Aus dem Department für Kleintiere und Pferde

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Kleintiere

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Iwan Burgener Dipl. ECVIM-CA Dipl. ACVIM)

Vorkommen und Bedeutung des Caninen Bocavirus bei Hunden in einem Militärhundebestand

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Rosmarie Reisner

Wien, im Februar 2023

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. vet. Frank Künzel Dipl. ECZM (Small mammal)

Abteilung für Interne Medizin

Kleintierklinik

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

Betreuende Assistentinnen: Dr. med. vet. Angelika Auer

Institut für Virologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Mag. rer. nat. Katharina Dimmel

Institut für Virologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter: Univ. Prof. Dr. med. vet. Till Rümenapf

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG 7

2 LITERATURÜBERSICHT 8

2.1 PARVOVIREN ALLGEMEIN 8

2.2 CANINES PARVOVIRUS 8

2.3 CANINES BOCAVIRUS 9

2.4 TAXONOMIE 10

2.4.1 Canines Bocavirus 10

2.4.2 Humanes Bocavirus 11

2.5 EPIDEMIOLOGIE 11

2.5.1 Canines Bocavirus 11

2.5.2 Humanes Bocavirus 12

2.6 PATHOGENESE UND KLINIK 12

2.6.1 Respirationstrakt 12

2.6.2 Gastrointestinaltrakt 13

2.6.3 Dermatologie 14

2.6.4 Neurologie 15

3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN 17

3.1 TIERE UND MATERIAL 17

3.1.1 Prospektive Datenerhebung 17

3.1.2 Epidemiologische Untersuchung des Bestandes: Probengewinnung 22

3.1.3 Erste Probenentnahme 22

3.1.4 Zweite Probenentnahme 22

3.1.5 Kontrollgruppe 23

3.1.6 Retrospektive Datenerhebung 23

3.2 METHODIK 25

3.2.1 Probenvorbereitung 25
3.2.2 DNA-Extraktion 25
3.2.3 PCR 25
4 ERGEBNISSE 28
4.1 ERGEBNISSE DER SCREENING PCR 28
4.1.1 Ergebnisse des 1. Probendurchganges (Juni 2021) 28
4.1.2 Ergebnisse des 2. Probendurchganges (August 2021) 30
4.1.3 Ergebnisse der Kontrollgruppe 30
4.2 AUSWERTUNG DER RETROSPEKTIVEN FÄLLE 31
4.2.1 Symptome 33
4.2.2 Blutparameter 40
4.2.3 direkter Erregernachweis 43
4.2.4 Pathologie 46
4.2.5 Ko-Infektionen 47
5 DISKUSSION 48
6 ZUSAMMENFASSUNG 56
7 SUMMARY 57
8 LITERATURVERZEICHNIS 58
9 TABELLENVERZEICHNIS 62
10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 63

Abkürzungen

°C ..... Grad Celsius
µM ..... Mikromolar
Alb ..... Albumin
ALT ..... Alanin-Aminotransferase
AP ..... Alkalische Phosphatase
BPV ..... Bovines Parvovirus
CAV ..... Canines Adenovirus
CBoV ..... Canines Bocavirus
CBoV-2 ..... Canines Bocavirus 2
CBoV-3 ..... Canines Bocavirus 3
CECoV ..... Canines Enterales Coronavirus
CHV-1 ..... Canines Herpesvirus 1
CnMV ..... Canines Minute Virus
CPV-1 ..... Canines Parvovirus 1
CPV-2 ..... Canine Parvovirus 2
Crea ..... Kreatinin
CRP ..... C-reaktive Protein
DNA ..... Desoxyribonukleinsäure
ETK ..... Ethik
FPV ..... Felinen Panleukopenie Virus
g ..... Erdbeschleunigung
g/dl ..... Gramm pro Deziliter
ggr. ..... geringgradig
Glu ..... Glukose
HBoV ..... Humanes Bocavirus
hgr. ..... hochgradig
ICTV ..... International Committee on Taxonomy of Viruses
IKT ..... Innerekörpertemperatur
kb ..... Kilobasen
MDT ..... Magendarmtrakt
mg/dl ..... Gramm pro Deziliter

mgr. ..... mittelgradig
ml ..... Milliliter
PBoV ..... Porcines Bocavirus
PCR ..... Polymerasenkettenreaktion
qPCR ..... quantitative Polymerasenkettenreaktion
sp ..... Spezies
spp ..... Spezies (Plural)
TIS ..... Tierspital-Informationssystem
TP ..... Totalprotein
U/L ..... Unit pro Liter
ZNS ..... Zentrales Nervensystem
µl ..... Mikroliter

1 Einleitung und Fragestellung

In der Hundezucht eines Militärhundezentrums in Österreich wurden seit 2015 einige Fälle von Welpen mit (blutiger) Diarrhö und Vomitus beobachtet. Aus dem Kot symptomatischer Tiere ist wiederholt mittels Polymerasenkettenreaktion (PCR) Nukleinsäure des Caninen Bocavirus 2 (CBoV-2) nachgewiesen worden, während der Nachweis von anderen relevanten Viren (z.B. Canines Parvovirus, Canines Staupevirus) im Rahmen der Routinediagnostik negativ ausfiel.

Bei Bocaviren handelt es sich um unbehüllte einzelsträngige DNA-Viren aus der Familie der Parvoviridae. Bocaviren sind in der veterinärmedizinischen Literatur bis zum jetzigen Zeitpunkt spärlich erwähnt. Sie werden als fakultativ pathogene Viren eingestuft.

Da es sich in dem erwähnten Zuchtbestand um ein rezidivierendes Krankheitsgeschehen bei Junghunden handelte, wurde der Hygienebeauftragte der Kleintierklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien kontaktiert, um die epidemiologische Situation von CBoV-2 in diesem Hundebestand zu evaluieren. Daraus resultierte die vorliegende Studie, bei der neben einer Aufarbeitung der retrospektiven Fälle auch eine prospektive Untersuchung der Hunde auf CBoV-2 mittels Screening PCR innerhalb des Bestandes vorgenommen wurde.

Die prospektiven molekularbiologischen Untersuchungen dienten der Erfassung CBoV-2 positiver Hunde des Bestandes und damit der Identifizierung von Hunden, die möglicherweise eine Rolle der Verbreitung des Virus spielen.

2 Literaturübersicht

2.1 Parvoviren Allgemein

Parvoviren sind kleine unbehüllte Viren mit einem linearen einzelsträngigen DNA Genom von ca. 5 kb (Bodewes et al., 2014).

Die Familie der Parvoviridae beinhaltet drei Subfamilien: Densovirinae, Hamaparvovirinae und Parvovirinae. Bis dato sind vom Internationalen Komitee zur Taxonomie von Viren (ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses) zehn verschiedene Gattungen der Subfamilie der Parvovirinae anerkannt: Amdoparvovirus, Artiparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Erythroparvovirus, Loriparvovirus, Protoparvovirus und Tetraparvovirus (ICTV, 2022).

Das erste klassifizierte und beschriebene Parvovirus bei Hunden ist das Canine Minute Virus (CnMV). Es wurde erstmals von Binn et al. (1968) identifiziert. Früher wurde es auch als Canines Parvovirus 1 (CPV-1) bezeichnet (Binn et al., 1970).

2.2 Canines Parvovirus

Das Canine Parvovirus Typ 2 (CPV-2, Spezies Carnivore Protoparvovirus 1) ist der Gattung Protoparvovirus zuzuordnen. CPV-2 wurde erstmals im Jahre 1977 als Ursache von schwerwiegenden Gastroenteritis-Ausbrüchen in einer Gruppe von Hunden identifiziert (Carrino et al., 2022).

Zur Entstehung von CPV-2 existieren zwei Hypothesen: Frühere Studien gingen davon aus, dass sich CPV-2 aus dem Felinen Panleukopenie Virus (FPV) entwickelt hat. In einer neueren Studie wird vermutet, dass CPV-2 und FPV aus einem gemeinsamen unbekannten Vorfahren abstammen und sich unabhängig voneinander entwickelten (Allison et al., 2013). CnMV wurde zwar ursprünglich CPV-1 bezeichnet, weist aber keine nähere genetische Verwandtschaft mit CPV-2 auf (Tuteja et al., 2022).

Obwohl CPV-2 ein DNA-Virus ist, zeigt es wie RNA-Viren eine hohe Evolutionsrate wodurch eine große Varianz an Phänotypen vorliegt, die sich genotypisch lediglich im Austausch eines Nukleotids der DNA voneinander unterscheiden (Shackelton et al., 2005; Silverstein and Hopper, 2015). Folgende Subtypen sind bisher beschrieben: CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c. Diese Subtypen können nachweislich neben Hunden auch andere Karnivorenspezies infizieren (Canuti et al., 2022b).

