrigen Titer liegt in der ungenügenden Aufreinigung des Antigens. Die zuerst von YAMAMOTO et al. (1970) beschriebene Methode der Präzipitation von Virionen mit PEG und die im Protokoll folgende Ultrazentrifugation über einen CsCl-Gradienten sind etablierte Standardmethoden zur Virusaufreinigung in der Virologie. Trotzdem sind im SDS-Gel neben den CnMV-spezifischen Proteinen Banden zu sehen, die wahrscheinlich zelluläre Verunreinigungen darstellen.

Der Unterschied zwischen den Antikörpertitern einer Serumprobe, gemessen in IFT und Serumneutralisationstest, ist mit dem Prinzip des Nachweisverfahrens erklärbar. Während im IFT alle IgG detektiert werden, ist im Serumneutralisationstest nur der Nachweis neutralisierender Antikörper aller Immunglobulinsubklassen möglich.

## 5.6 Direkter Nachweis von CHV und CnMV

Die Untersuchung von Abstrichen und Kotproben erwachsener Hunde sowie Organmaterial von verstorbenen Welpen erfolgte mit dem Ziel aktuelle Stämme von CHV-1 und CnMV für zukünftige Forschungsvorhaben zu isolieren und näher zu charakterisieren. Alle untersuchten Proben waren in der PCR und in der Virusisolierung negativ.

**PCR.** Die Oligonukleotide für den Nachweis von CnMV wurden anhand der in der Genbank veröffentlichten Sequenzen von drei CnMV-Stämmen, die in den USA und in Asien isoliert wurden, ausgewählt. In Italien, Schweden und Deutschland wurde CnMV in mehreren Fällen von Welpensterblichkeit nachgewiesen. Von diesen Fällen gibt es bis dato (Stand Februar 2006) keine veröffentlichten Sequenzen. Durch Mutationen im Bereich der Anlagerungsstellen der Oligonukleotide besteht die Möglichkeit, dass das Ergebnis in der Untersuchung dieser Proben von europäischen Isolaten mittels PCR ein falsch negatives Ergebnis liefert. Sind nur sehr wenige Viren im zu untersuchendem Material vorhanden und ist die Sensitivität der PCR nur gering, kann das Ergebnis ebenfalls falsch negativ ausfallen. Die ermittelte analytische Sensitivität für den Nachweis von CnMV in der PCR ist gut bis sehr gut und beträgt 0,1 TCID<sub>50</sub>/100 µl beziehungsweise 0,01 TCID<sub>50</sub>/100 µl in der Seminested-PCR. Die Nachweisgrenze der

PCR für CHV-1 mit dem aus der Literatur entnommenen Primerpaar CHVgBr und CHVgBf liegt bei 1 TCID<sub>50</sub>/100 µl und ist zufriedenstellend. BURR et al. (1996) war es möglich, 1fg (entspricht 14 Kopien) viraler DNA in 1 µg aus Plazenta aufgereinigter DNA nachzuweisen. In 2 ml Schafsblut war die untere Grenze bei 250 fg viraler DNA.

**Nachweis CHV-1.** Das canine Herpesvirus wird wie durch die Arbeiten von APPEL et al. (1969), CARMICHAEL (1970) und OKUDA et al. (1993) nachgewiesen, intermittierend für wenige Tage bis zu drei Wochen über Nasen- und Vaginalsekrete ausgeschieden. Die Phasen der Virusausscheidung sind in den meisten Fällen für den Besitzer oder den Tierarzt aufgrund fehlender klinischer Symptome nicht von außen ersichtlich. Vesikuläre Läsionen auf den Schleimhäuten der Vagina oder des Präputiums können ein Hinweis darauf sein, dass aktuell Virus ausgeschieden wird. Die Virusisolierung wird zusätzlich dadurch erschwert, dass Herpesviren sehr labil sind und während des Transportes zum Labor sehr schnell ihre Infektiösität verlieren. Schwierigkeiten bei der Isolierung von CHV-1 sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden (POSTE u. KING 1971; HASHIMOTO et al. 1983). Um die Erfolgsaussichten der Virusisolierung aus Organproben zu erhöhen, empfiehlt PERCY (1970) die Trypsinierung des Organs und die Aussaat der gewonnenen Zellen im Sinne einer primären Zellkultur. Die Chancen eines erfolgreichen Virusnachweises in der Zellkultur und in der PCR werden durch Kühlung während des Transportes und spezielle Tupfermedien für Viren erhöht und durch fortschreitende Autolyse und lange Transportzeiten erniedrigt.

Die Anzahl der untersuchten Fälle von Welpensterblichkeit ist insgesamt zu gering, um eine abschließende Beurteilung über die Verbreitung und die Häufigkeit einer ursächlichen Beteiligung von CHV-1 und CnMV an Fällen von Welpensterblichkeit in den ersten drei Lebenswochen treffen zu können. In sechs der 14 Fälle wurden die Welpen auf Wunsch des Besitzers zur Abklärung der Todesursache pathologisch untersucht. Davon wurde in drei Fällen kein Hinweis auf ein infektiöses Geschehen gefunden. Der Befund in den anderen Fällen lautete bakterielle Septikämie mit Nachweis von *E.coli* und *Staphylococcus intermedius*.

**Untersuchung Spermaproben.** Die Übertragung von CHV-1 erfolgt oronasal und venerisch, wobei die oronasale Übertragung von größerer Bedeutung ist. Seropositive Tiere sind mit hoher Wahrscheinlichkeit latente Träger von CHV-1. Eine Reaktivierung der Virusausscheidung durch Stress ist jederzeit möglich. Vesikuläre Schleimhaut-

läsionen an Penis und/oder Präputium als äußerer Hinweis für eine aktuelle Phase der Virusausscheidung können, müssen aber nicht vorhanden sein. Eine Infektion der Hündin während des Deckaktes ist möglich. Aus dem Nutztierbereich ist die Gewinnung von Sperma und die künstliche Besamung nicht mehr wegzudenken und spielt auch in Hinsicht auf die Bekämpfung von Tierseuchen eine wichtige Rolle. In der Hundezucht ist der natürliche Deckakt traditionell noch weit verbreitet. Doch auch die Kleintiermedizin hat Techniken zur Gewinnung und Übertragung von Sperma bei Hund und Katze entwickelt, die immer mehr in der täglichen Praxis angewandt werden. Durch künstliche Besamung und die Untersuchung des Spermas auf CHV-1 ist der Einsatz seropositiver Deckrüden weiterhin möglich. Probleme bestehen jedoch beim Nachweis in der PCR. Zum einen wirkt sich der hohe DNA-Gehalt in den Spermien inhibitorisch in der Polymerase Kettenreaktion aus (VAN ENGELENBURG et al. 1993). Aus diesem Grund wurde zur Aufreinigung der DNA das Protokoll des Herstellers durch einen zusätzlichen Schritt geändert. Durch Vorinkubation mit einem Puffer, der Proteinase K und DTT enthält, gelang es, die für den Nachweis viraler DNA aus Organproben ermittelte Sensitivität zu erreichen.

### **5.7 Abschließende Bewertung und Ausblick**

Es wurden 429 Serumproben von Zuchthunden untersucht. Die Seroprävalenz von CHV-1 und CnMV betrug 28,1 % und 5,7 % bezogen auf die auswertbaren Proben. Damit ist die Verbreitung von CnMV deutlich geringer als erwartet. Die Seroprävalenzrate ist nicht gleichzusetzen mit der Häufigkeit CHV-1-bedingter klinischer Erkrankungen beziehungsweise Welpensterblichkeit. Der in der Praxis geäußerte Verdacht einer CHV-1-Infektion konnte im Rahmen dieser Studie in keinem Fall labordiagnostisch bestätigt werden. Der Anteil bakteriell und nichtinfektiös bedingter Welpensterblichkeit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von weitaus größerer Bedeutung. Der betreuende Tierarzt sollte bei Welpensterblichkeit unbedingt die Todesursache der verstorbenen Welpen bestimmen lassen und die Hündin klinisch untersuchen.

Die Bedeutung von CHV-1 und CnMV für akute Welpensterblichkeit ist in Deutschland von weitaus geringerer Bedeutung als erwartet. Nichtsdestotrotz ist die Verbesserung der diagnostischen Nachweismethoden für die Zukunft von Bedeutung. Für CHV-1 ist die labordiagnostische Unterscheidung zwischen Impf- und Infektionstiter



---

wünschenswert. Für die Bewertung der Ergebnisse fehlen Studien über die humorale und zelluläre Immunantwort nach einer Infektion mit CHV-1 und insbesondere CnMV. Die prokaryotische Genexpression des VP2 von CnMV ist für die Etablierung eines ELISA nicht geeignet. Der Einsatz eukaryotischer Expressionssysteme ist empfehlenswert und sollte weiter verfolgt werden.

---

## 6 Zusammenfassung

Jill Manteufel

### **Verbreitung des caninen Herpesvirus (CHV-1) und des Canine Minute Virus (CnMV) unter Zuchthunden in Deutschland und Untersuchungen zur prokaryotischen Genexpression des Virusproteins 2 von CnMV**

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

Eingereicht im Februar 2006

148 Seiten, 31 Abbildungen, 27 Tabellen, 147 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselworte: canines Herpesvirus, Minute Virus of Canines, Seroprävalenz, Risikofaktoren, Deutschland, VP2, prokaryotische Genexpression

Die Welpensterblichkeit wird auf 10-20 % der lebend geborenen Welpen geschätzt. Zwei Virusinfektionen scheinen bei Welpensterblichkeit und Fruchtbarkeitsstörungen des Hundes eine wesentliche Rolle zu spielen: das canine Herpesvirus Typ 1 (CHV-1) und das Canine Minute Virus (CnMV, synonym Minute Virus of Canines). Ziel der Arbeit war es, die Verbreitung dieser beiden Viren unter Zuchthunden in Deutschland zu untersuchen.

Das klinische Erkrankungsbild ist bei beiden Viren ähnlich. Bei erwachsenen Tieren verläuft die Infektion meist unauffällig. Infektionen während der Trächtigkeit können zu Fruchtresorption, Aborten, Missbildungen und Welpensterblichkeit führen. Infizierte Welpen erkranken meist in den ersten drei Lebenswochen und sind apathisch, zeigen Saugunlust, haben Atemwegsprobleme, Erbrechen und leiden oft auch unter Durchfall. Die Mortalität ist hoch.

Zwischen Juli 2004 und Oktober 2005 wurden 429 Serumproben gesammelt. Die Bestimmung der Seroprävalenz von CHV-1 erfolgt im Serumneutralisationstest (SNT) mit Madin Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen ohne den Zusatz von Komplement. CnMV-spezifische Antikörper wurden mittels indirekter Immunofluoreszenz (IFT) auf zuvor mit CnMV infizierten Walter Reed Canine Zellen (WRCC) nachgewiesen. Des Weiteren wurden 37 Abstriche, 34 Spermaproben, 16 Kotproben und 37 verstorbene

Welpen aus 14 Würfen mittels PCR und Virusisolierung auf CHV-1 und CnMV direkt untersucht.

27,7 % (119/429) aller Serumproben hatten neutralisierende Antikörper gegen CHV-1. Die Seroprävalenz für CnMV beträgt 5,6 % (24/429). Die statistische Auswertung ergab nur für das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Serostatus von CHV-1. Alter, Zwingergröße, Anzahl Ausstellungsbesuche und Rasse spielten keine Rolle für die Seroprävalenz von CHV-1. Bei den klinischen Vorberichten Welpensterblichkeit (n = 24) und Fruchtresorptionen (n = 5) ist die Seroprävalenz von CHV-1 mit 37,5 % und 40 % bedeutend höher als die ermittelte Gesamtprävalenz von 27,7 %.

Die Untersuchung der Abstriche, Sperma-, Kot- und Organproben von verstorbenen Welpen mittels PCR und zum Teil Virusisolierung auf CnMV und CHV-1 verlief in allen Fällen mit negativem Ergebnis.

Der Nachweis von CnMV ist bis heute nur in wenigen Speziallabors möglich. Um die Nachweismöglichkeiten von CnMV zu verbessern und zu vereinfachen, wurde das Virusprotein-2-(VP2)-Gen von CnMV in den Vektor pET22b(+) kloniert. Das am C-terminalen Ende mit einem 6x His-Tag markierte Protein wurde im *E.coli*-Stamm BL21CodonPlus(DE3)RIL exprimiert, aufgereinigt und als Antigen im ELISA getestet. Die prokaryotische Genexpression des VP2 von CnMV ist für die Etablierung eines diagnostischen ELISA nicht geeignet. Während der Expression aggregierte das Protein zu unlöslichen Inclusion Bodies. Nach Aufreinigung ist das Protein immer noch mit *E.coli*-Proteinen kontaminiert. Im ELISA zeigte sich das rekombinante Antigen wenig spezifisch.

In Fällen von Welpensterblichkeit (n = 14), waren diese in weit weniger Fällen als vermutet CHV-1 oder CnMV bedingt. Insgesamt scheint CnMV in Deutschland weit weniger verbreitet zu sein als in anderen Ländern der Welt.

---

## 7 Summary

Jill Manteufel

### **Distribution of canine herpesvirus (CHV-1) and Canine Minute Virus (CnMV) under breeding dogs in Germany and studies about prokaryotic genexpression of virus protein 2 of CnMV**

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in February 2006

148 pages, 31 figures, 27 tables, 147 references, appendix

Keywords : canine herpesvirus, Minute Virus of Canines, seroprevalence, risk factors, Germany, VP2, prokaryotic genexpression

Canine herpesvirus (CHV-1) and Canine Minute Virus (CnMV, canine parvovirus type-1) are considered important viruses causing neonatal mortality and fertility disorders in dogs. In order to determine the role of CHV-1 and CnMV in neonatal disease and infertility in dogs in Germany their seroprevalences were determined. Studies on the seroprevalence of CHV-1 and CnMV infection suggest that these viruses are widespread in canine populations in many countries. Little is known about the distribution of these two viruses in breeding dogs in Germany. Clinical disease after experimental infection with CHV-1 and CnMV can result in embryonic/fetal death after in utero infection early in gestation. Infection of puppies less than three weeks of age, may result in vomiting, dyspnoe, diarrhea, apathy and high mortality.