Von einer Parvovirus-Enteritis sind primär junge Hundewelpen in einem Alter unter sechs Monaten betroffen. Eine Rasseprädisposition scheint bei dem Dobermann, dem Rottweiler,

dem American Pit Bull Terrier und dem Deutscher Schäferhund vorzuliegen (Silverstein and Hopper, 2015). CPV-2 ist hochkontagiös, die häufigsten Übertragungswege sind oro-fäkal und die Aufnahme über kontaminierte Oberflächen (Tuteja et al., 2022)

CPV-2 weist einen Tropismus zu mitotisch aktiven Zellen auf, betroffen sind daher vor allem Zellen des Knochenmarks und die Krypten des Darmtrakts. Durch Zerstörung dieser Zellen zeigen Tiere mit manifester Infektion in der Regel eine schwerwiegende hämorrhagische Diarrhö, Erbrechen, Fieber, Lethargie sowie eine Leukopenie. Eine schwerwiegende Parvovirus-Infektion kann in ein Systemisches inflammatorisches Response-Syndrome (SIRS), eine Sepsis, einen Schock und/oder ein multiples Organversagen resultieren. Unbehandelt zeigt eine Infektion eine Letalität von bis zu 91 % (Sato-Takada et al., 2022; Silverstein and Hopper, 2015; Venn et al., 2017).

Eine CPV-2 Infektion kann, neben gastrointestinalen Symptomen, sporadisch auch neurologische und in sehr seltenen Fällen kutane Symptome aufweisen. Findet eine transplazentare Infektion der Welpen ungeimpfter Muttertiere statt oder infizieren sich Welpen in einem Alter von unter sechs Wochen, kann eine CPV-2 assoziierte Myokarditis auftreten (Greene, 2012; Tuteja et al., 2022).

Zur Diagnostik stehen immunologische (z.B. ELISA, Hämagglutinationshemmtest) und molekularbiologische (z.B. konventionelle PCR und Real-time PCR) Methoden zur Verfügung. Im Rahmen der Routinediagnostik werden hauptsächlich kommerzielle erhältliche in-house Test-Kits verwendet. Zusätzlich stellt die hämatologische Blutuntersuchung (Leukopenie/Neutropenie) ein wichtiges Diagnostik-Tool zum Nachweis einer Parvovirose in der Tierarztpraxis dar. Zur Prophylaxe werden Impfungen gegen CPV-2 (v.a. Lebendimpfstoffe) routinemäßig seit Jahrzenten erfolgreich eingesetzt (Tuteja et al., 2022).

CPV-2 gilt als ein äußerst resistentes Virus, das unter geeigneten Bedingungen über Monate bis Jahre in der Umwelt infektiös bleiben kann (Greene, 2012). Zur Umgebungsdesinfektion und Inaktivierung von Caninen Parvoviren stehen kommerziell erhältliche Desinfektionsmittel, wie z.B. Virkon™ S (LANXESS Deutschland GmbH, Köln, Deutschland), zur Verfügung (DVG, 2022).

2.3 Canines Bocavirus

Es muss betont werden, dass die Taxonomie der Gattung des Bocaparvovirus und seiner Spezies bis dato stetig erweitert bzw. aktualisiert wird. Die taxonomische Zuordnung der Spezies kann daher, je nach Jahr der Veröffentlichung der herangezogenen Literatur, variieren.

In der folgende Literaturübersicht wird ergänzend zur veterinärmedizinischen Literatur auch auf das Humane Bocavirus (HBoV) eingegangen.

2.4 Taxonomie

2.4.1 Canines Bocavirus

Die Gattung Bocaparvovirus wurde nach den zwei ursprünglich der Gattung zugeordneten Spezies, das Bovine Parvovirus (BPV) und das Canine Minute Virus (CnMV), benannt (Bodewes et al., 2014).

Bocaviren konnten bisher bei vielen verschiedenen Säugetieren (u.a. Primaten, Schweinen, Rindern, Fledermäusen, Hunden, Katzen und Ratten) nachgewiesen werden. Sie wurden bis dato in erster Linie mit gastrointestinalen oder respiratorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Cotmore et al., 2014; Manteufel und Truyen, 2008).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden innerhalb der Gattung Bocaparvovirus 28 Spezies beschrieben. Drei davon konnten bei Hunden nachgewiesen werden. Das CnMV (Spezies Carnivore Bocaparvovirus 1), wurde in den späten 1960ern entdeckt; seine Pathogenität ist bis heute nicht gänzlich geklärt. Das CnMV wird mit schwerwiegenden neonatalen respiratorischen Erkrankungen und Enteritis bei Welpen assoziiert. Infektionen bei adulten Hunden verlaufen zumeist subklinisch. Zudem wurde das Virus auch mit Fertilitätsstörungen, Aborten und Totgeburten in Zusammenhang gebracht (ICTV, 2022) (Canuti et al., 2022a; Piewbang et al., 2021). Obwohl derselben Subfamilie angehörig, scheint CnMV phylogenetisch relativ weit entfernt verwandt zu den anderen klassifizierten Caninen Bocaviren zu sein (Kapoor et al., 2012).

Darüber hinaus konnten zwei weitere Viren der Gattung Bocaparvovirus, das Canine Bocavirus 2 (CBoV-2) und das Canine Bocavirus 3 (CBoV-3), bei Hunden nachgewiesen werden (Kapoor et al., 2012; Li et al., 2013).

CBoV-2 wurde erstmals 2012 bei Hunden nachgewiesen und als mögliches Pathogen in Betracht gezogen. In diesen Studien wurde CBoV-2 bei Hunden mit respiratorischen und gastrointestinalen Erkrankungen nachgewiesen; eine Rolle als alleiniger Auslöser der gezeigten Symptomatik wurde bis dato aber nicht gänzlich geklärt (Kapoor et al., 2012; Piewbang et al., 2021). Obwohl CBoV-2 ein DNA-Virus ist, konnte eine hohe Rekombination des Genoms nachgewiesen werden, wodurch eine breite Diversität in diesem vorliegen kann. Unklar ist jedoch, ob diese Diversität einen unmittelbaren Einfluss auf die der Pathogenität oder die klinische Ausprägung der Symptome hat (Piewbang et al., 2021).

CBoV-3 wurde im Jahre 2013 in der Leber eines Hundes, mit gleichzeitiger Co-Infektion eines neuartigen Caninen Circovirus, im Rahmen einer metagenomischen Studie, erstmalig nachgewiesen. Die Sequenzierung zeigte, dass CBoV-3 phylogenetisch divergent zu CnMV und CBoV-2 ist (Li et al., 2013). Es existieren zu CBoV-3 keine weiteren beschriebenen Fälle in der Literatur.

2.4.2 Humanes Bocavirus

Das Humane Bocavirus 1 (HBoV-1, Spezies Primate Bocaparvovirus 1), wurde erstmals in Schweden von Allander et al. (2005) aus nasopharyngealen Abstrichen von Kindern mit Atemwegserkrankungen isoliert. Das Humane Bocavirus wird in vier Genotypen unterteilt: HBoV 1 – 4 (Schildgen et al., 2012). Diese und das Parvovirus B19 gelten als einzige humanpathogene Parvoviren (Zhao et al., 2012).

2.5 Epidemiologie

2.5.1 Canines Bocavirus

CBoV-2 wurde bisher in Deutschland, Südkorea, Volksrepublik China und Hong Kong bei Hunden mittels molekularbiologischen Verfahren nachgewiesen (Zhai et al., 2017). In einer aktuellen Studie konnte CBoV-2 erstmals auch bei wildlebenden Karnivoren (Grauwölfen) aus Nordkanada identifiziert werden (Prävalenz 5 %) (Canuti et al., 2022a). In einer nachfolgenden Prävalenzstudie von Canuti et al. (2022) über das Vorkommen verschiedener bei Hunden relevanten Parvoviren (CPV-2, CBoV-2 und CnMV), in drei verschiedenen Hundespezies (Kojoten, Füchse und domestizierten Hunden), konnte in 10 % der Kotproben der Hunde CBoV-2 nachgewiesen werden. Die Beprobung von Kojoten und Füchsen (Faeces, Milz, Lymphknoten) verlief jeweils negativ (Canuti et al., 2022b).

In einer aus China erschienenen Studie wurde aus der Kotprobe einer asymptomatischen Katze erstmals CBoV-2-Nukleinsäure nachgewiesen (Niu et al., 2019). Das Porcine Bocavirus stellt ein weiteres Beispiel für das Überschreiten der Tierartenbarriere dar, denn dieses wurde bei Nagetieren als auch Spitzmäusen im Süden Chinas nachgewiesen. Daher wird die Möglichkeit einer Interspezies-Übertragung bei Bocaviren allgemein als sehr wahrscheinlich angenommen (Xiong et al., 2019).

Allgemein scheint der Schweregrad der vorliegenden Symptome einer Bocaparvovirus-Infektion bei jungen Tieren ausgeprägter als bei adulten (Manteufel und Truyen, 2008).

CBoV-3 ist bisher ausschließlich in der Leber eines Hundes aus den USA nachgewiesen worden (Li et al., 2013).

2.5.2 Humanes Bocavirus

Das Humane Bocavirus wird meist bei Kindern, seltener bei Erwachsenen nachgewiesen. Obwohl bisher vier Genotypen des HBoV klassifiziert wurden, wird primär HBoV-1 klinische Relevanz zugeschrieben. HBoV-1 kann milde bis schwerwiegende Infektionen der oberen und unteren Atemwege bei Kindern (hauptsächlich im Alter zwischen sechs Monaten und fünf Jahren) auslösen. HBoV-1 wird höchstwahrscheinlich über die Atemwege übertragen, da bei akuten Infektion dort eine hohe Viruslast nachgewiesen werden konnte (Polo et al., 2021; Qiu et al., 2017).