A total of 429 sera from breeding dogs collected between March 2004 and October 2005 were analysed. Serum neutralisation tests (SNT) in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells with and without the addition of guinea pig complement were established to determine of CHV-1 neutralising antibodies. An indirect immunofluorescence (IF) assay was performed on CnMV infected Walter Reed Canine Cells (WRCC) to detect antibodies against CnMV. Further 37 swabs, 34 semen samples, 16 fecal samples and organ specimens of total 37 stillborn and deceased puppies from 14 different kennels were tested for CnMV and CHV-1 by PCR and virus isolation.

27,7 % (119/429) of all serum samples had neutralising antibodies against CHV-1, but only 5,6 % (24/429) had CnMV-specific antibodies. There is a significant association of sex and serostatus for CHV-1, but not for age, breed, attending exposition and kennel size. In known cases of reproductive disorders especially neonatal mortality, embryonic death with resorption and anoestrus, the prevalence of CHV-1 is higher than the average prevalence in this study (37,5%, 40% and 50 % respectively versus 27,7 %).

None of the clinical samples were positive in PCR, or by virus isolation, for CHV and CnMV.

In order to facilitate laboratory diagnostics of CnMV specific antibodies, virus protein 2 (VP2) of CnMV was cloned into vector pET22b(+). The c-terminal His-tagged recombinant protein, produced in *E.coli* strain BL21CodonPus(DE3)RIL was tested as antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The prokaryotic gene expression appear not suitable for the production of VP2 of CnMV as an antigen for an ELISA. The VP2 most likely formed insoluble inclusion bodies and purification was therefore insufficient. Contamination with *E.coli* proteins caused strong cross reactivity and low specificity.

In conclusion, CnMV appears less widespread in Germany than reported from other countries. In cases of neonatal mortality CHV and CnMV is less common than assumed in clinical practice.

## 8 Literaturverzeichnis

Ackermann U. Seroepizootologische Untersuchungen über das Vorkommen von Reo-, Adeno-, Herpes-, Parainfluenza- und Influenzaviren beim Hund [Dissertation med. vet.] München: Fachbereich Tiermedizin; 1975.

Agbandje M, McKenna R, Rossmann MG, Strassheim ML, Parrish CR. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins*. 1993;16(2):155-71.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.

Anderson AC. Puppy production to the weaning age. *J Am Vet Med Assoc*. 1957;130:151-8.

Appel MJ, Menegus M, Parsonson IM, Carmichael LE. Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups. *Am J Vet Res*. 1969;30(12):2067-73.

Astell CR, Chow MB, Ward DC. Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J Virol*. 1985;54(1):171-7.

Aurelian L. Factors affecting the growth of canine herpesvirus in dog kidney cells. *Appl Microbiol*. 1969;17(1):179-81.

Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev*. 1990;54(3):316-29.

Berns KI, Pinkerton TC, Thomas GF, Hoggan MD. Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology*. 1975;68(2):556-60.

Bibrack B, Schaudinn W. Untersuchungen über das Vorkommen von Herpesinfektionen bei Hunden in der Bundesrepublik Deutschland mit Hilfe eines Neutralisations-Schnelltestes. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1976;23(5-6):384-90.

Binn LN, Eddy GA, Lazar EC, Helms J, Murnane T. Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967;126(1):140-5.

Binn LN, Lazar G, Eddy GA, Kajima M. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect Immun*. 1970;1(5):503-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Burr PD, Campbell ME, Nicolson L, Onions DE. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. 1996;53(3-4):227-37.

- Carmichael LE. Canine Parvovirus Type 1 (Minute Virus of Canines). In: Horzinek M, (Hrsg.). *Virus Infections of Carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1987: 63-67.
- Carmichael LE. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *J Am Vet Med Assoc*. 1970;156(12):1714-21.
- Carmichael LE, Barnes FD, Percy DH. Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. *J Infect Dis*. 1969;120(6):669-78.
- Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res*. 1980;41(5):784-91.
- Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus. *Cornell Vet*. 1991;81(2):151-71.
- Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest*. 1994;6(2):165-74.
- Carmichael LE, Strandberg JD, Barnes FD. Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1965;120(3):644-50.
- Cornelis JJ, Lang SI, Stroh-Dege AY, Balboni G, Dinsart C, Rommelaere J. Cancer gene therapy through autonomous parvovirus-mediated gene transfer. *Curr Gene Ther*. 2004;4(3):249-61.
- Cornwell JC, Wright NG. Neonatal canine herpesvirus infection: a review of present knowledge. *Vet Rec*. 1969;84(1):2-6.
- Cossons N, Faust EA, Zannis-Hadjopoulos M. DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome. *Virology*. 1996;216(1):258-64.
- Cotmore SF, Tattersall P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res*. 1987;33:91-174.
- Cotmore SF, Tattersall P. A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J Virol*. 1989;63(9):3902-11.
- Cotmore SF, Tattersall P. DNA replication in autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology*. 1995;6:271-81.
- De Bellis D, Schwartz I. Regulated expression of foreign genes fused to lac: control by glucose levels in growth medium. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(5):1311.
- Decaro N, Altamura M, Pratelli A, Pepe M, Tinelli A, Casale D et al. Evaluation of the innate immune response in pups during canine parvovirus type 1 infection. *New Microbiol*. 2002;25(3):291-8.

- Delisle F. L 'herpès-virose canine. *Rec Med Vet.* 1982;158(9-11):669-76.
- Ebel L. Todesursachen bei Hundewelpen, untersucht im Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover von 1973-1980 [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1984.
- Engels M, Mayr-Bibrack B, Ruckstuhl B, Metzler A, Wyler R. Die Seroepizootologie der caninen Herpesvirusinfektion in der Schweiz und praeliminaere Versuche mit einer Vakzine. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1980;27(4):257-67.
- Eugster AK, Nairn C. Diarrhea in puppies: parvovirus-like particles demonstrated in their feces. *Southwest Vet.* 1977;30:59-60.
- Evermann JF. Diagnosis of canine herpetic infections. In: Kik RW, Bonagura JD, (Hrsg.). *Current Veterinary Therapy X.* Philadelphia: Saunders; 1989: 1313-1316.
- Evermann JF, McKeirnan AJ, Ott RL, Reed LA. Diarrheal condition in dogs associated with viruses antigenically related to feline herpesvirus. *Cornell Vet.* 1982;72(3):285-91.
- Fox MW. Neonatal mortality in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1963;143:1219-23.
- Fulton RW, Ott RL, Duenwald JC, Gorham JR. Serum antibodies against respiratory viruses; prevalence among dogs of eastern Washington. *Am J Vet Res.* 1974;35(6):853-5.
- Verstegen J, Onclin K, Linde-Forsberg C, editors. Prevalence of antibodies against Canine Herpes Virus in French breeding kennels. 3rd European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals; 02 May; Liège: Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l' Université de Liège, 2002.
- Hampar B, Notkins AL, Mage M, Keehn MA. Heterogeneity in the properties of 7 S and 19S rabbit-neutralizing antibodies to herpes simplex virus. *J Immunol.* 1968;100(3):586-93.
- Hashimoto A. Canine parvovirus type-1 (MVC): Pathomorphological studies on the experimentally infected fetus and MVC-infected cultured cells. Carmichael L, (Hrsg.). *Canine Infectious Diseases: From Clinics to Molecular Pathogenesis*, P0127.0899. 14-8-1999. Ithaca, New York, USA, International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).
- Hashimoto A, Banba H, Hirai K, Shimakura S. Studies on canine herpesvirus infection of puppies. I. Investigations on clinical pathology and further histopathological findings of naturally occurring cases. *Res Bull Fac Agric Gifu Univ.* 1979a;42:177-87.
- Hashimoto A, Hirai K, Fukushi H, Fujimoto Y. The vaginal lesions of a bitch with a history of canine herpesvirus infection. *Jpn J Vet Sci.* 1983;45(1):123-6.
- Hashimoto A, Hirai K, Okada K, Fujimoto Y. Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *Am J Vet Res.* 1979b;40(9):1236-40.



- Hashimoto A, Hirai K, Yamaguchi T, Fujimoto Y. Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *Am J Vet Res.* 1982;43(5):844-50.
- Hashimoto A, Takiguchi M, Hirai K, Kida H, Carmichael LE. A serological survey of minute virus of canines (MVC; canine parvovirus type-1) in dogs in the Tokai area of Japan. *Jpn J Vet Res.* 2001;49(3):249-53.
- Hashimoto A, Yamaguchi T, Hirai K, Shimakura S. Studies on canine herpesvirus infection of puppies. II. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in the pregnant dog. *Res Bull Fac Agric Gifu Univ.* 1979c;42(42):189-92.
- Heegaard ED, Qvortrup K, Christensen J. Baculovirus expression of erythrovirus V9 capsids and screening by ELISA: serologic cross-reactivity with erythrovirus B19. *J Med Virol.* 2002;66(2):246-52.
- Hill H, Mare CJ. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *Am J Vet Res.* 1974;35(5):669-72.
- Jang HK, Tohya Y, Han KY, Kim TJ, Song CS, Mochizuki M. Seroprevalence of canine calicivirus and canine minute virus in the Republic of Korea. *Vet Rec.* 2003;153(5):150-2.
- Jarplid B, Johansson H, Carmichael LE. A fatal case of pup infection with minute virus of canines (MVC). *J Vet Diagn Invest.* 1996;8(4):484-7.
- Kaerber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1931;162:480-7.
- Kajava AV, Zolov SN, Kalinin AE, Nesmeyanova MA. The net charge of the first 18 residues of the mature sequence affects protein translocation across the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 2000;182(8):2163-9.
- Kakuk TJ, Conner GH. Experimental canine herpesvirus in the gnotobiotic dog. *Lab Anim Care.* 1970;20(1):69-79.
- Kakuk TJ, Conner GH, Langham RF, Moore JA, Mitchell JR. Isolation of a canine herpesvirus from a dog with malignant lymphoma. *Am J Vet Res.* 1969;30(11):1951-60.
- Karpas A, Garcia FG, Calvo F, Cross RE. Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. *Am J Vet Res.* 1968;29(6):1251-7.
- Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG. The structure of human parvovirus B19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11628-33.
- Kimber KR, Kollias GV, Dubovi EJ. Serologic survey of selected viral agents in recently captured wild North American river otters (*Lontra canadensis*). *J Zoo Wildl Med.* 2000;31(2):168-75.

- Koenig M, Neiseke J, Thiel HJ. Prevalence of canine herpesvirus I (CHV-1) in German kennels. *Tierarztl Umsch.* 2004;59(10):559-65.
- Kojima A, Fujinami F, Takeshita M, Minato Y, Yamamura T, Imaizumi K et al. Outbreak of neonatal canine herpesvirus infection in a specific pathogen-free beagle colony. *Jpn J Vet Sci.* 1990;52(1):145-54.
- Kotin RM, Linden RM, Berns KI. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* 1992;11(13):5071-8.
- Lacheretz A, Cognard S. Epidemiology and serological diagnosis of canine herpesvirus infection. *Rev Med Vet (Toulouse).* 1998;149(8-9):853-6.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
- Lang SI, Boelz S, Stroh-Dege AY, Rommelaere J, Dinsart C, Cornelis JJ. The infectivity and lytic activity of minute virus of mice wild-type and derived vector particles are strikingly different. *J Virol.* 2005;79(1):289-98.
- Lebich M, Harder TC, Frey HR, Visser IK, Osterhaus AD, Liess B. Comparative immunological characterization of type-specific and conserved B-cell epitopes of pinniped, felid and canid herpesviruses. *Arch Virol.* 1994;136(3-4):335-47.
- Limbach KJ, Limbach MP, Conte D, Paoletti E. Nucleotide sequence of the genes encoding the canine herpesvirus gB, gC and gD homologues. *J Gen Virol.* 1994;75 ( Pt 8):2029-39.
- Lin JC, Shu CT, Chung MS, Wang JT. Studies an canine herpesvirus infections in Taiwan: pathology, virus isolation and identification, and experimental infection. *J Clin Soc Vet Sci.* 1983;9(1):113-7.
- Livingston RS, Besselsen DG, Steffen EK, Besch-Williford CL, Franklin CL, Riley LK. Serodiagnosis of mice minute virus and mouse parvovirus infections in mice by enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed recombinant VP2 proteins. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):1025-31.
- Love DN, Huxtable CR. Naturally-occurring neonatal canine herpesvirus infection. *Vet Rec.* 1976;99(25-26):501-3.
- Lowin T, Raab U, Schroeder J, Franssila R, Modrow S. Parvovirus B19 VP2-proteins produced in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with VP2-particles produced by baculovirus-derived vectors. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005;52(7-8):348-52.
- Lundgren DL, Clapper WE. Neutralization of canine herpesvirus by dog and human serums: a survey. *Am J Vet Res.* 1969;30(3):479-82.