HBoV-2-4 wurden bisher primär in Stuhlproben nachgewiesen, wobei hierbei HBoV-2 am häufigsten detektiert werden konnte (Qiu et al., 2017). Der Nachweis im Stuhl lässt bei diesen Genotypen den oro-fäkalen Übertragungsweg vermuten. HBoV-2 kann sowohl bei symptomlosen als auch bei respiratorisch bzw. gastrointestinal erkrankten Patienten nachgewiesen werden. Es ist daher umstritten, ob HBoV-2 als ein intestinales Pathogen angesehen werden kann (Kapoor et al., 2009; Polo et al., 2021).

Aus den folgenden Probenmaterialien konnte HBoV bereits nachgewiesen werden: Urin, Speichel, Blut, Tonsillen und Liquor sowie aus Proben der Umwelt (Fluss, Abwasser) und aus Schalentieren (Polo et al., 2021).

2.6 Pathogenese und Klinik

Die Pathogenität, der Infektionsweg und der Zelltropismus des Caninen Bocavirus sind bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Etablierungsversuche einer Zellkultur zur Isolierung und Vermehrung des Virus sind bisher gescheitert. Darüber hinaus existieren bis dato keine geeigneten *in vivo* Modelle (Schildgen und Schildgen, 2018). Die Koch’schen Postulate konnten aufgrund dieser fehlendenDaten noch nicht erfüllt werden und daher kann ein Virusnachweis in betroffenen Organen erkrankter Individuen keinen kausalen Zusammenhang mit der vorliegenden Symptomatik beweisen.

Des Weiteren wird diskutiert, ob Bocaviren primäre Auslöser einer Infektion oder synergistischer Natur sind, da sie auch häufig im Rahmen einer Ko-Infektion nachgewiesen werden (Schildgen et al., 2012).

2.6.1 Respirationstrakt

Ursprünglich wurde das Canine Bocavirus – noch ohne genauere Bezeichnung - im Rahmen einer metagenomischen Studie von Kapoor et al. (2012), die das Ziel verfolgte, einen besseren Überblick über die virale Flora des Respirationstrakts domestizierter Tiere zu erlangen, in

respiratorischen Gewebeproben von verstorbenen Hunden nachgewiesen. Die infizierten Hunde stammten aus einem Tierheim, wodurch die erhöhte Prävalenz interpretiert wurde. Andere pathogene respiratorische Viren wurden nicht getestet und konnten daher laut der Autoren nicht als kausales Agens ausgeschlossen werden. Es wurde nicht beschrieben, woran die Tiere letztendlich verstorben sind (Kapoor et al., 2012). Demzufolge wird CBoV-2 als mögliches kausales Pathogen von respiratorischen Erkrankungen beim Hund diskutiert.

In einer Publikation über Hunde mit einer hochgradigen Atemnot und Hämoptyse wird ein möglicher Zusammenhang zwischen Nachweis von CBoV-2 und vorliegenden intestinalen Läsionen angenommen. Obwohl bei den Hunden initial von einem respiratorischen Versagen ausgegangen wurde, konnte histopathologisch keine signifikanten Veränderungen der Lunge und Trachea aufgefunden werden. CBoV-2 wurde in der Lunge, in den trachealen Lymphknoten, in der Leber und im Darm per PCR nachgewiesen (Piewbang et al., 2018).

Eine in vitro Studie konnte zeigen, dass HBoV-1 in humanen Atemwegsepithelzellen repliziert und dadurch bedingt eine persistierende Infektion mit Verlust der Zellintegrität, von Zilien, einer Ruptur der Zellverbindungen, einer Hypertrophie der Epithelzellen sowie Zelltod hervorrufen kann. Daher wird angenommen, dass HBoV-1 mit klinisch manifesten Läsionen im Respirationstrakt einhergehen könnte (Deng et al., 2016).

2.6.2 Gastrointestinaltrakt

CBoV-2 wurde erstmals in einer Hundezucht aus Deutschland isoliert und als Parvovirose-ähnliche Enteritis beschrieben. Betroffen waren 11-Tage alte Deutsch Drahthaar-Welpen, die Erbrechen und Durchfall zeigten. Trotz intensivmedizinischer Behandlung verstarben insgesamt drei Welpen des Wurfes. Weitere typische virale Durchfall-Erreger (CPV-2, Canines Coronavirus, Canines Staupevirus, Canines Herpesvirus 1, Canines Adenovirus) konnten mittels PCR bzw. per Immunhistochemie ausgeschlossen werden. Pathohistologisch zeigte sich u.a. in den Abschnitten des Dünndarms eine hochgradige Villusverkürzung, -fusion und -atrophie sowie eine deutliche Krypten Regeneration. Neben einer Screening-PCR wurde auch eine In-Situ-Hybridisierung der Organe der obduzierten Welpen vorgenommen: CBoV-2 konnte v.a. im lymphatischen Gewebe der Submukosa des Dünndarms als auch in den Enterozyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde CBoV-2 auch in der Milz, im Thymus und den mesenterialen Lymphknoten identifiziert, was durch eine mögliche hämatogene Streuung erklärt wurde. Aufgrund der Lokalisation von CBoV-2 im Gewebe wird vermutet, dass das Virus durch Zerstörung des intestinalen Immunsystems als Wegbereiter für opportunistisch pathogene Darmbakterien diente und die schweren Läsionen im GIT dadurch zustande kamen (Bodewes et al., 2014).

Das Auffinden von CBoV-3 in der Leber eines schwer erkrankten Hundes wurde erstmals im Jahre 2013 beschrieben. Der betroffene Hund zeigte Vomitus und blutige Diarrhö. Der Sektionsbefund zeigte zudem eine nekrotisierende Vaskulitis, eine granulomatöse Lymphadenitis sowie eine akute Niereninsuffizienz. Durch den Nachweis von CBoV-3 aus der Leber wird vermutet, dass die Replikation in den Hepatozyten oder anderem Leber-assoziiertem Gewebe stattgefunden hat und dafür eine vorangegangene Virämie ausschlaggebend war. Ob CBoV-3 oder das neuartige Canine Circovirus, das auch aus der Leber isoliert wurde, ursächlich für die generalisierte Erkrankung des Hundes war oder eine synergistische Infektion vorlag, lässt sich anhand der Datenlage nicht beantworten (Li et al., 2013).

2.6.3 Dermatologie

Beschreibungen von Bocavirus-assoziierten Hautveränderungen existieren bisher nur in der Humanmedizin und hier ausschließlich bei Kindern. Bei den bisher beschriebenen Fällen handelte es sich um makulopapuläre Erytheme auf der Brust und teils makuläre Erytheme im Gesicht. Die Autoren merkten an, dass die Hautveränderungen jenen durch das Parvovirus B19 hervorgerufen werden, ähnelten (Al Bishawi et al., 2021; Arnold et al., 2006). Pierangeli et al. (2008) dokumentierten den Fall eines HBoV-positivem Kindes mit gastrointestinalen Beschwerden, bei dem zusätzlich ein „Exanthema subitum“ diagnostiziert wurde (Pierangeli et al., 2008). Bisher galt das Parvovirus B19 als einziges Virus der Familie der Parvoviridae, das Hautveränderungen beim Menschen auslösen kann. Durch die Fallbeschreibungen bei Kindern wird daher angenommen, dass auch HBoV mit dermatologischen Manifestationen einhergehen kann (Al Bishawi et al., 2021). Beim Hund wurde, was Parvoviren betrifft, bisher nur CPV-2 als Agens von Hautveränderungen beschrieben.

Erstmalig wurde von Favrot et al. (2000) ein Fall eines Parvovirus-Enteritis erkrankten Welpen mit Hautveränderungen publiziert. Klinisch zeigte der betroffene Hund primär Ulzera an den Zehenballen, sowie der Mund- und Vaginalschleimhaut. Auch Bläschen in der Maulhöhle und Erytheme an der abdominalen und perivulvären Haut wurden beschrieben. Mittels Immunhistochemie wurde CPV-2 in Proben der Hautläsionen nachgewiesen (Favrot et al., 2000). Weitere Fälle von CPV-2b assoziierten Hautveränderungen wurde von Woldemeskel et al. (2011) bei einem 2-Wochen alten Wurf von Englischen Settern beschrieben. Diese zeigten klinisch Anzeichen eines Erythema multiforme, einer Hautveränderung multifaktoriellen Ursprungs, die grundsätzlich u.a. im Zusammenhang mit Arzneimittelreaktionen, Futtermittelunverträglichkeit und Follikulitis diskutiert wird (Woldemeskel et al., 2011). Darüber hinaus wiesen die Zungen und die anderen oralen Schleimhäute Erosionen sowie Ulzera auf. Epitheliotrope Viren wie z.B. Hundestaupevirus

(CDV – Canine Distemper Virus) oder das Canine Herpes Virus 1 (CHV-1) konnten als Ursache ausgeschlossen werden. CPV-2b konnte zudem in Gewebeproben der Zunge, Lymphknoten, Milz, Haut und Dünndarm nachgewiesen werden (Woldemeskel et al., 2011).

Bezüglich CBoV existieren bis dato keine Publikationen, die dermatologische Manifestationen beschreiben.

2.6.4 Neurologie

Von Piewbang et al. (2021) wurden Gehirnproben (n = 107) neurologisch erkrankter und verstorbener Hunde einer Screening-PCR auf CnMV sowie CBoV-2 und CBov-3 unterzogen. Betroffene Hunde zeigten folgende Symptome: Epileptiforme Anfälle, Verhaltensänderungen, Gangbildstörungen, Orientierungslosigkeit, Schwäche, Gleichgewichtsstörungen und/oder Halswirbelsäulenschmerzen. Bei den auf CBoV positiv getesteten Proben (Prävalenz 14 %) wurde ausschließlich CBoV-2 nachgewiesen; bei diesen Tieren handelte es sich überwiegend (60 %) um Jungtiere. Zehn der CBoV-2 positiven Tiere zeigten epileptiforme Anfälle. Andere Viren, die mit neurologischen Symptomen von Hunden (z.B. Tollwut, CDV, Canines Adenovirus und CPV) assoziiert werden, konnten in den untersuchten Proben nicht nachgewiesen werden. Neben einer konventionellen PCR wurde auch eine In-Situ-Hybridisierung sowie eine Transmissionselektronenmikroskopie des Gewebes zur Verifizierung der Lokalisation von CBoV-2 durchgeführt. Diese korrelierte zu einem überwiegenden Anteil mit den positiven PCR-Ergebnissen, daher wird von den Autoren die Hypothese eines möglichen Tropismus von CBoV-2 zum Gehirn aufgestellt. Zudem wird von den Autoren betont, dass eine Reihe von Studien darauf hindeuten, dass Bocaviren möglicherweise in der Lage sind, eine Virämie auszulösen und im Zuge dessen auch die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und in weitere Folge Läsionen im ZNS hervorrufen könnten (Piewbang et al., 2021).

Ein weiteres Beispiel von Bocaparvoviren mit potenziellem neuronalem Tropismus stellt das Porcine Bocavirus (PBoV) dar. Dieses wurde erstmals im Jahre 2013 bei einem sechs Wochen alten Ferkel mit ausgeprägter respiratorischer und gastrointestinaler Symptomatik im Rahmen der pathologischen Untersuchung im Gehirn mittels PCR nachgewiesen. Untersuchungen auf bekannte neuronal pathogene Schweineviren verliefen negativ. Eine anschließende In-Situ-Hybridisierung bestätigte PBoV als mögliche kausale Ursache der histologischen Läsionen des Gehirns (Pfankuche et al., 2016).

Auch das HBoV, konnte bereits aus ZNS-Material von Patienten, die an Enzephalitis unbekannter Genese erkrankten, isoliert werden. In Liquorproben von Kindern, die an einer

Enzephalitis erkrankten, konnte in 3 – 15 % der untersuchten Proben HBoV nachgewiesen werden (Akturk et al., 2015; Ergul et al., 2017)

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere und Material

3.1.1 Prospektive Datenerhebung

In dem prospektiven Anteil dieser Studie wurden insgesamt 52 Hunden des Bestandes des Militärhundezentrums einbezogen. Im Zuge dessen wurden von den Tieren Rektal- und Rachenabstriche gewonnen und diese in weitere Folge mittels konventioneller PCR auf CBoV-2 untersucht.

Vor der Beprobung wurde ein Gutachten der Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien eingeholt, die das Vorhaben der Beprobung als veterinärmedizinisch indizierte Maßnahme eingestuft und genehmigt hat (ETK Nr. 019/02/2021).

Zeitgleich mit der Entnahme der Abstriche wurden vor Ort die Rasse, das Alter und das Geschlecht dokumentiert und eine kurze Anamnese (in der Tabelle 1 als „Besonderheiten“ tituliert) des jeweilig beprobten Tieres erhoben. Eine Gesamtübersicht der Daten ist in der Tabelle 1 ersichtlich.

Bei den Hunden dieses Bestandes handelte es sich um Rottweiler der Eigenzucht des Militärhundezentrums (Zuchthündinnen- und Rüden, sowie deren Welpen), zugekaufte Diensthunde (Malinois und Labradore) und Privathunde der Mitarbeiter/-innen (Nr. 10, 19), die sich fast täglich am Gelände des Militärhundezentrums aufhielten. Darüber hinaus wurden für diese Studie auch Militärhunde externer Mitarbeiter, die sich am Tag des zweiten Probendurchganges am Gelände befanden, miteinbezogen (Nr. 1, 8, 9, 20, 21, 25, 26, 34, 37, 41, 43) um eine potenzielle Verschleppung von CBoV-2 zu erfassen.

Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe erstellt, um die Hypothese, dass es sich bei dem Militärhundezentrum um einen endemisch betroffenen Bestand handeln könnte, zu bestätigen. Die Daten der Tiere wurden von der Diplomandin mittels eines Fragebogens dokumentiert. Die Proben dieser Hunde wurden in Form von Kottupfern durch die Besitzer/-innen selbst entnommen und anschließend am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien einem Screening mittels einer PCR zum Nachweis von CBoV-2 unterzogen. Eine Gesamtübersicht der Kontrollgruppe (Rasse, Geschlecht, Alter) ist in der Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 1 Gesamtübersicht der beprobten Tiere des Militärhundezentrums

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter	1. UG (Juni)	Besonderheiten	2. UG (Aug.)	Besonderheiten
1	*Malinois	m	k.A.	**nein**	/	ja	o.b.B.
2	Malinois	w	k.A.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
3	Malinois	m	1 J. 9 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
4	Rottweiler	m	4 J. 2 Mon.	ja	o.b.B. kein Rachenabstrich	ja	o.b.B. kein Rachenabstrich
5	Labrador	m	8 J. 10 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
6	DSH	m	1 J. 5 Mon.	ja	o.b.B. aus externer Zucht (CZ)	ja	o.b.B.
7	Labrador	m	1 J. 6 Mon.	ja	o.b.B. aus externer Zucht (AT)	**nein**	/
8	*Labrador	m	1 J. 4 Mon.	**nein**	/	ja	o.b.B.
9	*Labrador	m	1 J. 4 Mon.	**nein**	/	ja	o.b.B.
10	**DSH	m	3 J. 7 Mon.	**nein**	/	ja	o.b.B.
11	Rottweiler	m	k.A.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
12	DSH	m	2 J. 9 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
13	Labrador	m	1 J. 6 Mon.	ja	o.b.B. aus externer Zucht (AT)	**nein**	/
14	Rottweiler	m	3 J. 1 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
15	Malinois	w	7 J. 4 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
16	Labrador	m	1 J. 6 Mon.	ja	o.b.B. aus externer Zucht (AT)	ja	o.b.B.
17	Rottweiler	w	3 J. 1 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
18	Labrador	m	1 J. 6 Mon.	ja	o.b.B. aus externer Zucht (AT)	ja	o.b.B.
19	**Tervueren	w	8 J. 1 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
20	*Malinois	m	k.A.	**nein**	/	ja	o.b.B.
21	*Malinois	w	1 J. 5 Mon.	**nein**	/	ja	o.b.B.
22	Rottweiler	w	2 J. 9 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.

23	Malinois	m	1 J. 5 Mon.	**nein**	/	ja	o.b.B.
24	Rottweiler	m	2 J. 9 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
25	*Rottweiler	m	k.A.	**nein**	/	ja	o.b.B.
26	*Malinois	w	1 J. 5 Mon.	**nein**	/	ja	o.b.B.
27	Rottweiler	m	2 J. 9 Mon.	ja	wässriger DF CBoV pos. (2020)	ja	o.b.B.
28	Rottweiler	m	2 J. 9 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
29	Rottweiler	m	2 J.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
30	Rottweiler	w	2 J.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
31	Rottweiler	w	2 J.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
32	Rottweiler	w	6 J.	ja	o.b.B. CBoV pos. (2020)	**nein**	/
33	Labrador	m	10 J. 5 Mon.	ja	o.b.B. aus externer Zucht (NL)	ja	o.b.B.
34	*Rottweiler	w	k.A.	**nein**	/	ja	o.b.B.
35	Rottweiler	w	12 J. 3 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
36	Malinois	m	10 J. 9 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
37	*Malinois	m	k.A.	**nein**	/	ja	o.b.B.
38	Rottweiler	w	6 J. 2 Mon.	ja	o.b.B. CBoV pos. (2020)	ja	o.b.B.
39	Malinois	m	4 J. 4 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
40	Labrador	w	7 J. 8 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
41	*Labrador	m	7 J. 8 Mon.	**nein**	/	ja	o.b.B.
42	Rottweiler	m	7 J. 7 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
43	*Malinois	m	k.A.	**nein**	/	ja	o.b.B.
44	Rottweiler	w	5 J. 8 Mon.	ja	o.b.B. CBoV pos. (2020)	ja	o.b.B.
45	Labrador	m	6 J. 6 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
46	Labrador	m	6 J. 6 Mon.	ja	o.b.B.	**nein**	/
47	Labrador	m	5 J. 9 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.

48	Malinois	m	10 J. 10 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
49	Labrador	m	5 J. 8 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
50	Rottweiler	m	6 J. 6 Mon.	ja	o.b.B.	**nein**	/
51	Rottweiler	m	6 J. 6 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.
52	Rottweiler	w	6 J. 5 Mon.	ja	o.b.B.	ja	o.b.B.