- Lust G, Carmichael LE. Suppressed synthesis of viral DNA, protein, and mature virions during replication of canine herpesvirus at elevated temperature. *J Infect Dis.* 1971;124(6):572-80.
- Macartney L, Parrish CR, Binn LN, Carmichael LE. Characterization of minute virus of canines (MVC) and its pathogenicity for pups. *Cornell Vet.* 1988;78(2):131-45.
- Manickan E, Rouse BT. Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. *J Virol.* 1995;69(12):8178-9.
- Manning A, Buchan A, Skinner GR, Durham J, Thompson H. The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesviruses. *J Gen Virol.* 1988;69 (Pt 7):1601-8.
- Mayr-Bibrack B. Neues über Ursachen und Bekämpfungsmöglichkeiten des infektiösen Welpensterbens. *Kleintierpraxis.* 1982;27(1):3-8,10.
- McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EA. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol.* 1995;247(3):443-58.
- McGeoch DJ, Dolan A, Ralph AC. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol.* 2000;74(22):10401-6.
- McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology.* 1985;147(1):217-22.
- Miyoshi M, Ishii Y, Takiguchi M, Takada A, Yasuda J, Hashimoto A et al. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J Vet Med Sci.* 1999;61(4):375-9.
- Mochizuki M, Hashimoto M, Hajima T, Takiguchi M, Hashimoto A, Une Y et al. Virologic and serologic identification of minute virus of canines (canine parvovirus type 1) from dogs in Japan. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):3993-8.
- Munnich A, Grussel T, Leopold T. Erfahrungen in der Diagnostik und Therapie von Welpenerkrankungen in den ersten Lebensstagen. *Tierarztl Prax.* 1995;23(5):497-501.
- Nielen AL, van dG, I, Knol BW, Schukken YH. Investigation of mortality and pathological changes in a 14-month birth cohort of boxer puppies. *Vet Rec.* 1998;142(22):602-6.
- Nishikawa Y, Ikeda H, Fukumoto S, Xuan X, Nagasawa H, Otsuka H et al. Immunization of dogs with a canine herpesvirus vector expressing Neospora caninum surface protein, NcSRS2. *Int J Parasitol.* 2000;30(11):1167-71.
- Nishikawa Y, Iwata A, Katsumata A, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I et al. Expression of canine interferon-gamma by a recombinant vaccinia virus and its antiviral effect. *Virus Res.* 2001;75(2):113-21.

- Nuesch JP, Tattersall P. Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology*. 1993;196(2):637-51.
- Ohshima T, Kishi M, Mochizuki M. Sequence analysis of an Asian isolate of minute virus of canines (canine parvovirus type 1). *Virus Genes*. 2004;29(3):291-6.
- Okuda Y, Hashimoto A, Yamaguchi T, Fukushi H, Mori S, Tani M et al. Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. *Cornell Vet*. 1993;83(4):291-302.
- Osterhaus A, Berghuis-De VJ, Steur K. Antiviral antibodies in dogs in the Netherlands. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1977;24(2):123-33.
- Percy DH. Comments on canine herpesvirus: pathogenesis and immune response. *J Am Vet Med Assoc*. 1970;156(12):1721-4.
- Percy DH, Carmichael LE, Albert DM, King JM, Jonas AM. Lesions in puppies surviving infection with canine herpesvirus. *Vet Pathol*. 1971;8(1):37-53.
- Percy DH, Munnell JF, Olander HJ, Carmichael LE. Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. *Am J Vet Res*. 1970;31(1):145-56.
- Percy DH, Olander HJ, Carmichael LE. Encephalitis in the newborn pup due to a canine herpesvirus. *Pathol Vet*. 1968;5(2):135-45.
- Perl S, Brenner J, Nobel TA, Yadin H, Klopfer U, Yakobson B. An outbreak of herpesvirus infection in pups and its possible relationship to hereditary dysgammaglobulinaemia. *Refu Vet*. 1982;39(3):104-9.
- Poste G, King N. Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *Vet Rec*. 1971;88(9):229-33.
- Poulet H, Dubourget P. L'herpès-virose canine. *Point Veterinaire*. 1993;25(151):69-75.
- Poulet H, Guigal PM, Soulier M, Leroy V, Fayet G, Minke J et al. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Vet Rec*. 2001;148(22):691-5.
- Pratelli A, Buonavoglia D, Tempesta M, Guarda F, Carmichael L, Buonavoglia C. Fatal canine parvovirus type-1 infection in pups from Italy. *J Vet Diagn Invest*. 1999;11(4):365-7.
- Pratelli A, Tempesta M, Cirone F, Martella V, Camero M, Buonavoglia C. Canine Parvovirus tipo 1: risultati di una indagine sierologica. *Obiettivi e Documenti Veterinari*. 1998;19(12):61-3.
- Rayment FB, Crosdale E, Morris DJ, Pattison JR, Talbot P, Clare JJ. The production of human parvovirus capsid proteins in *Escherichia coli* and their potential as diagnostic antigens. *J Gen Virol*. 1990;71 ( Pt 11):2665-72.

Reading MJ, Field HJ. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. *Arch Virol.* 1998;143(8):1477-88.

Reading MJ, Field HJ. Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. *Res Vet Sci.* 1999;66(3):273-5.

Remond M, Sheldrick P, Lebreton F, Foulon T. Sequence of the canine herpesvirus thymidine kinase gene: taxon-preferred amino acid residues in the alphaherpesviral thymidine kinases. *Virus Res.* 1995;39(2-3):341-54.

Remond M, Sheldrick P, Lebreton F, Nardeux P, Foulon T. Gene organization in the UL region and inverted repeats of the canine herpesvirus genome. *J Gen Virol.* 1996;77 ( Pt 1):37-48.

Reubel GH, Pekin J, Webb-Wagg K, Hardy CM. Nucleotide sequence of glycoprotein genes B, C, D, G, H and I, the thymidine kinase and protein kinase genes and gene homologue UL24 of an Australian isolate of canine herpesvirus. *Virus Genes.* 2002;25(2):195-200.

Rijsewijk FA, Luiten EJ, Daus FJ, van der Heijden RW, van Oirschot JT. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. *Vet Microbiol.* 1999;65(1):1-7.

Rinaldo D, Foti M, Ginoprelli T, Orlandella BM, Buonavaglia D. Epidemiologia dell' infezione da Parvovirus tipo 1 nel cane: ricerca di anticorpi in cani della Sicilia. *Obiettivi e Documenti Veterinari.* 2000a;21(Supplemento 2):17-9.

Rinaldo D, Macri F, Daidone A, Ginoprelli T, Fisichella V, Buonovoglia D. Canine herpesvirus infection serological survey in Sicily. *Praxis Veterinaria Milano.* 2000b;21(2):8-10.

Roizmann B. *Herpesviridae.* Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher; 1996: 2221-2230.

Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 1992;123(3-4):425-49.

Ronsse V, Poulet H, Verstegen J, Thiry E. L'herpès-virose canine. *Ann Med Vet.* 2003;147(2):65-76.

Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Farnir F, Poulet H. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology.* 2004;61(4):619-36.

Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Guiot AL, Aeberle C, Nauwynck HJ et al. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reprod Domest Anim.* 2002;37(5):299-304.

- Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberle C, Brunet S et al. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*. 2005;64(1):61-74.
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, (Hrsg.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa,NJ: Humana Press; 2000: 365-386.
- Sagazio P, Cirone F, Pratelli A, Tempesta M, Buonovoglia D, Sasanelli M et al. Canine herpesvirus infection. Serological survey in Apulia. *Obiettivi e Documenti Veterinari*. 1998;19(5):63-7.
- Sager M, Remmers C. Ein Beitrag zur perinatalen Welpensterblichkeit beim Hund. *Tierarztl Prax*. 1990;18(4):415-9.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. Auflage. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *1977. Biotechnology*. 1992;24:104-8.
- Schwartz D, Green B, Carmichael LE, Parrish CR. The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology*. 2002;302(2):219-23.
- Schwers A, Pastoret PP, Aguilarsetien A. Fréquence de l'infection par le virus herpétique canin (canine herpesvirus 1) en Belgique. *Ann Med Vet*. 1980;124(5):353-9.
- Seo IB, Song WM, Lim CH. Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. *Korean J Vet Res*. 1994;34(3):647-52.
- Shukla D, Spear PG. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest*. 2001;108(4):503-10.
- Siegl G. The Parvoviruses. In: Gard S, Hallauer C, (Hrsg.). *Virology Monographs*. Berlin: Springer Verlag; 1976.
- Simpson AA, Hebert B, Sullivan GM, Parrish CR, Zadori Z, Tijssen P et al. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J Mol Biol*. 2002;315(5):1189-98.
- Soderlund M, Brown KE, Meurman O, Hedman K. Prokaryotic expression of a VP1 polypeptide antigen for diagnosis by a human parvovirus B19 antibody enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. 1992;30(2):305-11.
- Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol*. 2003;77(19):10179-85.
- Spearman C. *Br J Psychol*. 1908;2:227-42.

- Spertzel RO, Huxsoll DL, McConnell SJ, Binn LN, Yager RH. Recovery and characterization of a herpes-like virus from dog kidney cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1965;120(3):651-5.
- Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U. Parvovirus infections in wild carnivores. *J Wildl Dis.* 2001;37(3):594-607.
- Stewart SE, David-Ferreira J, Lovelace L, Landon J, Stock N. Herpes-like virus isolated from neonatal and fetal dogs. *Science.* 1965;148:1341-3.
- Sugimura T, Yanagawa R. Effect of sodium desoxycholate on infectious canine hepatitis virus, and an additional description of a small associated virus. *Jpn J Vet Res.* 1968;16(1):1-12.
- Takumi A, Kusanagi K, Tuchiya K, Xuan XN, Azetaka M, Takahashi E. Serodiagnosis of canine herpesvirus infection-development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *Jpn J Vet Sci.* 1990;52(2):241-50.
- Tattersall P. The evolution of parvovirus taxonomy. In: Kerr J, Cotmore SF, Bloom ME, Linden RM, Parrish CR, (Hrsg.). *Parvoviruses.* London: Hodder Arnold; 2006.
- Thebault A. Prophylaxis of herpesvirus in dog breeding establishment. *Point Veterinaire.* 2004;35(245):18-23.
- Torun S, Yilmaz Z. A Serological Evidence of Minute Virus of Canines (MVC; Canine Parvovirus Type-1) in Dogs in Turkey. *Turk J Anim Sci.* 2005;29:923-5.
- Truyen U, Wolf G, Carmichael LE. Das "andere" Parvovirus: Erstbeschreibung des Minute Virus of Canines (canines Parvovirus Typ 1) in Deutschland. *Tierärztl Prax.* 1996;24(5):511-3.
- Tyack SG, Studdert MJ, Johnson MA. Nucleotide sequence of canine herpesvirus homologues of herpes simplex virus type 1 US2, US3, glycoproteins I and E, US8.5 and US9 genes. *DNA Seq.* 1997;7(6):365-8.
- Van Engelenburg FA, Maes RK, van Oirschot JT, Rijsewijk FA. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol.* 1993;31(12):3129-35.
- Van Gucht S, Nauwynck H, Pensaert M. Prevalentie van het caniene herpesvirus in kennels en het mogelijk verband met vruchtbaarheidsproblemen en neonatale sterfte. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr.* 2001;70(3):204-11.
- Widmann-Acanal B. Rasseneffekte auf Fortpflanzungs- und Welpenabgangsursachen bei Hunden unter gleichzeitiger Berücksichtigung rassebedingter Dystokiedispositionen [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1992.

- Xuan X, Horimoto T, Limcumpao JA, Takumi A, Tohya Y, Takahashi E et al. Neutralizing determinants of canine herpesvirus as defined by monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 1991;116(1-4):185-95.
- Xuan X, Horimoto T, Limcumpao JA, Tohya Y, Takahashi E, Mikami T. Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection. *Arch Virol.* 1992;122(3-4):359-65.
- Xuan X, Tuchiya K, Sato I, Nishikawa Y, Onoderaz Y, Takashima Y et al. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector. *Vaccine.* 1998;16(9-10):969-76.
- Yamada S, Matsumoto Y, Takashima Y, Otsuka H. Mutation hot spots in the canine herpesvirus thymidine kinase gene. *Virus Genes.* 2005;31(1):107-11.
- Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology.* 1970;40(3):734-44.
- Yoder SM, Zhu Y, Ikizler MR, Wright PF. Role of complement in neutralization of respiratory syncytial virus. *J Med Virol.* 2004;72(4):688-94.
- Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:333-67.