Abk.: * = externe Militärhunde, ** = Privathunde, DSH = Deutscher Schäferhund; w = weiblich, m = männlich; AT = Österreich, CZ = Tschechien, NL = Niederlande, k.A. = keine Angabe, DF = Durchfall, neg. = negativ, pos. = positiv, o.b.B = ohne besonderen Befund, J. = Jahr, Mon. = Monat, 1.UG = 1.Untersuchung; 2.UG = 2.Untersuchung

Tabelle 2 Gesamtübersicht der Kontrollgruppe

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter
1	Schäfermischling	mk	8 J. 7 Mon.
2	Dackelmischling	w	13 J. 4 Mon.
3	Dackelmischling	w	11 J. 7 Mon.
4	Jack-Russell Terrier	w	3 J. 9 Mon.
5	Mischling	m	4 J. 9 Mon.
6	Labrador	w	14 J. 9 Mon.
7	Yorkshire Terrier	w	3 J. 5 Mon.
8	Yorkshire Terrier	w	12 J. 5 Mon.
9	Labrador	wk	13 J. 2 Mon.
10	Mischling	wk	12 J. 3 Mon.
11	Labradormischling	w	12 J.
12	Pekinese	w	5 J. 4 Mon.
13	Chihuahua	m	9 J. 10 Mon.
14	Mischling	wk	7 J. 4 Mon.
15	Mischling	wk	4 J. 9 Mon.
16	Sheltie	wk	6 J. 10 Mon.
17	Sheltie	wk	10 J.
18	Mischling	w	4 J. 4 Mon.
19	Dackelmischling	m	14 J. 11 Mon.
20	Mischling	w	2 J. 7 Mon.

Abk.: m = männlich, mk = männlich kastriert, w = weiblich, wk = weiblich kastriert, J. = Jahr,
Mon. = Monat

3.1.2 Epidemiologische Untersuchung des Bestandes: Probengewinnung

Die Probenentnahme erfolgte an zwei Zeitpunkten im Abstand von etwa zwei Monaten (29.06.2021 und 30.08.2021). Hierbei wurden Rektal- und Rachenabstriche aller Tiere vor Ort entnommen. Zur Probenentnahme wurden beflockte Trockentupfer (FLOQSwabs™, Copan Italia S.p.A., Brescia, Italien) verwendet. Eine Dokumentation der Daten der jeweiligen Hunde wurde vor Ort durchgeführt (Tabelle 1).

Für die Entnahme beider Abstriche wurden die Tiere von ihren jeweiligen Hundeführer/-innen und/oder anwesenden Mitarbeiter/-innen des Militärhundezentrums kurzzeitig fixiert. Die Abstriche wurden von der Diplomandin der vorliegenden Arbeit oder den anwesenden Tierärzten des Militärhundezentrums entnommen.

Zur Entnahme der Rachenabstriche befanden sich die Tiere in sitzender Position. Sie wurden am Halsband durch eine Assistenzperson festgehalten. Das Öffnen des Fanges übernahm der/die Hundeführer/-in selbst, um den Stress des Tieres bei der Beprobung möglichst minimal zu halten. Der Abstrich erfolgte durch drehende Bewegungen im Bereich der Tonsillen.

Die Entnahme der Rektalabstriche erfolgte direkt danach am stehenden Hund; die Tupfer wurden für wenige Sekunden unter drehender Bewegung ca. 1–2 cm rektal eingeführt.

Alle Proben sind unmittelbar nach Entnahme mit dem Namen des Tieres, sowie dem Entnahmeort der Probe, gekennzeichnet und mittels Icepacks gekühlt worden. Anschließend erfolgte ein zügiger Transport an das Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, um diese bei – 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung zu lagern.

3.1.3 Erste Probenentnahme

Am Tag der ersten Probenentnahme wurde von 39 Hunden Rektal- und Rachenabstriche entnommen; auf den Rachenabstrich eines Hundes (Nr. 4) wurde aus sicherheitstechnischen Gründen verzichtet.

3.1.4 Zweite Probenentnahme

Die Probenentnahmen am zweiten Zeitpunkt wurden analog zur Ersten durchgeführt. Demnach wurden 47 Hunden sowohl Rachen- und Rektalabstriche entnommen. Fünf Hunde der ersten Probenentnahme waren nicht am Gelände; elf externe Hunde (Nr. 1, 8, 9, 20, 21, 25, 26, 34, 37, 41, 43) wurden erstmalig getestet. Auch an diesem Tag wurde beim selben Hund des ersten Durchganges (Nr. 4) aus sicherheitstechnischen Gründen auf die Beprobung des Rachens verzichtet.

Erwähnenswert ist auch, dass eine Hündin (Nr. 38) zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme Welpen hatte. Nach Absprache mit den verantwortlichen Tierärzten des

Militärhundezentrums wurde auf eine Testung der Welpen verzichtet, um einerseits den Jungtieren keinem Stress auszusetzen und andererseits das neu angewendete Hygienemanagement aufrechtzuerhalten und eine potenzielle (Re-)Kontamination der Zwinger der Welpen zu verhindern.

3.1.5 Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe wurden 20 Hunde verschiedensten Alters, Rasse und Herkunft ausgewählt. Hauptkriterium war, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Beprobung keinen Durchfall hatten bzw. nicht anderwärtig klinisch krank waren. Die Proben wurden im Zeitraum von September 2021 bis Dezember 2021 im Raum Wien und Niederösterreich gesammelt.

Im Unterschied zu den Militärhunden wurden lediglich Kottupfer untersucht. Die Halter/-innen erhielten eine zu unterschreibende Einverständniserklärung mit einer Beschreibung der laufenden Studie. Zusätzlich bekamen die Hundehalter Instruktion zur Kottupferentnahme und Lagerung sowie einen kurzen Anamnesefragebogen. Die Tierhalter/-innen erhielten dieselben Trockentupfer (FLOQSwabs™, Copan Italia S.p.A., Brescia, Italien), die auch für die Beprobung der Militärhunde verwendeten wurden, um von den frisch abgesetzten Faeces der Hunde einen Kottupfer zu entnehmen. Dokumentiert wurden neben Namen, Alter, Geschlecht und Rasse auch die Vorerkrankungen und der jeweilige Impf- und Entwurmungsstatus der Hunde.

3.1.6 Retrospektive Datenerhebung

In dem retrospektiven Anteil dieser Studie wurden die Daten von 13 Welpen des Militärhundezentrums im Zeitraum 2015 bis 2021, die mit Hautveränderungen und/oder gastrointestinalen Symptomen vorstellig wurden, aufgearbeitet. Einschlusskriterien waren die klinischen Symptome (charakteristische Hautläsionen in Form von Bläschen, Papeln oder Pusteln sowie perakute Diarrhö und Vomitus - ähnlich einer caninen Parvovirusenteritis), positive CBoV-2-PCR Befunde, Wurfzugehörigkeit (zu PCR positiven Wurfgeschwistern), die auf eine potenzielle CBoV-2 Infektion hindeuteten. Insgesamt zeigten sieben Welpen einen negativen CBoV-2 PCR-Befund, wurden aber aufgrund der oben genannten charakteristischen Symptomatik inkludiert. Die Daten und Befunde wurden aus dem Tierspital-Informationssystem (TIS) der klinischen Abteilung für Interne Medizin Kleintiere, dem Institut für Virologie und dem Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien bezogen.

Dokumentierte Klinikaufenthalte an der Abteilung für Interne Medizin Kleintiere liegen von acht Welpen vor. Bei vier dieser Hunde lag zusätzlich ein pathologischer Befund des Tierkörpers vor. Von den restlichen fünf Welpen, die nicht an der Klinik vorstellig waren, starben vier

Welpen. Von diesen vier lag jeweils ein pathologischer Befund. Vom fünften Hund liegt lediglich ein virologischer Befund vor.

Pathologische Befunde lagen bei insgesamt acht der 13 Hunde vor. Bei zwei dieser Welpen wurden zusätzlich auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung des Darmtraktes eingeleitet.

Die Daten eines CBoV-2 positiven Welpens (Nr. 10z; s. Tabelle 10), der über Wochen persistierende Läsionen an der Zunge zeigte, beschränken sich auf einen virologischen Befund, Anamnese sowie einer Fotodokumentation der Läsionen von den zuständigen Tierärzten des Militärhundezentrums.

3.2 Methodik

3.2.1 Probenvorbereitung

1,5 ml Reaktionsgefäße wurden mit 1000 µl steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) befüllt. Um ausreichend Probenmaterial für die anschließende molekularbiologische Untersuchung zu erhalten, wurden die Trockentupfer der Kot-, Rachen- und Rektalabstriche in den jeweiligen Reaktionsgefäßen für jeweils 60 Sek. in stets gleichmäßiger Bewegung gedreht. Um eine Kontamination der Reaktionsgefäße untereinander zu vermeiden, wurde dieser Schritt unter der Sicherheitswerkbankvorgenommen.

Danach erfolgte eine Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 16.000 x g für 1 Min.; nach der Zentrifugation wurden jeweils 200 µl des Überstandes in eine tiefe 96-Wells Mikrotiterplatte pipettiert. Die Reaktionsgefäße mit den Restvolumina wurden anschließend bei –80 °C im Tiefkühler als Rückstellprobe gelagert.

3.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der Proben erfolgte durch den QIAcube HT Instrument (Qiagen, Hilden, Deutschland). Verwendet wurde das QIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland); das Kit und das Gerät wurden jeweils nach Anleitung des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 200 µl der Proben extrahiert.

Steriles PBS wurde als Negativkontrolle in jeder Extraktionsrunde mitextrahiert.

3.2.3 PCR

Mittels des FastCycling PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden die PCR-Reaktionsgemische hergestellt (s. Tabelle 3). Nach Zugabe der jeweiligen Primer Paare (s. Tabelle 4) erfolgte die Amplifikation in einem Mastercycler. Zur Validierung wurde in jeder PCR-Reaktion eine Positiv- und Negativkontrolle (extrahiertes PBS) zugesetzt. Dabei wurden den Angaben des Herstellers Folge geleistet.

Die anschließende Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch eine Kapillarelektrophorese, QiAxcel Advanced System (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die thermozyklischen Bedingungen für die jeweiligen verwendeten Primer sind in den angehängten Tabellen 5 – 7 aufgelistet.

Die gesamten Proben unterliefen folgendem Analyse Schema: Zuerst wurde eine Screening PCR mit den Primer Paaren CBoV-1563-F/CBoV-1782-R angefertigt. Anschließend wurden fraglich positive Proben mittels zwei weiteren CBoV-2 Primer Paaren verifiziert (s. Tabelle 4). Eine fragliche Probe, die in einem der alternativen Primer-Paaren ein positives Ergebnis erzielte, wurde gesamt als positives Ergebnis interpretiert CBoV-3 wird mit den verwendeten Primerpaaren nicht erfasst.

Tabelle 3 Reaktionsgemisch inkl. Mengenangaben für eine PCR-Reaktion

Bestandteile	Menge (in µl)
Fast Cycling PCR-Mix	10
RNAse freies H2O	5
Coral Load F.C. Dye	2
Primer F 40 µM	0,5
Primer R 40 µM	0,5
Zugabe Template	2
Gesamtvolumen	20

Tabelle 4 Die für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer Paare

Primer Name	Primer Sequenz	Annealing Temperatur [°C]
*CBoV-1563-F *CBoV-1782-R	5'-GCT GTA CGG ATG TGT GAA-3' 5'-GTA CAC GTC GTG ATT GGT ACT G-3'	54
CBoV-926-F CBoV-1993-R	5'-GAG CAA CTC CGT TTG TCT C-3' 5'-CGT TAG GAG TGC ACT GAA GCT G-3'	52
CBoV-1563-F CBoV-1925-R	5'-GCT GTA CGG ATG TGT GAA-3' 5'-GCA TCG AAT CGA GAA GAG C-3'	52

*Anmk.: Die Primer CBoV-1563-F/CBoV-1782-R waren zum Zeitpunkt der angefertigten Analyse die für die CBoV-Routinediagnostik verwendeten Primer am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Tabelle 5 Thermozyklische Bedingungen der Primer CBoV-1563-F/1782-R

Schritt	[°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Min.	1x
Denaturierung	96	5 Sek.	45x
Annealing	54	5 Sek.	
Elongation	68	9 Sek.	
Finale Elongation	72	1 Min.	1x

Tabelle 6 Thermozyklische Bedingungen der Primer CBoV-926-F/1993-R

Schritt	[°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Min.	1x
Denaturierung	96	5 Sek.	49x
Annealing	52	5 Sek.	
Elongation	68	40 Sek.	
Finale Elongation	72	1 Min.	1x

Tabelle 7 Thermozyklische Bedingungen der Primer CBoV-1563-F/1925-R

Schritt	[°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Min.	1x
Denaturierung	96	5 Sek.	50x
Annealing	52	5 Sek.	
Elongation	68	12 Sek.	
Finale Elongation	72	1 Min.	1x

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Screening PCR

4.1.1 Ergebnisse des 1. Probendurchganges (Juni 2021)

Von den 39 im Juni 2021 getesteten Hunden waren zwölf (31 %) Tiere eindeutig positiv und vier (10 %) Tiere wurden als fraglich positiv eingestuft.

Bei den zwölf positiv getesteten Tieren wurde in jeweils sechs Rachen- und in sechs Rektalabstrichen CBoV-2-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen.

Bei den insgesamt vier fraglich positiven Tieren war die eine Hälfte im Rachen- und die andere Hälfte im Rektalabstrich CBoV-2 positiv.

Bei der Datenerhebung vor Ort fiel auf, dass ein Hund (Tabelle 7, Nr. 27) zum Zeitpunkt der Beprobung an wässriger Diarrhö litt und das CBoV-2-Screening des Rachenabstrichs positiv ausfiel. Dieser Hund hatte im Jahre 2020 persistierende Läsionen an der Zunge gezeigt und aus dem Abstrichmaterial dieser Läsionen konnte wiederholt CBoV-2-spezifische Nukleinsäure mittels Screening PCR nachgewiesen werden. Bei drei weiteren getesteten Hunden (Nr. 32, 38, 44) wurde im gleichen Jahr PCR-Folgeuntersuchungen aus verschiedensten Probenmaterialien (Rachenabstrich, Kottupfer) unternommen. Alle drei Hunde waren zum Zeitpunkt der Beprobung adult und zum Zeitpunkt der Beprobung klinisch unauffällig. Zwei (Nr. 32 und 44) der drei erwähnten Hunde wurden im Rahmen dieser Studie positiv auf CBoV-2 getestet, wobei Nr. 32 positiv im Rachenabstrich und Nr. 44 positiv im Rektalabstrich ausfielen.

Tabelle 8 Hunde des ersten Probendurchganges (Juni 2021) mit positiven CBoV-2 PCR-Resultaten

Nr.	Rasse	Geschlecht	Rachen	Rektal	Vorgeschichte
3	Malinois	m	**positiv**	negativ	o.b.B.
7	Labrador	m	**fraglich**	negativ	o.b.B. aus externer Zucht (AT)
10	**DSH	m	**positiv**	negativ	o.b.B.
12	DSH	m	negativ	**positiv**	o.b.B.
15	Malinois	w	negativ	**positiv**	o.b.B.
19	**Tervueren	m	negativ	**fraglich**	o.b.B.
24	Rottweiler	m	negativ	**positiv**	o.b.B.
27	Rottweiler	m	**positiv**	negativ	wässriger DF 2020 CBoV pos. (symptomatisch)
28	Rottweiler	m	negativ	**positiv**	o.b.B. (vor 1 Woche DF)
30	Rottweiler	w	**positiv**	negativ	o.b.B.
32	Rottweiler	w	**positiv**	negativ	o.b.B. 2020 CBoV pos. (symptomlos)
39	Malinois	m	**positiv**	negativ	o.b.B.
44	Rottweiler	w	negativ	**positiv**	o.b.B. 2020 CBoV pos. (symptomlos)
45	Labrador	m	**fraglich**	negativ	o.b.B.
47	Labrador	m	negativ	**fraglich**	o.b.B.
48	Malinois	m	negativ	**positiv**	o.b.B.

Abk.: Nr. = Tiernummer, DSH = Deutscher Schäferhund, m = männlich, w = weiblich, DF = Durchfall, o.b.B = ohne besonderen Befund, ** = Privathunde

4.1.2 Ergebnisse des 2. Probendurchganges (August 2021)

Von den Ende August 2021 getesteten Hunden (n = 47) wurde eine (2 %) Hündin positiv im Rachenabstrich und zwei weitere (4 %) mit einem fraglich positiven Ergebnis im Rachenabstrich getestet. Keiner der Hunde zeigte zum Zeitpunkt der Probenentnahme klinische Auffälligkeiten.

Tabelle 9 Hunde des zweiten Probendurchganges (August 2021) mit positiven CBoV-2 PCR-Resultaten

Nr.	Rasse	Geschlecht	Rachen	Rektal	Vorgeschichte
15	Malinois	w	**fraglich**	negativ	o.b.B.
26	*Malinois	w	**fraglich**	negativ	o.b.B.
52	Rottweiler	w	**positiv**	negativ	o.b.B.

Abk.: * = externer Militärhund, m = männlich, w = weiblich, o.b.B = ohne besonderen Befund

4.1.3 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Die PCR-Untersuchung auf CBoV-2 der gesamten Kontrollgruppe verlief negativ.

4.2 Auswertung der retrospektiven Fälle

Für die Auswertung der retrospektiven Fälle wurden Daten von insgesamt 13 Rottweiler Welpen (sechs weiblich, sieben männlich; s. Tabelle 10) der Militärhundezucht herangezogen. Die betroffenen Welpen der Würfe A bis D sowie zwei Einzeltiere ohne Wurfzugehörigkeit (Nr. 3y und 10z) wurden von Geburt an in Zwingern gehalten und hatten keinen Kontakt zu anderen Hunden außerhalb des Geländes. Die Welpen hatten zu Beginn der Symptomatik ein Alter von zwei bis vier Monaten (Median = 2,6 Monate). Die betroffenen Hunde zeigten durchwegs einheitliche klinische Anzeichen, die sich aus charakteristischen Hautveränderungen und gastrointestinalen Symptomen zusammensetzten. Jedoch wurde bei nur sechs der Welpen mittels der konventionellen PCR aus dem Kotabstrich, dem Darmtrakt und/oder Hautmaterial CBoV-2 nachgewiesen. Aufgrund der Ähnlichkeit der gezeigten Symptomatik der Welpen der jeweiligen Würfe wurden auch die sieben negativ getesteten bei den retrospektiven Fällen miteinbezogen. Aufgrund der geringen Tieranzahl wurde eine rein deskriptive Aufarbeitung der dokumentierten Fälle durchgeführt.