---

## Anhang

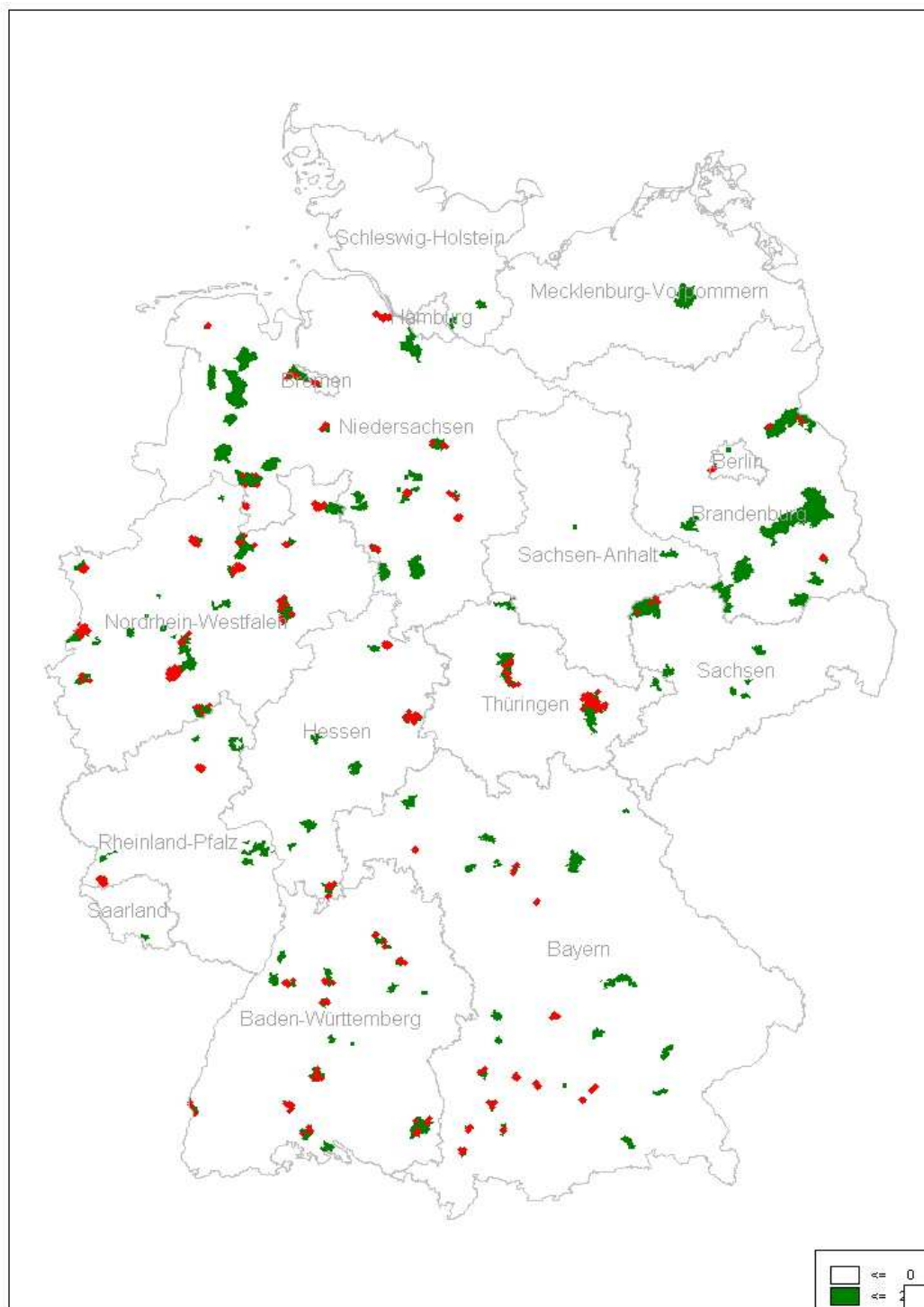
**Tabelle 21: Übersicht Spermaproben mit Angabe der Serologie.**

Nr.	Tgb.Nr	Rasse	SNT
1	144	Neufundländer	1:8
2	146	Labrador	1:8
3	149	Bearded Collie	-
4	150	DSH	-
5	151	-	-
6	152	-	-
7	153	-	neg
8	155	-	neg
9	158	Sloughi	neg
10	160	Australian Shepherd	neg
11	163	Rhodesian Ridgeback	1:8
12	165	Cheasapeak Bay Retriever	neg
13	166	-	-
14	167	Deutsch Langhaar	1:40
15	209	Collie	-
16	243	Coton de Tulear	-
17	354	Dt. Dogge	neg
18	355	-	-
19	356	Irish Setter	1:16
20	357	Dt. Langhaar	-
21	358	Rhodesian Ridgeback	neg
22	359	Rhodesian Ridgeback	neg
23	360	-	-
24	361	Gordon Setter	neg
25	362	Dt. Kurzhaar	neg
26	363	-	-
27	364	-	-
28	365	Gordon Setter	neg
29	366	Span. Wasserhund	neg
30	367	-	-
31	368	Gordon Setter	neg
32	369	Irish Setter	neg
33	370	-	-
34	371	Rottweiler	neg

*Bei den Feldern, die mit einem Strich versehen sind, ist die Rasse nicht bekannt bzw. lag keine Serumprobe zur Untersuchung vor.*

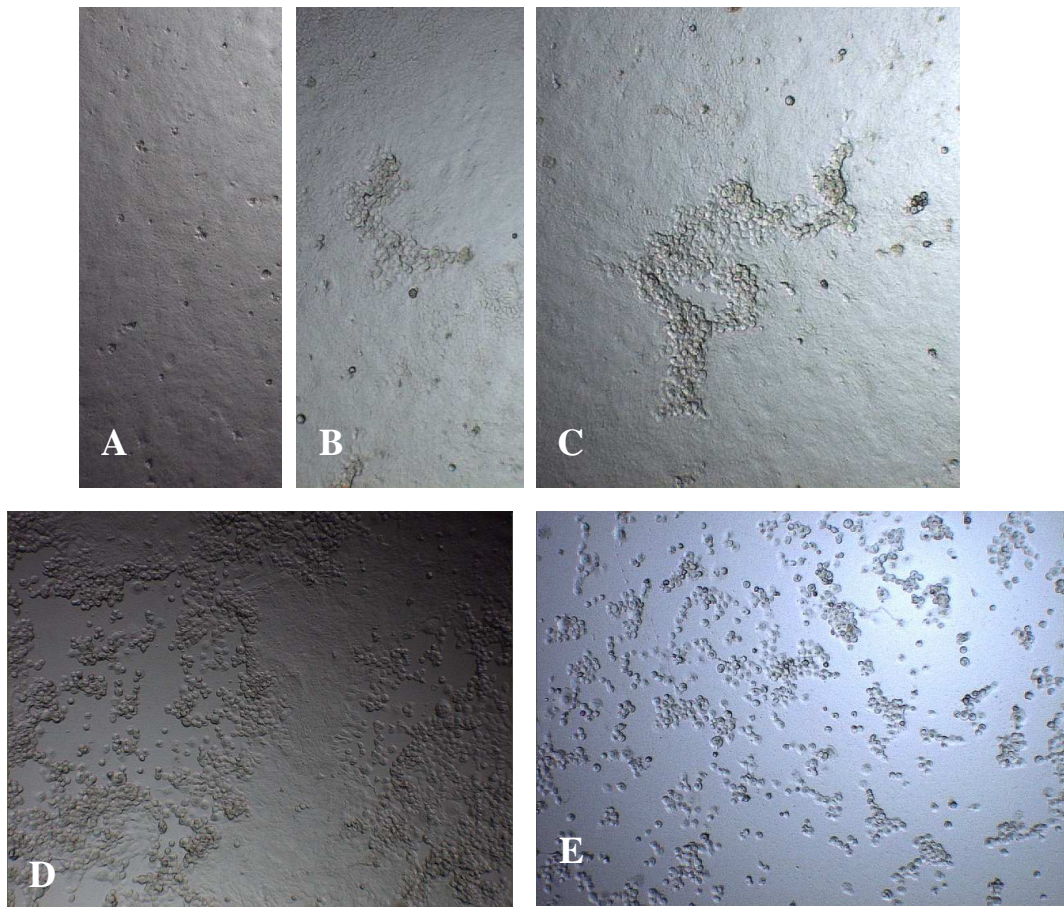
Probenbegleitschein		<a href="http://herpes-beim-hund.de">herpes-beim-hund.de</a>					
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen TÄ Jill Manteufel An den Tierkliniken 1 04103 Leipzig		Name/ Stempel Tierarzt <div style="border: 1px solid black; height: 80px; width: 100%;"></div>					
<b>Datum:</b>							
<b>Hund</b>							
Name Hund:							
Rasse:							
Geschlecht: m / w		Alter:					
Impfung gegen Herpes: ja / nein		wenn ja: Wann					
Klinische Symptome / Vorgeschichte:							
Anzahl Hunde im Haushalt:							
Anzahl Würfe pro Jahr:		Anzahl Welpen pro Jahr:					
Ausstellungsbesuche im Jahr: <input type="radio"/> 1 – 2 <input type="radio"/> 3 - 5 <input type="radio"/> mehr als 6							
<b>Besitzer</b>							
Name:							
Postleitzahl:							
Telefonnummer :							
<b>Art der Probe:</b>							
<input type="checkbox"/>	Serum	<input type="checkbox"/>	EDTA-Blut	<input type="checkbox"/>	Kot	<input type="checkbox"/>	Sperma
<input type="checkbox"/>	Tupferproben	<input type="checkbox"/>	Rachen	<input type="checkbox"/>	Vulva/Vagina	<input type="checkbox"/>	Präputium
<input type="checkbox"/>	Tierkörper Welpen	<input type="checkbox"/>	euth./gestorben am:				

Abbildung 27: Probenbegleitschein



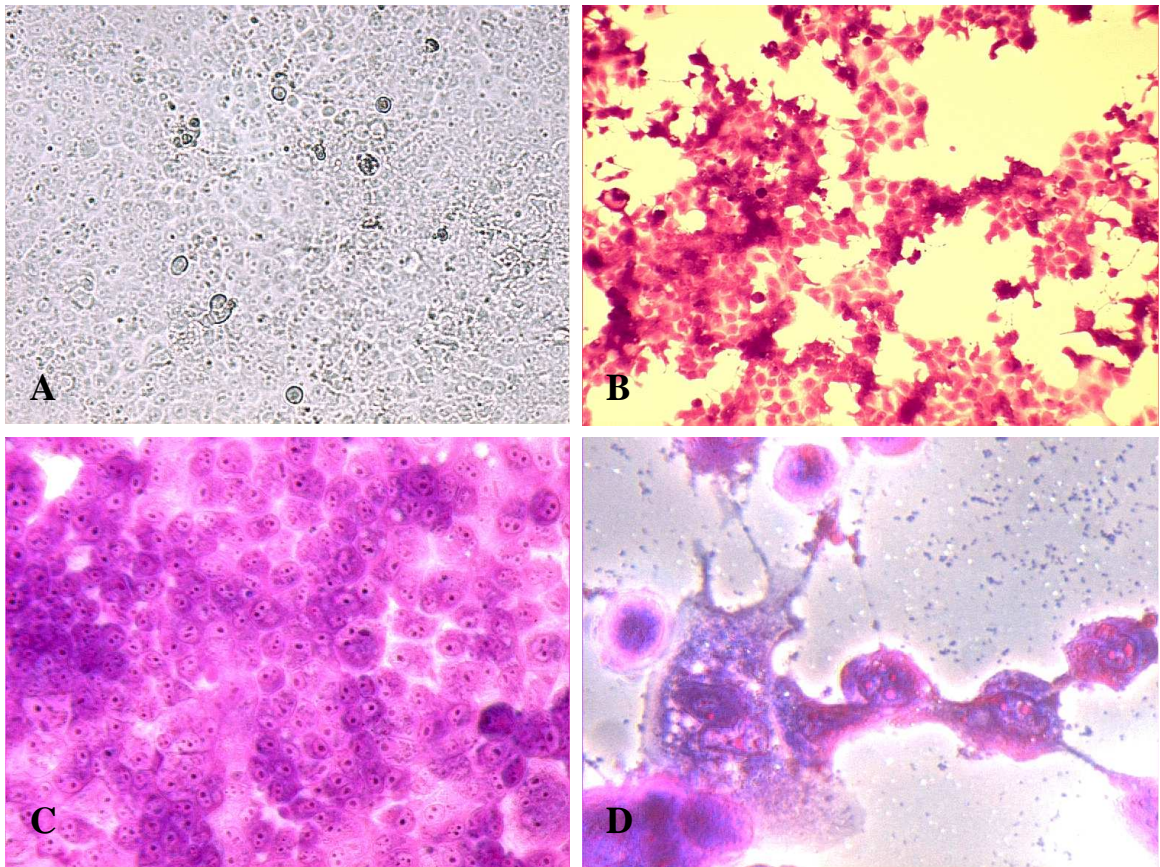
**Abbildung 28: Geographische Verteilung der untersuchten Serumproben**

In der Graphik sind alle Postleitzahlenbereiche dargestellt, aus denen Seren zur Untersuchung eingesandt wurden. Seren, die im Serumneutralisationstest als CHV-1 positiv ermittelt wurden, sind entsprechend ihrer Postleitzahl als rote Punkte in den grünen Flächen markiert.



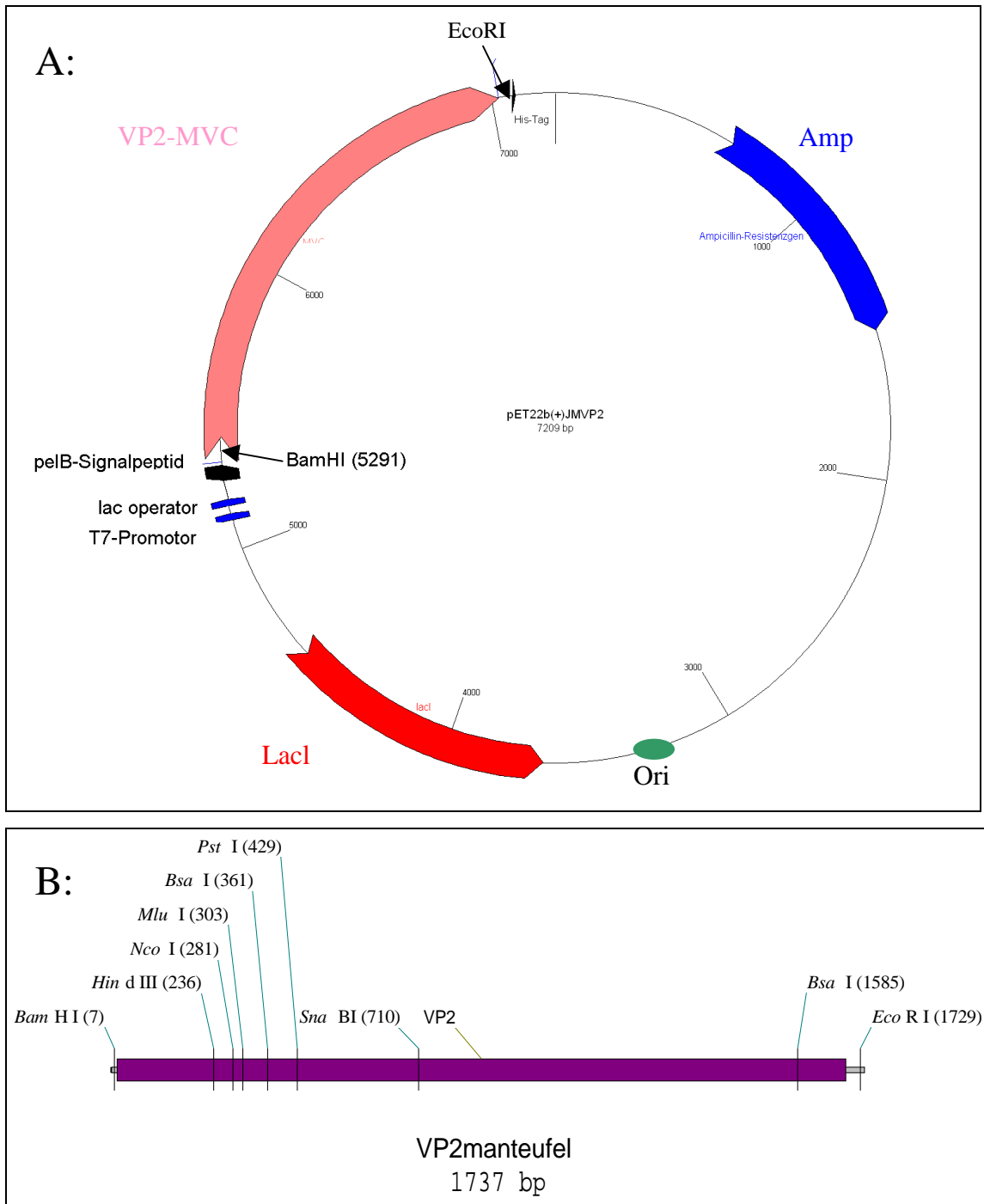
**Abbildung 29: Darstellung des cpE von CHV-1 auf MDCK-Zellen**