Fünf (Nr. 1A, 4B, 11D, 12D und 13D) der sechs positiv getesteten Hunde verstarben oder mussten euthanasiert werden. Von Symptombeginn bis zum Zeitpunkt des Todes lagen zwischen 14 und 91 Tage (Median = 35 Tage). Die Hunde Nr. 1A und 12D verstarben 14 Tage nach Auftreten der ersten Symptome; Nr. 4B verstarb 35 Tage nach Symptombeginn; Nr. 11D verstarb 91 Tage nach Symptombeginn, wobei dieser Welpe in diesem Zeitraum zweimal ein Rezidiv entwickelte. Welpe Nr. 13D verstarb 60 Tage nach Symptombeginn, wobei dieser Hund zwischenzeitlich keine gravierende Symptomatik bis auf disseminierte Hautläsionen am Körper aufwies.

Von den sieben negativ getesteten verstarben drei Welpen (Nr. 2A, 3y und 4B). Der Hundewelpe Nr. 3y verstarb innerhalb von 21 Tagen nach Symptombeginn; von den Hunden Nr. 2A und 4B waren aufgrund fehlender Daten keine genauen Verläufe zu erheben.

Das Alter (zum Zeitpunkt der gezeigten Symptomatik), Geschlecht, das PCR-Ergebnis (positiv/negativ), Klinik- bzw. Ambulanzaufenthalt an der Universitätsklinik für Kleintiere (ja/nein), das Vorhandensein eines Sektionsbefundes (ja/nein) und der Outcome (Verstorben/Euthanasie/Genesen) der Welpen sind in Tabelle 10 ersichtlich. Da teils mehrere Hunde eines Wurfes betroffen waren, wurde zudem in der Tabelle 10 die jeweiligen Wurfzugehörigkeiten mit Buchstaben (A – D) gekennzeichnet. Bei zwei Welpen (Nr. 3y und 10z) handelte es sich um vorgestellte Einzeltiere ohne Wurfzugehörigkeit zu den anderen Hunden.

Tabelle 10 Gesamtübersicht der retrospektiven Fälle

Nr.	Wurf	Alter	Geschlecht	CBoV-2 PCR	Klinik-Ambulanzaufenthalt	Pathologie-Befund	Outcome
1	A	2,6 Mon.	w	pos.	nein	ja	Verstorben
2		2,6 Mon.	m	neg.	nein	ja	Verstorben
3y	(-)	3 Mon.	m	neg.	ja	ja	Verstorben
4	B	3 Mon.	m	pos.	ja	ja	Euthanasie
5		2 Mon.	w	neg.	nein	ja	Verstorben
6	C	2 Mon.	m	neg.	ja	nein	Genesen
7		2 Mon.	w	neg.	ja	nein	Genesen
8		2 Mon.	w	neg.	ja	nein	Genesen
9		2 Mon.	m	neg.	ja	nein	Genesen
10z	(-)	3 Mon.	m	pos.	nein	nein	Genesen
11	D	4 Mon.	w	pos.	ja	ja	Euthanasie
12		4 Mon.	m	pos.	ja	ja	Verstorben
13		4 Mon.	w	pos.	ja	ja	Verstorben

Abk.: (-) = vorgestellte Einzeltiere ohne Wurfzugehörigkeit, Mon. = Monat, w = weiblich, m = männlich, pos. = positiv, neg. = negativ

4.2.1 Symptome

Alle 13 Hunde wiesen Hautläsionen an unterschiedlichen Körperstellen auf. Diese zeigten sich in Form von Bläschen, Papeln oder Pusteln.

Sonstige häufig dokumentierte Symptome, in absteigender Reihenfolge, umfassten: Diarrhö (83 %), Vomitus (77 %) sowie respiratorische (15 %) und neurologische (8 %) Auffälligkeiten.

Zur übersichtlicheren Darstellung sind die Welpen mit den jeweilig gezeigten Symptomen (inkl. Wurfzugehörigkeit, CBoV-2 PCR-Befund, Outcome) in der Tabelle 11 ersichtlich.

Tabelle 11 Gesamtübersicht der Symptome

Nr.	Symptome	CBoV-2 PCR	Outcome
1A	EB + DF, HL	pos.	Verstorben
2A	EB + DF, HL	neg.	Verstorben
3y	EB + DF, HL	neg.	Verstorben
4B	DF, HL, respiratorisch, neurologisch	pos.	Euthanasie
5B	DF, HL, respiratorisch	neg.	Verstorben
6C	EB + DF, HL	neg.	Genesen
7C	EB + DF, HL	neg.	Genesen
8C	EB + DF, HL	neg.	Genesen
9C	EB + DF, HL	neg.	Genesen
10z	HL (pers. Läsionen an der Zunge)	pos.	Genesen
11D	EB + DF, HL	pos.	Euthanasie
12D	EB + DF, HL	pos.	Verstorben
13D	EB + DF, HL	pos.	Verstorben

Abk.: EB = Erbrechen, DF = Durchfall, HL = Hautläsionen, pers. = persistierende; pos. = positiv, neg. = negativ

Gastrointestinale Symptome

Initial wurde die Mehrheit (12/13) der Welpen aufgrund von schwerwiegender blutig-wässriger Diarrhö, teils in Kombination mit Erbrechen, in der Klinik vorstellig. Die Diarrhö wurde von den behandelnden Tierärzten als die der Parvovirose ähnlich beschrieben. Die Intensität sowie die Qualität des Durchfalls und des Erbrechens wurden im Einzelnen nicht erfasst und lassen sich retrospektiv daher unzureichend beurteilen. Zusätzlich zu diesen beiden Initialsymptomen zeigten die Tiere auch unspezifische Symptome wie Apathie, Fressunlust, schmerzhaftes Abdomen und eine geringgradig erhöhte IKT.

Aus Kot- und Darmmaterial konnte bei sechs Hundewelpen (Nr. 1A, 4B, 10z, 11D, 12D, 13D) CBoV nachgewiesen werden, die Testung der restlichen Hunde verlief negativ.

Bei den insgesamt acht Hunden, mit vorhandenem pathologischem Befund, zeigte sich kein einheitliches Bild. Jedoch legten die Befunde bei insgesamt sieben Welpen nahe, dass primär Veränderungen des MDT ausschlaggebend für das Versterben der Welpen war.

Bei insgesamt drei (3/8) Hundewelpen lag eine Dünndarminvagination vor, die auch als Todesursache dieser interpretiert wurde (Nr. 2A, 3y, 12D). Bei weiteren zwei Welpen (Nr. 1A, 4B) wurde in der pathologischen Untersuchung eine Enteritis festgestellt, bei einem dieser Hunde in Kombination mit einer Pankreatitis (Nr. 4B). Insgesamt wiesen zwei Hunde (Nr. 5B, 11D) jeweils eine mgr. bis hgr. eitrig-nekrotisierende Hepatitis auf, Welpe Nr. 5B zusätzlich eine intestinale Fibrose und der Welpe Nr. 11D eine mgr. multifokale ulzerativ-eitrige Colitis.

Welpe Nr. 13D wies eine chronische Entzündung der Blinddarmwand auf, jedoch stand eine chronisch eitrige Myokarditis in Kombination mit einer fibrinösen Epi- und Perikarditis und einer Linksherzhypertrophie im Vordergrund des Versterbens. Pathohistologische glichen die Veränderungen der Blinddarmwand jenen des Herzens.

Hautläsionen

Die Hautveränderungen wurden als Papeln, Bläschen oder Pusteln beschrieben. Die Lokalisationen der Hautveränderungen wurden bei allen Welpen an der Innenseite der Ohrmuscheln dokumentiert, bei sechs Welpen (Nr. 1A, 2B, 6C, 7C, 8C, 9C) zusätzlich auch an der Bauchunterseite. Ein Hund (Nr. 4B) wies neben Pusteln und Erythemen an den Ohreninnenflächen, auch Pusteln an Karpalgelenk, Achseln und am ventralen Hals auf.

Auch Schleimhäute und mukokutane Übergänge zeigten sich bei vier Hundewelpen wie folgt betroffen: Nr. 3y (laut Anamnese multiple Pusteln im Maulbereich), Nr. 10z (persistierende Hautläsionen an der Zungenschleimhaut), Nr. 11D (multiple Bläschen an der Maulschleimhaut), Nr. 13D (multiple Knötchen und Krusten an der Vulva).

Bei drei Hunden (Nr. 4B, 11D, 13D) gingen die Pusteln mit Juckreiz einher. Teilweise wurden bakteriologische Untersuchungen (n = 3) der betroffenen Hautareale vorgenommen, bei welchen Besiedelungen mit *Staphylococcus pseudintermedius*, *Corynebacterium* sp. und *Escherichia coli* nachgewiesen werden konnten. Die Untersuchung auf Dermatophyten wurde bei einem Welpen veranlasst und verlief negativ.