Frisch ausgesäte MDCK-Zellen wurden mit CHV-1 infiziert. Dargestellt wird die Entwicklung des cpE und die verschiedenen Ausprägungsgrade in Abhängigkeit von der Zeit. **A:** Zellkontrolle. **B:** fokale Abrundung der Zellen. **C:** Fortschreiten der Abrundung und wallartigen Aufschüttung nach Peripher, sowie gleichzeitiger zentraler Ablösung der Zellen. **D:** 50%iger cpE. Zwischen den sich vergrößernden Plaques intakter Zellmonolayer. **E:** 100% iger cpE. Vollständige Ablösung der Zellen. Bild ca. 72h nach Infektion. Alle Aufnahmen mit 40x Vergrößerung aufgenommen.



**Abbildung 30: Beispiel cpE von WRCC-Zellen infiziert mit CnMV**

**A:** Zellkontrolle WRCC. (40x) **B:** cpE von CnMV. Zellen mit Krystallviolett angefärbt. (40x) **C:** Zellkontrolle, angefärbt mit Krystallviolett. (200x) **D:** Detailansicht der strahlenförmigen Zellfortsätze von CnMV-infizierten WRCC.(400x).



**Abbildung 31: Plasmidkarte des Expressionsvektors pET22b(+)/JMVP2 und das CnMV-VP2 Insert im Detail**

**A: pET22b(+)/JMVP2.** Als Selektionsmarker dient die Ampicillinresistenz. Ori bezeichnet den Replikationsursprung zur Vermehrung der Plasmid-DNA während der Bakterienzellteilung. Die Regulation der Expression erfolgt über den lacI-Repressor am lac-operator. Die Balken auf dem Plasmid zeigen die Lokalisation und Orientierung der kodierenden Sequenzen. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI vor und hinter dem inserierten CnMV-VP2-Gen sind durch Pfeile gekennzeichnet. **His-Tag:** Hexahistidin-Tag; **Amp:** Ampicillinresistenz; **LacI:**  $\beta$ -Galaktosegen **B: CnMV-VP2 Gen** mit den für die Klonierung eingebauten Restriktionsschnittstellen für EcoRI und BamHI an beiden Enden des Fragmentes.

**Tabelle 22: Übersicht Kotproben**

Nr.	Tgb.Nr	Rasse	Serum	IFT	PCR	VI
1.	317	Bernhardiner	-	-	neg	1.P
2.	374	DSH	-	-	neg	1. + 2.P
3.	379	DSH	-	-	neg	1. + 2.P
4.	384	DSH	-	-	neg	1. + 2.P
5.	389	DSH	-	-	neg	1. + 2.P
6.	394	DSH	-	-	neg	1. + 2.P
7.	551	Boxer	550	neg	neg	-
8.	624	Beagle	623	neg	neg	1.P
9.	626	Beagle	621	neg	neg	1.P
10.	627	Beagle	618	neg	neg	1.P
11.	628	Beagle	617	neg	neg	1.P
12.	629	Beagle	-	-	neg	1.P
13.	631	Beagle	614	neg	neg	1.P
14.	678	Beagle	-	-	neg	1. + 2.P
15.	679	Leonberger	-	-	neg	1. + 2.P
16.	748	Leonberger	-	-	neg	1.P

*Bei den Feldern, die mit einem Strich versehen sind, wurde die Untersuchung nicht vorgenommen bzw. lag keine Serumprobe zur Untersuchung vor. VI: Virusisolierung, P: Passage*

Tabelle 23: Übersicht Tupferproben

Nr.	Tgb.Nr.	Abstrich von...	Rasse	w/m	Serum	Ergebnisse		
						SNT	PCR	VI
1.	140	Vagina	unbekannt (TiHo)	w	142	neg.	neg	-
2.	141	Präputium	unbekannt (TiHo)	m	164	neg.	neg	-
3.	221	Vagina	Frz. Bulldogge	w	295	1:16	neg	-
4.	222	Vagina	Frz. Bulldogge	w	296	1:8	neg	-
5.	223	Vagina	Frz. Bulldogge	w	298	1:64	neg	-
6.	224	Vagina	Frz. Bulldogge	w	300	1:4	neg	-
7.	241	Ra./Vag.	Irish Wolfhound	w	-	-	neg	1. + 2.P
8.	242	Rachen	Irish Wolfhound	w	-	-	neg	1. + 2.P
9.	244	Vagina	Coton de Tulear	w	-	-	neg	1. + 2.P
10.	245	Vagina	Bichon Frisee	w	-	-	neg	1. + 2.P
11.	246	Vagina	Bolonka Zwetna	w	-	-	neg	1. + 2.P
12.	247	Rachen	Irish Wolfhound	m	-	-	neg	1. + 2.P
13.	248	Ra./Vag.	Irish Wolfhound	w	-	-	neg	1. + 2.P
14.	309	Rachen	Dogge	w	307	neg.	neg	1. + 2.P
15.	310	Vagina	Dogge	w	307	neg.	neg	1. + 2.P
16.	315	Rachen	Bernhardiner	w	-	-	neg	1. + 2.P
17.	316	Vagina	Bernhardiner	w	-	-	neg	1. + 2.P
18.	332	Rachen	Golden Retriever	w	330	neg	neg	-
19.	375	Rachen	Dt. Schäferhund	w	372	neg.	neg	1. + 2.P
20.	376	Vagina	Dt. Schäferhund	w	372	neg.	neg	1. + 2.P
21.	380	Rachen	Dt. Schäferhund	w	377	neg.	neg	1. + 2.P
22.	381	Vagina	Dt. Schäferhund	w	377	neg.	neg	1. + 2.P
23.	385	Rachen	Dt. Schäferhund	w	382	neg.	neg	1. + 2.P
24.	386	Vagina	Dt. Schäferhund	w	382	neg.	neg	1. + 2.P
25.	390	Rachen	Dt. Schäferhund	w	387	neg.	neg	1. + 2.P
26.	391	Vagina	Dt. Schäferhund	w	387	neg.	neg	1. + 2.P
27.	395	Rachen	Dt. Schäferhund	w	394	neg.	neg	1. + 2.P
28.	396	Vagina	Dt. Schäferhund	w	394	neg.	neg	1. + 2.P
29.	399	Rachen	Golden Retriever	w	397	neg.	neg	1.P
30.	558	-	Soft Coated Terrier	w	S558	1:4	neg	-
31.	707	-	Scottish Terrier	w	-	-	-	1.P
32.	708	-	Scottish Terrier	m	-	-	-	1.P
33.	709	-	Scottish Terrier	w	-	-	-	1.P
34.	739	Vagina	Rottweiler	w	738	neg.	neg	1.P
35.	740	Vagina	Rottweiler	w	738	neg.	neg	1.P
36.	757	Rachen	Jack Russel Terrier	w	756	neg.	neg	-
37.	758	Vagina	Jack Russel Terrier	w	756	neg.	neg	1.P

Bei den Feldern, die mit einem Strich versehen sind, fehlen die Angaben oder lag keine Serumprobe zur Untersuchung vor. P: Passage



**Tabelle 24: Übersicht der zur Untersuchung eingesandten Welpen**

Nr.	Tgb.Nr	Rasse	Anzahl	Vorbericht	Serum	SNT	IFT	Pathologie
1.	210f	Frz. Bulldogge	2	Welpensterblichkeit (8.d), Anorexie, Kaiserschnitt	295	1:16	neg	bakteriell
2.	212ff	Schweizer Sennen Hunde	6	Totgeburten, lebensschwache Welpen, Kaiserschnitt	218	neg	neg	-
3.	238f	Golden Retriever	2	Welpensterblichkeit, Kaiserschnitt	-	-	-	-
4.	290ff	American Cocker Spaniel	1	Spätabort (51.d)	289	neg	neg	-
5.	311ff	Mops	4	Spätabort (50.d)	-	-	-	kein Hinweis auf infektiöses Geschehen
6.	414ff	Bouvier	6	Totgeburten	740-752	neg	neg	-
7.	433ff	Kleine Münsterländer	7	Welpensterblichkeit	423	1:16	neg	-
8.	450	Cavalier King Charles	1	-	441	1:32	neg	kein Hinweis auf infektiöses Geschehen
9.	518f	Golden Retriever	2	Totgeburten	-	-	-	-
10.	547f	Dackel	2	Totgeburten, Zwergwuchs	546	neg	neg	-
11.	746	Boxer	1	Welpensterblichkeit (7.d), Leerbleiben, Atemwegsinfektionen	747	1:8	neg	-
12.	753f	Zwergschnauzer	2	Anorexie	-	-	-	Nachweis <i>E.coli</i>
13.	537	Tibet Terrier	1	-	556, 635	neg	neg	Nachweis Staph. intermedius
14.	412f	Collie	2	Welpensterblichkeit (6.d)	411	neg	neg	kein Hinweis auf infektiöses Geschehen

**Tabelle 25: Übersicht Seren**

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
UT 375	Hovawart	weiblich	.	.	.	1:10	neg	.
UT 360	Hovawart	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 351	Hovawart	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
E4	Hovawart	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
F5	Berner Sennen	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 349	Tibet Terrier	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 352	DSH	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 612	Cocker Spaniel	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 769	Cocker Spaniel	weiblich	.	.	.	.	neg	.
UT 366	Border Collie	weiblich	.	.	.	1:40	neg	.
UT 367	Border Collie	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 368	Samojede	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 381	Briard	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
UT 388	Teckel	weiblich	.	.	.	.	neg	.
UT 431	Kuvasz	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
UT 395	Pyrenäenberghund	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
D8	Alano Espanol	weiblich	.	.	.	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
UT 350	Hovawart	weiblich	.	.	.	neg	1:8	.
UT 432	Hovawart	weiblich	.	.	.	neg	1:8	.
UT 371	Hovawart	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
UT 384	Bernhardiner	weiblich	.	.	.	neg	1:8	.
UT 364	Bernhardiner	weiblich	.	.	.	neg	1:8	.
UT363	Bernhardiner	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
UT 344	Berner Sennen	weiblich	.	.	.	neg	1:128	.
UT 390	Berner Sennen	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
UT 462	DSH	weiblich	.	.	.	1:20	1:16	.
UT 520	DSH	weiblich	.	.	.	neg	1:8	.
UT 246	Cocker Spaniel	weiblich	.	.	.	.	1:128	.
UT 365	Cocker Spaniel	weiblich	.	.	.	neg	1:16	.
UT 421	Border Collie	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
UT 556	Briard	weiblich	.	.	.	neg	1:32	.
UT 385	Teckel	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
UT 385	Teckel	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
567B	Teckel	weiblich	24	31	mehr als 6	neg	1:4	.
UT 388	Teckel	weiblich	.	.	.	.	1:4	.
UT403	Pyrenäenberghund	weiblich	.	.	.	1:80	1:16	.
UT 402	Pyrenäenberghund	weiblich	.	.	.	neg	1:16	.
UT 428	Golden Retriever	weiblich	.	.	.	neg	1:4	.
UT 476	Bobtail	weiblich	.	.	.	neg	1:128	.
UT 489	Landseer	weiblich	.	.	.	neg	1:8	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
UT 548	Labrador	weiblich	.	.	.	neg	1:8	.
567A	Australian Shepherd	männlich	78	3	mehr als 6	neg	1:4	.
142	.	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
143	.	männlich	.	.	.	neg	neg	.
145	Neufundländer	männlich	.	.	.	neg	1:8	.
147	Labrador	männlich	.	.	.	neg	1:8	.
148	Rhodesian Ridgeback	männlich	.	.	.	neg	1:8	.
154	.	männlich	.	.	.	neg	neg	.
156	.	männlich	.	.	.	neg	neg	.
157	Dogge	männlich	.	.	.	neg	neg	.
159	Sloughi	männlich	.	.	.	neg	neg	.
161	Australian Shepherd	männlich	.	.	.	neg	neg	.
162	.	männlich	.	.	.	neg	neg	.
164	Golden Retriever	männlich	.	.	.	neg	neg	.
219	Gr. Schweizer Sennen	weiblich	36	.	.	neg	neg	Totgeburt, lebensschwache Welpen, verlängerte Läufigkeit
220	Irish Wolfhound	weiblich	72	1	3-5	neg	neg	.
225	Barsoi	weiblich	66	9	1-2	neg	neg	Welpensterben
226	Barsoi	männlich	108	9	0	neg	neg	.
227	Barsoi	männlich	108	9	0	neg	neg	.
228	Barsoi	männlich	42	9	0	neg	neg	.
229	Barsoi	männlich	10	9	0	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
230	Barsoi	weiblich	10	9	3-5	neg	neg	.
231	Barsoi	weiblich	24	9	mehr als 6	neg	neg	.
232	Barsoi	männlich	42	9	mehr als 6	neg	neg	.
233	Barsoi	weiblich	84	9	1-2	neg	neg	.
234	Irish Wolfhound	weiblich	48	.	.	1:80	1:64	.
235	Irish Wolfhound	weiblich	60	.	.	neg	neg	.
236	Irish Wolfhound	weiblich	60	.	.	1:40	1:32	.
237	Irish Wolfhound	weiblich	36	.	.	neg	1:16	.
238	ital. Windspiel	weiblich	48	3	mehr als 6	neg	neg	.
240	Irish Wolfhound	weiblich	72	1	3-5	neg	neg	.
248	Irish Wolfhound	weiblich	18	15	mehr als 6	neg	.	.
249	Labrador	.	2	.	.	neg	1:128	.
251	Labrador	.	2	.	.	neg	1:128	.
253	Labrador	.	2	.	.	neg	neg	.
255	Labrador	.	2	.	.	neg	1:128	.
257	Labrador	.	2	.	.	neg	1:16	.
259	Labrador	.	2	.	.	neg	1:64	.
261	Labrador	.	2	.	.	neg	1:128	.
263	Labrador	.	2	.	.	neg	1:32	.
265	Labrador	.	2	.	.	neg	1:16	.
267	Deerhound	weiblich	84	4	mehr als 6	neg	neg	.
269	Deerhound	männlich	36	4	mehr als 6	neg	neg	.
271	Deerhound	männlich	84	4	mehr als 6	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in	Hunde im	Ausstellungs-	Ergebnis SNT	Ergebnis IFT	Vorbericht/ Symptome
			Monaten	Zwinger	besuche pro J	(CHV-1 Ak)	(MVC Ak)	
273	Deerhound	weiblich	36	4	mehr als 6	neg	neg	.
275	ital. Windspiel	weiblich	24	6	mehr als 6	neg	.	.
276	ital. Windspiel	weiblich	48	6	1-2	1:10	.	.
277	ital. Windspiel	weiblich	36	6	mehr als 6	neg	.	.
278	ital. Windspiel	weiblich	24	6	1-2	neg	.	.
279	Deerhound	weiblich	36	4	mehr als 6	neg	neg	.
281	Deerhound	weiblich	84	4	mehr als 6	neg	neg	.
283	Deerhound	männlich	36	4	mehr als 6	neg	neg	.
285	Deerhound	männlich	84	4	mehr als 6	neg	neg	.
289	Cocker Spaniel	weiblich	36	12	mehr als 6	neg	neg	Spätabort
295	Frz. Bulldogge	weiblich	18	8	3-5	neg	1:16	.
296	Frz. Bulldogge	weiblich	24	8	3-5	neg	1:8	.
297	Frz. Bulldogge	weiblich	14	8	3-5	neg	1:8	.
298	Mops	weiblich	36	8	3-5	neg	1:64	.
299	Mops	weiblich	60	8	3-5	neg	neg	.
300	Frz. Bulldogge	weiblich	36	8	3-5	neg	1:4	.
301	Frz. Bulldogge	weiblich	8	8	3-5	neg	1:4	.
302	Frz. Bulldogge	weiblich	7	8	3-5	neg	1:4	.
303	Deerhound	männlich	78	8	mehr als 6	neg	1:64	.
304	Deerhound	weiblich	78	8	mehr als 6	neg	1:64	.
305	Deerhound	männlich	36	8	mehr als 6	neg	1:64	.
306	Deerhound	weiblich	72	8	mehr als 6	neg	1:32	.
307	Dogge	weiblich	30	2	.	neg	neg	Totgeburt, lebensschwache

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
								Welpen
318	Coton de Tulear	weiblich	24	4	mehr als 6	neg	neg	Leerbleiben, Totgeburt
319	Coton de Tulear	weiblich	24	4	mehr als 6	neg	neg	Leerbleiben, Totgeburt
320	Coton de Tulear	weiblich	.	4	mehr als 6	neg	neg	.
321	Coton de Tulear	weiblich	.	4	mehr als 6	neg	neg	.
322	Coton de Tulear	männlich	8	4	mehr als 6	neg	neg	.
323	Coton de Tulear	männlich	8	4	mehr als 6	neg	neg	.
324	Coton de Tulear	männlich	.	4	mehr als 6	neg	neg	.
325	Coton de Tulear	männlich	.	4	mehr als 6	neg	neg	.
326	Zwergschnauzer	männlich	.	.	.	neg	neg	.
328	Zwergschnauzer	weiblich	96	.	.	neg	neg	.
330	Golden Retriever	weiblich	84	1	1-2	neg	neg	Leerbleiben, respiratorische Symptome
333	Labrador	weiblich	96	.	.	neg	neg	.
335	Dogge	weiblich	48	4	3-5	neg	neg	.
337	Dandie Terrier	Dinmont weiblich	24	4	3-5	neg	neg	Spätabort
340	Irish Setter	männlich	.	.	.	neg	neg	.
341	Irish Setter	männlich	.	.	.	neg	1:16	.
342	Sloughi	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
343	Sloughi	männlich	.	.	.	neg	neg	.
344	Berner Sennen	männlich	.	.	.	neg	neg	.
345	Sloughi	weiblich	.	.	.	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
346	Gordon Setter	männlich	.	18	mehr als 6	neg	neg	.
347	Dogge	männlich	.	.	.	neg	neg	.
348	Deutsch Kurzhaar	männlich	.	.	.	neg	neg	.
349	Rhodesian Ridgeback	männlich	.	.	.	neg	neg	.
350	Deutsch Kurzhaar	männlich	.	.	.	neg	neg	.
351	Gordon Setter	männlich	84	.	mehr als 6	neg	neg	.
352	Rhodesian Ridgeback	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
353	span. Wasserhund	männlich	.	.	.	neg	neg	.
372	DSH	weiblich	60	5	1-2	neg	neg	.
377	DSH	weiblich	48	5	1-2	neg	neg	.
382	DSH	männlich	24	5	1-2	neg	neg	.
387	DSH	weiblich	5	5	1-2	neg	neg	.
392	DSH	weiblich	48	5	1-2	neg	neg	.
397	Golden Retriever	weiblich	84	1	1-2	neg	neg	.
401	DSH	weiblich	5	5	1-2	neg	neg	.
403	DSH	weiblich	60	5	1-2	neg	neg	.
405	DSH	weiblich	48	5	1-2	neg	neg	.
407	DSH	weiblich	5	5	1-2	neg	neg	.
409	DSH	weiblich	48	5	1-2	neg	neg	.
411	Collie	weiblich	72	8	.	neg	neg	.
420	Deutsch Kurzhaar	weiblich	48	.	.	neg	.	Welpensterben
421	Deutsch Kurzhaar	weiblich	48	.	.	neg	neg	Welpensterben
423	Kleiner Münsterländer	weiblich	48	.	.	neg	1:16	Welpensterben



Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
440	Teckel	weiblich	96	3	3-5	neg	1:16	Welpensterben
441	Cavalier King Charles Spaniel	weiblich	48	25	mehr als 6	neg	1:32	Welpensterben
442	Alaskan Malamute	weiblich	12	5	3-5	neg	1:8	.
443	Alaskan Malamute	männlich	36	5	3-5	neg	neg	.
444	Alaskan Malamute	männlich	72	5	3-5	neg	1:4	.
445	Alaskan Malamute	weiblich	84	5	3-5	neg	neg	.
446	Alaskan Malamute	weiblich	48	5	3-5	neg	1:8	Welpensterben
447	Gr. Schweizer Sennen	weiblich	36	3	mehr als 6	neg	1:16	Leerbleiben
448	Gr. Schweizer Sennen	weiblich	60	3	mehr als 6	neg	1:8	Leerbleiben
451	Shiba Inu	weiblich	60	10	.	neg	neg	.
452	Shiba Inu	weiblich	24	10	.	neg	neg	.
453	Japan Spitz	weiblich	12	10	.	neg	neg	.
454	Shiba Inu	männlich	6	10	.	neg	neg	.
455	Shiba Inu	weiblich	24	10	.	neg	neg	.
456	Shiba Inu	weiblich	48	10	.	neg	neg	.
457	Shiba Inu	weiblich	84	10	.	neg	neg	.
458	Shiba Inu	weiblich	36	10	.	neg	neg	.
459	Shiba Inu	weiblich	36	10	.	neg	neg	.
460	Shiba Inu	weiblich	60	10	.	neg	neg	.
461	Collie	männlich	57	6	mehr als 6	neg	neg	.
462	Collie	männlich	120	6	3-5	neg	neg	.
463	Collie	weiblich	8	6	3-5	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
464	Collie	weiblich	24	6	3-5	neg	neg	.
465	Collie	weiblich	84	6	3-5	neg	neg	Welpensterben
466	Collie	weiblich	90	6	.	neg	neg	.
469	Cairn Terrier	weiblich	.	.	.	neg	1:32	Welpensterben
470	Cairn Terrier	männlich	.	.	.	neg	neg	.
471	Cairn Terrier	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
472	Cairn Terrier	weiblich	.	.	.	neg	1:16	.
473	Cairn Terrier	weiblich	.	.	.	neg	1:64	.
474	Basset	weiblich	71	.	.	neg	1:8	.
475	Basset	weiblich	70	11	mehr als 6	neg	1:16	.
476	Basset	weiblich	27	11	mehr als 6	neg	neg	.
477	Basset	männlich	24	11	mehr als 6	neg	neg	.
478	Basset	männlich	.	11	mehr als 6	neg	neg	.
479	Basset	männlich	88	11	mehr als 6	neg	neg	.
480	Basset	weiblich	52	11	mehr als 6	neg	neg	.
481	Basset	weiblich	48	11	mehr als 6	neg	neg	.
482	Basset	männlich	10	11	mehr als 6	neg	neg	.
483	Basset	männlich	8	11	mehr als 6	neg	neg	.
484	Basset	weiblich	24	11	mehr als 6	neg	neg	.
485	Basset	weiblich	18	11	mehr als 6	neg	1:8	.
486	Basset	weiblich	48	5	1-2	neg	neg	Leerbleben
487	Berner Sennen	weiblich	24	3	3-5	neg	neg	Fruchtresorption
488	Basset	weiblich	18	3	mehr als 6	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
489	Basset	weiblich	36	3	mehr als 6	1:10	neg	.
490	Tibet Terrier	weiblich	20	2	mehr als 6	neg	neg	.
491	Tibet Terrier	männlich	.	2	mehr als 6	neg	neg	.
492	Basset	weiblich	12	6	mehr als 6	neg	neg	.
493	Basset	weiblich	7	6	mehr als 6	neg	1:8	.
494	Basset	weiblich	36	6	mehr als 6	neg	neg	Welpensterben
495	Basset	weiblich	60	6	mehr als 6	neg	1:64	.
496	Basset	weiblich	84	6	mehr als 6	neg	1;32	.
497	Basset	weiblich	120	6	mehr als 6	neg	1:16	.
498	Bordeauxdogge	weiblich	5	4	3-5	neg	neg	.
499	Bordeauxdogge	männlich	72	4	3-5	neg	neg	.
500	Bordeauxdogge	weiblich	36	4	3-5	neg	neg	.
501	Bordeauxdogge	weiblich	13	4	3-5	neg	neg	.
502	Hovawart	weiblich	60	3	1-2	neg	1:8	.
503	Hovawart	weiblich	14	3	3-5	neg	1:4	.
504	Zwergschnauzer	weiblich	48	10	mehr als 6	neg	neg	.
505	Teckel	weiblich	.	3	mehr als 6	neg	neg	.
506	Riesenschnauzer	weiblich	60	10	mehr als 6	neg	neg	.
507	Zwergschnauzer	weiblich	60	10	mehr als 6	neg	neg	.
508	Zwergschnauzer	weiblich	30	10	mehr als 6	neg	neg	.
509	Zwergschnauzer	weiblich	84	10	mehr als 6	neg	1:8	.
510	Riesenschnauzer	weiblich	24	10	mehr als 6	neg	neg	.
511	Neufundländer	weiblich	60	.	.	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
512	Neufundländer	weiblich	60	.	.	neg	neg	.
513	Magyar Vizsla	weiblich	.	8	mehr als 6	neg	neg	Fruchtresorption
514	Magyar Vizsla	männlich	48	8	mehr als 6	neg	neg	.
515	Teckel	weiblich	24	8	mehr als 6	neg	neg	.
516	Teckel	weiblich	72	8	mehr als 6	neg	neg	.
517	Teckel	männlich	48	8	mehr als 6	neg	neg	.
520	Bernhardiner	männlich	24	4	mehr als 6	neg	neg	.
521	Bernhardiner	männlich	48	4	mehr als 6	.	1:64	.
522	Bernhardiner	weiblich	60	4	mehr als 6	neg	neg	Leerbleiben, Mummifikation
523	Teckel	weiblich	24	6	.	neg	neg	respiratorische Symptome
525	Pudel	weiblich	18	1	3-5	.	neg	.
526	Collie	weiblich	84	12	mehr als 6	neg	neg	Leerbleiben
527	Basset	weiblich	84	3	1-2	neg	1:16	.
528	Basset	weiblich	29	3	1-2	neg	neg	.
529	Basset	weiblich	48	3	mehr als 6	neg	1:4	.
531	Sheltie	weiblich	48	1	1-2	neg	1:8	.
532	Weisser Schweizer Schäferhund	weiblich	60	3	1-2	neg	1:8	Fruchtresorption, Ataxie, Schwäche
533	Weisser Schweizer Schäferhund	weiblich	24	3	1-2	neg	neg	.
534	Collie	weiblich	114	3	1-2	neg	1:4	Welpensterben
535	Collie	weiblich	72	1	0	neg	neg	.
536	Collie	weiblich	96	3	1-2	neg	neg	Leerbleiben

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
538	Teckel	weiblich	48	3	mehr als 6	neg	1:8	.
539	Boxer	weiblich	24	2	3-5	neg	neg	Leerbleiben
540	Boxer	männlich	72	2	3-5	neg	neg	.
541	Hovawart	weiblich	24	2	mehr als 6	neg	.	.
542	Hovawart	weiblich	36	3	1-2	neg	.	Totgeburt
543	Pudel	männlich	19	1	mehr als 6	neg	neg	.
544	Briard	weiblich	84	13	mehr als 6	neg	neg	Welpensterben
545	Briard	weiblich	72	13	mehr als 6	1:160	neg	Welpensterben, lebensschwache Welpen
546	Teckel	weiblich	48	1	.	neg	neg	Mißbildungen
549	Bologneser	weiblich	42	5	1-2	neg	1:4	Welpensterben
550	Boxer	weiblich	78	5	1-2	neg	1:4	.
552	Hovawart	weiblich	36	1	3-5	neg	1:4	Welpensterben, Totgeburt
553	Tibet Terrier	männlich	132	4	3-5	neg	neg	.
554	Tibet Terrier	weiblich	15	4	.	neg	neg	.
555	Tibet Terrier	weiblich	84	4	.	neg	neg	.
556	Tibet Terrier	weiblich	60	4	.	neg	neg	.
557	Teckel	weiblich	84	1	.	neg	neg	.
558	Irish Soft Coated Wheaten Terrier	weiblich	36	3	mehr als 6	neg	1:4	Leerbleiben
559	DSH	weiblich	48	3	3-5	neg	neg	Leerbleiben
560	Berger Picard	weiblich	96	7	1-2	1:40	1:8	.
561	Berger Picard	weiblich	7	7	1-2	neg	1:8	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
562	Berger Picard	weiblich	7	7	0	neg	1:8	.
563	Berger Picard	weiblich	24	7	3-5	neg	1:32	.
564	Teckel	weiblich	31	1	1-2	neg	neg	.
565	Australian Shepherd	weiblich	60	3	mehr als 6	neg	1:64	.
566	Australian Shepherd	weiblich	19	3	mehr als 6	neg	1:64	.
568	Teckel	weiblich	24	31	mehr als 6	neg	1:8	.
569	Teckel	männlich	30	31	mehr als 6	neg	neg	.
570	Teckel	männlich	14	31	mehr als 6	neg	neg	.
571	Teckel	männlich	42	31	mehr als 6	neg	1:4	.
572	Teckel	weiblich	7	31	mehr als 6	neg	neg	.
573	Mops	weiblich	48	31	mehr als 6	neg	1:8	.
574	Mops	weiblich	24	31	mehr als 6	neg	1:4	.
575	Border Terrier	weiblich	18	31	mehr als 6	neg	1:4	.
576	Teckel	weiblich	60	31	mehr als 6	neg	1:8	.
577	Mops	weiblich	14	31	mehr als 6	neg	neg	.
578	Teckel	weiblich	18	31	mehr als 6	neg	1:4	.
579	Teckel	weiblich	30	31	mehr als 6	neg	neg	.
580	Teckel	weiblich	60	31	mehr als 6	neg	1:4	.
581	Teckel	weiblich	48	31	mehr als 6	neg	neg	.
582	Teckel	weiblich	10	31	mehr als 6	neg	1:32	.
583	Teckel	weiblich	13	31	mehr als 6	1:80	1:64	.
584	Teckel	weiblich	48	31	mehr als 6	neg	1:128	.
585	Mops	weiblich	48	31	mehr als 6	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
586	Coton de Tulear	männlich	72	20	mehr als 6	neg	neg	.
587	Whippet	weiblich	24	20	mehr als 6	neg	neg	.
588	Whippet	männlich	24	20	mehr als 6	neg	neg	.
589	Barsoi	männlich	42	20	mehr als 6	neg	neg	.
590	Whippet	männlich	30	20	mehr als 6	neg	neg	.
591	Whippet	männlich	24	20	mehr als 6	1:20	neg	.
592	Teckel	weiblich	18	20	mehr als 6	neg	neg	.
593	Whippet	weiblich	18	20	mehr als 6	neg	neg	.
594	Coton de Tulear	weiblich	60	20	mehr als 6	neg	neg	.
595	Whippet	weiblich	5	20	mehr als 6	neg	neg	.
596	Whippet	weiblich	6	20	mehr als 6	neg	neg	.
597	Whippet	weiblich	12	20	mehr als 6	neg	neg	.
598	Mops	weiblich	24	20	mehr als 6	neg	neg	.
599	Coton de Tulear	weiblich	24	20	mehr als 6	neg	neg	.
600	Coton de Tulear	weiblich	24	20	mehr als 6	neg	neg	.
601	Coton de Tulear	weiblich	72	20	mehr als 6	neg	neg	.
602	Coton de Tulear	weiblich	120	20	mehr als 6	neg	neg	.
603	Whippet	weiblich	42	20	mehr als 6	neg	neg	.
604	Whippet	weiblich	48	20	mehr als 6	1:40	neg	.
605	Whippet	weiblich	24	20	mehr als 6	neg	neg	.
606	Whippet	weiblich	60	20	mehr als 6	1:20	neg	.
607	Whippet	weiblich	36	20	mehr als 6	neg	neg	.
608	Whippet	weiblich	108	20	mehr als 6	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
609	Deerhound	weiblich	108	20	mehr als 6	neg	neg	.
610	Whippet	weiblich	72	20	mehr als 6	neg	neg	.
611	Dogge	männlich	24	13	mehr als 6	neg	neg	.
612	Beagle	weiblich	120	13	mehr als 6	neg	neg	.
613	Beagle	weiblich	120	13	mehr als 6	neg	neg	.
614	Beagle	weiblich	84	13	mehr als 6	neg	neg	.
615	Beagle	weiblich	60	13	mehr als 6	neg	neg	.
616	Beagle	weiblich	48	13	mehr als 6	neg	neg	.
617	Beagle	weiblich	36	13	mehr als 6	neg	neg	.
618	Beagle	weiblich	24	13	mehr als 6	neg	neg	.
619	Beagle	weiblich	12	13	mehr als 6	neg	neg	.
620	Beagle	weiblich	3	13	mehr als 6	neg	neg	.
621	Beagle	männlich	36	13	mehr als 6	neg	neg	.
622	Beagle	männlich	48	13	mehr als 6	neg	neg	.
623	Beagle	männlich	36	13	mehr als 6	neg	neg	.
632	Hovawart	weiblich	24	4	3-5	neg	neg	.
633	Cocker Spaniel	weiblich	15	4	3-5	neg	neg	.
634	Teckel	weiblich	84	1	.	neg	neg	Totgeburt, Welpensterben
635	Tibet Terrier	weiblich	60	4	.	neg	neg	.
636	Dogge	weiblich	27	.	.	neg	neg	.
637	DSH	weiblich	24	7	3-5	1:40	neg	.
638	DSH	weiblich	30	7	3-5	neg	neg	.
639	Teckel	weiblich	72	1	1-2	neg	neg	.



Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
644	Tibet Terrier	weiblich	24	1	1-2	neg	1:8	.
645	Hovawart	weiblich	9	4	3-5	neg	neg	.
646	Cavalier King Charles Spaniel	weiblich	30	.	.	neg	.	.
647	Boxer	weiblich	24	1	3-5	neg	1:8	.
648	Basset	weiblich	36	2	3-5	neg	.	.
649	Basset	weiblich	36	2	3-5	neg	neg	.
650	Golden Retriever	weiblich	81	1	0	neg	neg	Leerbleiben, Totgeburt, Welpensterben
651	Rottweiler	weiblich	60	.	.	neg	.	Totgeburt, Welpensterben
652	Rhodesian Ridgeback	weiblich	48	3	mehr als 6	neg	neg	.
653	Rhodesian Ridgeback	weiblich	16	3	3-5	neg	neg	.
654	Rhodesian Ridgeback	weiblich	84	3	1-2	neg	neg	.
655	Hovawart	männlich	48	2	1-2	neg	neg	.
656	Hovawart	weiblich	12	2	3-5	neg	neg	.
657	Labrador	weiblich	10	5	3-5	neg	neg	.
658	Labrador	weiblich	84	5	1-2	neg	neg	.
659	Labrador	weiblich	36	5	3-5	neg	neg	.
660	Labrador	weiblich	60	5	3-5	neg	neg	.
661	WHWT	weiblich	48	8	mehr als 6	neg	neg	vesikuläre Läsionen Vagina
662	Teckel	weiblich	24	.	.	neg	neg	.
663	Australian Shepherd	weiblich	72	2	1-2	neg	neg	.
664	Australian Shepherd	weiblich	24	2	1-2	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
665	Teckel	männlich	60	12	mehr als 6	neg	neg	.
666	Teckel	männlich	36	12	mehr als 6	neg	neg	.
667	Teckel	weiblich	48	12	mehr als 6	neg	neg	.
668	Teckel	männlich	84	11	3-5	neg	neg	.
669	Teckel	weiblich	60	11	3-5	neg	neg	Totgeburt
670	Teckel	weiblich	84	11	3-5	neg	neg	Totgeburt, lebensschwache Welpen
671	Teckel	weiblich	24	11	3-5	neg	neg	.
672	Teckel	männlich	18	11	3-5	neg	neg	.
673	Rhodesian Ridgeback	weiblich	78	11	mehr als 6	neg	neg	Leerbleiben
674	Hovawart	weiblich	45	1	1-2	neg	neg	.
675	Wolfsspitz	männlich	42	3	3-5	neg	neg	Leerbleiben; Totgeburt
676	Pudel	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
677	Pudel	männlich	.	.	.	neg	neg	.
680	Leonberger	männlich	60	5	.	neg	neg	.
681	Leonberger	weiblich	60	5	.	neg	neg	.
682	Rhodesian Ridgeback	männlich	36	2	mehr als 6	neg	1:16	.
683	Engl. Bulldogge	weiblich	36	12	mehr als 6	1:10	neg	Welpensterben
684	Briard	weiblich	6	1	.	neg	.	.
685	Briard	weiblich	24	12	mehr als 6	neg	neg	.
686	Briard	weiblich	18	12	mehr als 6	neg	neg	.
687	DSH	weiblich	60	2	.	neg	neg	.
688	DSH	weiblich	10	2	.	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
689	Dobermann	weiblich	.	4	.	neg	1:8	.
690	Dobermann	weiblich	.	4	.	neg	1:8	.
691	Dobermann	männlich	10	4	.	neg	neg	.
692	DSH	weiblich	74	2	.	neg	neg	.
693	DSH	weiblich	18	2	.	neg	neg	.
694	Golden Retriever	weiblich	74	3	mehr als 6	neg	neg	.
695	Teckel	weiblich	60	12	mehr als 6	neg	neg	.
696	Teckel	weiblich	48	12	mehr als 6	neg	neg	.
697	Teckel	männlich	36	12	mehr als 6	neg	neg	.
698	DSH	weiblich	48	20	1-2	1:10	neg	Totgeburt, Fruchtresorption, verlängerter Anöstrus
699	DSH	weiblich	36	20	mehr als 6	1:160	1:16	verlängerter Anöstrus
700	DSH	weiblich	36	20	mehr als 6	neg	neg	.
701	DSH	weiblich	60	20	3-5	1:10	neg	Leerbleiben, Spätabort
702	DSH	weiblich	48	20	3-5	1:80	neg	.
703	DSH	weiblich	36	20	1-2	1:20	neg	.
704	Pudel	männlich	.	.	.	neg	neg	.
705	Pudel	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
706	Pudel	weiblich	.	.	.	neg	neg	.
710	Cairn Terrier	weiblich	25	14	3-5	neg	neg	.
711	WHWT	weiblich	52	14	3-5	neg	1:4	.
712	Scottish Terrier	männlich	72	14	3-5	1:40	neg	.
713	Scottish Terrier	männlich	57	14	3-5	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in	Hunde im	Ausstellungs-	Ergebnis SNT	Ergebnis IFT	Vorbericht/ Symptome
			Monaten	Zwinger	besuche pro J	(CHV-1 Ak)	(MVC Ak)	
714	Scottish Terrier	weiblich	60	14	3-5	neg	neg	Totgeburt, Welpensterben
715	WHWT	männlich	54	14	3-5	neg	neg	.
716	WHWT	weiblich	84	14	3-5	neg	1:64	.
717	Cairn Terrier	männlich	48	14	3-5	1:20	neg	.
718	Cairn Terrier	weiblich	10	14	3-5	neg	neg	.
719	Cairn Terrier	weiblich	69	14	3-5	neg	neg	Totgeburt, Welpensterben
720	Scottish Terrier	weiblich	79	14	3-5	1:80	neg	Totgeburt
721	Scottish Terrier	weiblich	48	14	3-5	neg	neg	Totgeburt, Welpensterben
722	Scottish Terrier	weiblich	51	14	3-5	neg	1:16	Totgeburt
723	Cairn Terrier	weiblich	60	14	3-5	neg	neg	Spätabort, Totgeburt
724	Boxer	weiblich	120	3	.	neg	neg	.
725	Boxer	weiblich	60	3	.	neg	1:32	.
726	Boxer	männlich	18	3	.	neg	1:32	.
727	Deutsch Langhaar	weiblich	36	6	3-5	neg	neg	Welpensterben
728	Schwarzer russischer Terrier	weiblich	60	17	mehr als 6	neg	1:32	.
729	DSH	weiblich	48	.	mehr als 6	neg	neg	.
730	DSH	weiblich	60	13	mehr als 6	neg	neg	.
731	Hovawart	weiblich	24	.	.	neg	neg	.
732	DSH	weiblich	60	6	1-2	neg	neg	Totgeburt
733	Leonberger	weiblich	48	10	3-5	neg	neg	Totgeburt, lebensschwache Welpen
734	Leonberger	weiblich	24	10	mehr als 6	neg	neg	.

Nummer	Rasse	Geschlecht	Alter in Monaten	Hunde im Zwinger	Ausstellungs- besuche pro J	Ergebnis SNT (CHV-1 Ak)	Ergebnis IFT (MVC Ak)	Vorbericht/ Symptome
735	Leonberger	weiblich	84	10	3-5	neg	neg	Totgeburt, lebensschwache Welpen
736	Leonberger	weiblich	12	10	3-5	neg	neg	.
737	DSH	weiblich	24	2	mehr als 6	neg	neg	.
738	Rottweiler	weiblich	84	15	1-2	neg	neg	Spätabort, Totgeburt
745	Tibet Terrier	weiblich	36	2	3-5	neg	neg	.
747	Boxer	weiblich	60	5	0	neg	1:8	Leerbleiben, Welpensterben
749	Bouvier	weiblich	158	4	mehr als 6	neg	neg	.
750	Bouvier	weiblich	84	4	mehr als 6	neg	neg	.
751	Bouvier	weiblich	48	4	mehr als 6	neg	neg	.
752	Bouvier	weiblich	8	4	mehr als 6	neg	neg	.
756	Jack Russel Terrier	weiblich	120	.	.	neg	1:4	Fruchtresorption, Ataxie, Schwäche
759	WHWT	weiblich	74	10	mehr als 6	neg	1:16	.
763	WHWT	weiblich	54	10	mehr als 6	neg	1:128	.
767	WHWT	weiblich	42	10	mehr als 6	neg	1:32	.

**Tabelle 26: Seren mit MVC-spezifischen Antikörpern**

Nr.	Tgb.Nr	Rasse	Alter	Ak	Ak	PLZ	w/m	Hunde im Zwinger	Klinische Symptome
				MVC	CHV				
1.	276	Ital. Windspiel	4 J	1:10	neg	134..	w	6	
2.	637	DSH	2 J	1:40	neg	158..	w	7	
3.	683	Engl. Bulldogge	3 J	1:10	neg	268..	w	12	kleine Würfe, Welpensterben Totgeburten
4.	720	Scottish Terrier	6,5 J	1:80	-	325..	w	14	
5.	399	Scottish Terrier	6 J	1:40	-	325..	m	14	
6.	712	Cairn Terrier	4 J	1:20	-	325..	m	14	
7.	699	DSH	3 J	1:160	1:16	336..	w	20	verlängerter Anöstrus
8.	702	DSH	4 J	1:80	meg	336..	w	20	
9.	703	DSH	3 J	1:20	neg	336..	w	20	
10.	698	DSH	4 J	1:10	neg	336..	w	20	Fruchtresorptionen, verlängerter Anöstrus Spätabort, Leerbleiben
11.	701	DSH	5 J	1:10	neg	336..	w	20	Totgeburt,
12.	560	Berger Picard	8 J	1:40	neg	361..	w	7	
13.	489	Basset	3 J	1:10	neg	391..	w	3	
14.	583	Teckel	1 J	1:80	neg	515..	w	31	
15.	604	Whippet	4 J	1:40	neg	516..	w	20	
16.	591	Whippet	2 J	1:20	neg	516..	m	20	
17.	606	Whippet	5 J	1:20	neg	516..	w	20	
18.	234	Irish Wolfhound	4 J	1:80	1:64	596..	w	-	
19.	236	Irish Wolfhound	5 J	1:40	1:32	596..	w	-	
20.	UT403	Pyrenäenberghund	-	1:80	1:16	647..	w	-	
21.	UT462	DSH	-	1:20	1:16	716..	w	-	
22.	UT375	Hovawart	-	1:10	neg	720..	w	-	

Nr.	Tgb.Nr	Rasse	Alter	Ak MVC	Ak CHV	PLZ	w/m	Hunde im Zwinger	Klinische Symptome
23.	UT366	Border Collie	-	1:40	neg	735..	w	-	
24.	545	Briard	6 J	1:160	neg	914..	w	13	lebensschwache Welpensterblichkeit

**Tabelle 27: Ergebnisse des ELISAs mit dem rekombinanten CnMV-VP2 und den Hyperimmunseren**

Konjugat: Schwein anti Kaninchen IgG HPO (1:4000)

Hyperimmun- seren	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10 000
cp 0,1	0,8633	0,2268	0,1357	0,0723	0,0742
cp 0,2	1,3497	0,3889	0,2332	0,103	0,0762
cp 0,5	1,9482	0,7346	0,4539	0,1417	0,1228
pp 0,1	1,8683	0,7159	0,4121	0,1361	0,2381
pp 0,2	2,2823	1,1228	0,6954	0,2515	0,2088
pp 0,5	2,5143	1,6017	1,105	0,317	0,1063

Konjugat: Schaf anti Kaninchen IgG HPO (1:5000)

Hyperimmun- seren	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10 000
cp 0,1	0,6641	0,1923	0,1199	0,1105	0,0606
cp 0,2	1,1899	0,3174	0,1774	0,0866	0,0658
cp 0,5	1,7617	0,5369	0,3244	0,1287	0,0814
pp 0,1	1,7617	0,5626	0,3106	0,1313	0,0769
pp 0,2	1,7617	0,8862	0,6058	0,2366	0,1976
pp 0,5	1,7617	1,215	0,8097	0,2246	0,203

*Es sind die OD<sub>450</sub> angegeben.*

*cp: cytoplasmatischer Extrakt in µg/Well*

*pp: periplasmatischer Extrakt in µg/Well*



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht Differentialdiagnosen Welpensterblichkeit .....	4
Tabelle 2:	Taxonomie der Parvoviridae* .....	7
Tabelle 3:	Molekulargewichte der viralen Proteine von CnMV .....	9
Tabelle 4:	Seroprävalenz von CnMV .....	12
Tabelle 5:	Subfamilien der Herpesviridae und ihre biologischen Eigenschaften	17
Tabelle 6:	Charakteristische Vertreter der Herpesviren .....	18
Tabelle 7:	Übersicht Seroprävalenz des caninen Herpesvirus (CHV-1) .....	25
Tabelle 8:	Oligonukleotide .....	35
Tabelle 9:	Übersicht der Reaktionsbedingungen der PCR zum Nachweis von CnMV und CHV-1 .....	42
Tabelle 10:	PCR-Programm zur Amplifizierung des VP2-Gens von CnMV mit VP2MBamHI und VP2MEcoRI.....	43
Tabelle 11:	Pipettierschema für den Restriktionsverdau des Vektors pET22b(+)-M-VP2 mit EcoRI und BamHI (Inkubation: 37 °C, 30-45 min).....	44
Tabelle 12:	PCR für die Subklonierung von VP2 .....	44
Tabelle 13:	Pipettierschema des Ligationsansatzes.....	45
Tabelle 14:	Immunisierungsschema zur Herstellung polyklonaler Antikörper.....	50
Tabelle 15:	Titerbestimmung Hyperimmunseren.....	58
Tabelle 16:	Proteinkonzentration der Eluate .....	68
Tabelle 17:	Seroprävalenz von CHV-1 unter Zuchthunden in Deutschland .....	70
Tabelle 18:	Übersicht aller 22 Hunde mit Serumpaarprouben .....	73
Tabelle 19:	Seroprävalenz von CnMV unter Zuchthunden in Deutschland.....	75
Tabelle 20:	Fruchtbarkeitsstörungen und serologischer Status .....	80

Anhang

- Tabelle 21: Übersicht der Spermaproben mit der Angabe der Serologie
- Tabelle 22: Übersicht Kotproben
- Tabelle 23: Übersicht Tupferproben
- Tabelle 24: Übersicht der zur Untersuchung eingesandten Welpen
- Tabelle 25: Übersicht Seren
- Tabelle 26: Seren mit CnMV-spezifischen Antikörpern
- Tabelle 27: Ergebnisse des ELISAs mit dem rekombinanten CnMVVP2 und den Hyperimmunsere

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Genomstruktur von CnMV und Lokalisation der Open Reading Frames .....	8
Abbildung 2:	Rolling Hairpin -Modell der Replikation Autonomer Parvoviren. Modifiziert nach COTMORE und TATTERSALL (1987) .....	10
Abbildung 3:	Struktur der Herpesvirionen .....	19
Abbildung 4:	schematischer Genomaufbau CHV-1 .....	20
Abbildung 5:	Verlaufsformen einer Infektion mit dem caninen Herpesvirus (RONSSE et al. 2003) .....	27
Abbildung 6 :	Bild nach Ultrazentrifugation über CsCl-Gradienten.....	56
Abbildung 7:	SDS-PAGE des Immunisierungsantigen.....	57
Abbildung 8:	SDS-PAGE und Western Blot mit den Hyperimmunseren.....	58
Abbildung 9:	Analytische Sensitivität der diagnostischen PCR.....	59
Abbildung 10:	Spezifität der diagnostischen PCR .....	60
Abbildung 11:	Ergebnisse der PCR auf CHV-1 bei 34 Spermaproben.....	61
Abbildung 12:	Klonierung und Analyse der transformierten Plasmide .....	64
Abbildung 13:	Wachstumskurve nach Induktion mit IPTG .....	65
Abbildung 14:	Induktion der Expression mit IPTG .....	66
Abbildung 15:	Cytoplasmatischen Aufreinigung von CnMV-VP2.....	67
Abbildung 16:	Periplasmatischen Aufreinigung von CnMV-VP2.....	68
Abbildung 17:	Häufigkeit und Verteilung der Antikörpertiter gegen CHV-1 .....	70
Abbildung 18:	SNT mit und ohne Zusatz von Komplement.....	71
Abbildung 19:	CHV-1-Titer nach Impfung.....	72
Abbildung 20:	IFT zum Nachweis von CnMV--spezifischen Antikörpern .....	74
Abbildung 21:	Häufigkeit und Verteilung der Antikörper gegen CnMV.....	75

Abbildung 22:	Geschlechterverhältnis und Seroprävalenz CHV-1 .....	77
Abbildung 23:	Rassenverhältnis und Seroprävalenz von CHV-1 .....	77
Abbildung 24:	Alter der Hunde und Seroprävalenz CHV-1 .....	78
Abbildung 25:	Zwingergröße und Seroprävalenz von CHV-1 .....	79
Abbildung 26:	Ausstellungsbesuche und Seroprävalenz von CHV-1 .....	79

Anhang

Abbildung 27:	Probenbegleitschein	
Abbildung 28	Geographische Verteilung der untersuchten Serumproben	
Abbildung 29:	Darstellung des cpE von CHV-1 auf MDCK-Zellen	
Abbildung 30:	Beispiel cpE von WRCC-Zellen infiziert mit CnMV	
Abbildung 31:	Plasmidkarte des Expressionsvektors pET22b(+)JMVP2 und das CnMV-VP2 Insert im Detail	

---

## Danksagung

Herrn Prof. Uwe Truyen danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, sowie die stets freundliche, engagierte und konstruktive Unterstützung sowie Beratung bei allen kleineren und größeren Problemen während und nach der Doktorarbeit. Durch Ihre Natürlichkeit und Menschlichkeit haben Sie eine beispiellose Arbeitsatmosphäre am Institut geschaffen, die ich stets in guter Erinnerung behalten werde.

Besonders möchte ich der Gesellschaft zur Förderung kynologische Forschung e.V. in Bonn für die großzügige finanzielle Unterstützung danken, die die Durchführung dieser Studie erst ermöglicht hat. Dr. Marcus Riehl und Dr. Martin Giersberg von der Firma Novoplant danke ich ganz herzlich für die hervorragende Unterstützung und Beratung bei der Genexpression sowie für die Möglichkeit in ihrem Labor arbeiten zu dürfen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen in Leipzig für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bedanken. Insbesondere möchte ich herzlich der Sekretärin Frau Schneider danken: Sie haben uns mit viel Herz und Verstand durch die Irrungen und Wirrungen der Verwaltungsbürokratie geholfen. Aber vor allem haben wir von Ihnen fürs Leben gelernt - Vielen Dank. Mein besonderer Dank gilt Frau Nadja Leinecker und Frau Evelin Brumme, den guten Seelen des Labors, für die herzliche und engagierte Hilfsbereitschaft bei der Arbeit im Labor und der guten Gesprächen in den Frühstückspausen. Dr. Uwe Rösler („immer diese fiesen Viren“) einen herzlichen Dank für die konstruktive Unterstützung bei diversen Problemen in der Doktorarbeit und Rat und Tat bei der Karriereplanung. Dr. Sonja Wilhelm danke ich für die Betreuung bei der Arbeit, v.a. im Gebiet der Molekularbiologie.

Vielen Dank an Eugenié Zeeuw, Steffie Brumme, Caroline Köhler, Asja Möller, Jan Rockhoff und Nikola Rückert, meinen Mitdoktoranden am Institut: der Zusammenhalt und der Austausch über fachliche und nichtfachliche Probleme war hervorragend und der Spaß kam auch nicht zu kurz.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Lebensgefährten Alexander Süß und meiner Katze Jule für die liebevolle Unterstützung und die Geduld mit mir bedanken.