Im Rahmen einer dermatologischen Untersuchung des Hundes Nr. 13D, der nach Genesung von gastrointestinalen Symptomen weiterhin Hautläsionen aufwies, wurde eine oberflächliche bis tiefe Pyodermie diagnostiziert. Pusteln ventral des Halses wurden zudem mikroskopisch untersucht. In der Zytologie dieses Abstriches wurden mgr. Kokken, mgr. Neutrophile Granulozyten und ggr. Makrophagen nachgewiesen. Die Keratinozyten erschienen zudem teilweise rund und kugelig und stellten sich akantholythisch dar.

Eine pathohistologische Untersuchung von drei Hautbiopsien wurde von Hund Nr. 4B veranlasst und wiesen eine oberflächliche Pyodermie sowie Kokken im Infundibulum auf.

Die Untersuchungen der Haut zeigten bei den Hundewelpen mit zusätzlich vorhandenem pathohistologischen Befunden stets ein ähnliches Erscheinungsbild: eitrige Dermatitis mit bakterieller Infiltration.

Während bei vereinzelten Tieren im Laufe des stationären Aufenthalts eine Verbesserung der Hautveränderungen dokumentiert werden konnte, zeigte ein sonst klinisch unauffälliger Welpe (Nr. 10z) über Monate persistierende Läsionen an der Zunge (s. Abb. 1 – 2). Aus dem Abstrichmaterial der Zunge wurde CBoV-2 per Screening PCR nachgewiesen. Fünf weitere Welpen desselben Wurfes (insgesamt acht Welpen) zeigten Hautveränderungen in Form von pustulären Hautläsionen. Diese bildeten sich nach nicht näher definiertem Zeitrahmen wieder zurück.

CBoV-2 Nukleinsäure wurde bei drei Hunden aus Abstrichmaterial der Hautläsionen mittels PCR nachgewiesen (Nr. 10z, 11D, 13D); bei einem Hund (Nr. 12D) wurde das Hautmaterial gemeinsam mit Darmgewebe in einer gepoolten Probe positiv befundet. Bei den restlichen Welpen wurde kein Hautmaterial mittels PCR untersucht. Die Hautläsionen (perioral, Ohrinnenfläche und ventrales Abdomen) des Welpen Nr. 11D sind in den Abb. 3 – 6 ersichtlich.

Abbildung 2: persistierende Läsion am hinteren Drittel der Zunge (Welpe Nr. 10z; Pfeil Markierung der Zungenläsion)

© Mag. med. vet. Thomas Lammer

Abbildung 1: beidseitige Läsion an der Zunge (Welpe Nr. 10z; Pfeil Markierung der Zungenläsion)

© Mag. med. vet. Thomas Lammer

Abbildung 4: Periorale Hautläsionen (Welpe Nr. 11D)

© Dr. med. vet. Pavlos Doulidis

Abbildung 3: Periorale Hautläsionen (Welpe Nr. 11D)

© Dr. med. vet. Pavlos Doulidis

Abbildung 5: Hautläsionen an der Innenseite der Ohrmuschel (Welpe Nr. 11D)

© Dr. med. vet. Pavlos Doulidis

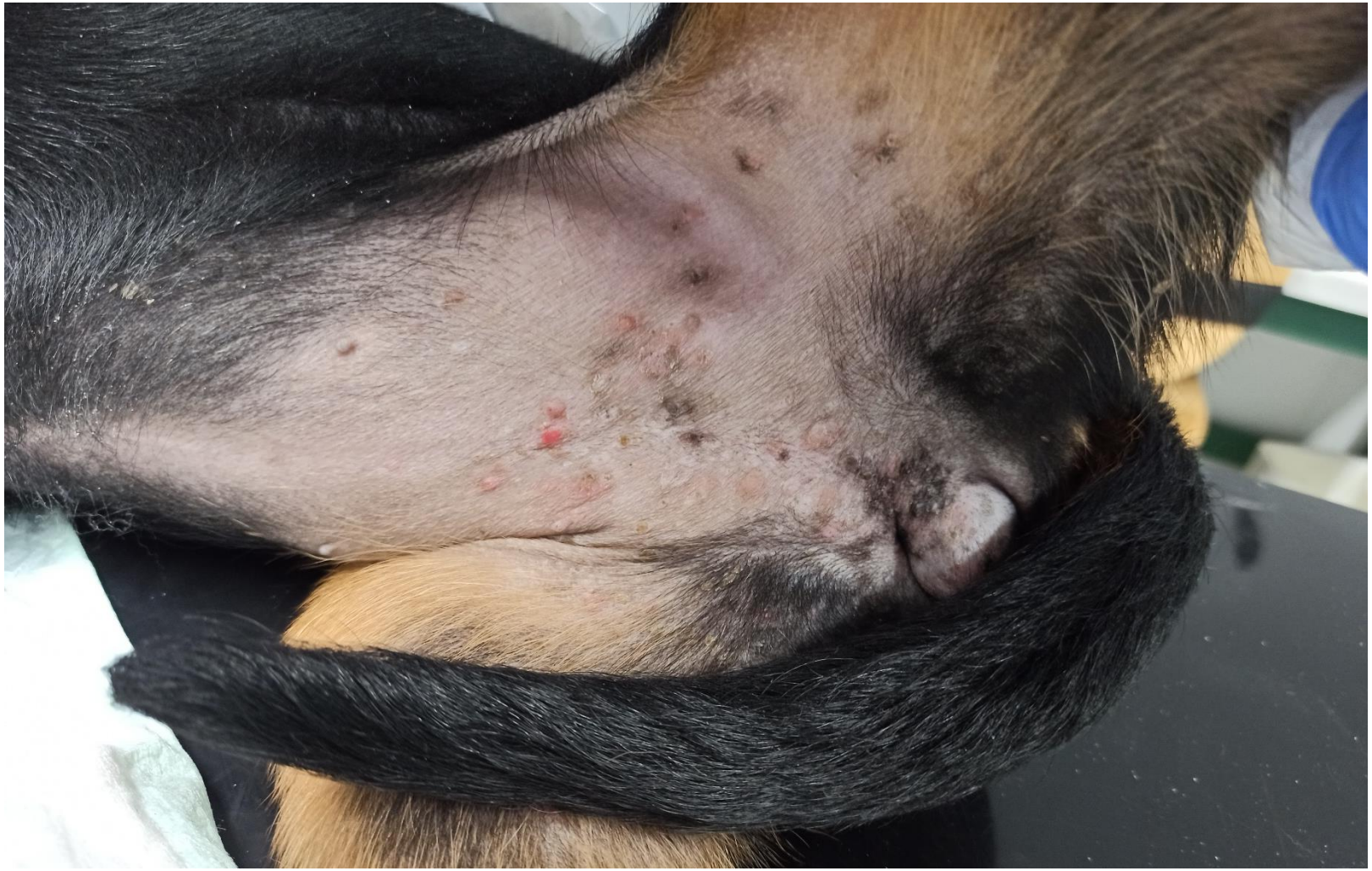

Abbildung 6: Hautläsionen ventrales Abdomen (Welpe Nr. 11D)

© Dr. med. vet. Pavlos Doulidis

Respiratorische und neurologische Symptome

Von respiratorischen Symptomen waren insgesamt zwei Welpen (Nr. 4B und 5B) desselben Wurfes betroffen. Im Rahmen des Klinikaufenthaltes wurde dokumentiert, dass die Nasenlöcher der Welpen mit mukopurulentem Sekret verklebt waren. Die Atemgeräusche wurden als „mittelgradig verschärft vesikulär“ befundet. In den Sektionsbefunden zeigte sich an den Lungen jedoch keine nennenswerten makroskopischen und pathohistologischen Veränderungen, die verdächtig für das Vorliegen einer entzündlichen Veränderung des Atmungstraktes waren.

Der Hundewelpe Nr. 4B wies zusätzlich auch neurologische Symptome auf. Im Rahmen der neurologischen Untersuchung zeigte der Welpe eine seitenbetonte Ataxie, vermehrtes Gähnen, Automutilation an den Pfoten der Hinterextremitäten sowie einen intermittierenden Tremor an Kopf und Hals. Eine Untersuchung des Liquors zeigte eine mit Lymphozyten dominierte Pleozytose. Der durchgeführte CDV-Schnelltest (FASTest® DISTEMPER Strip, MEGACOR Diagnostik GmbH, Hörbranz, Österreich) verlief negativ. Post mortem wurde von diesem Welpen Harn, Vollblut sowie Organproben von Haut und Gehirn per Screening PCR negativ auf CBoV-2 getestet. Drei PCR-Testungen ante mortem aus dem Kotabstrich des betroffenen Hundewelpens verliefen positiv. Im Sektionsbefund wurde eine pyogranulomatöse Meningoencephalitis ungeklärter Ätiologie diagnostiziert.

4.2.2 Blutparameter

Aufgrund der Schwere der gezeigten Symptome mussten einzelne Tiere (s. Tabelle 10) an der Universitätsklinik stationär überwacht und intensivmedizinisch behandelt werden. Die Initialen Blutbefunde der jeweiligen Tiere sind in Tabelle 12 (Großes Blutbild: Hämatologie inkl. Differentialblutbild) und Tabelle 13 (Blutchemieparameter) ersichtlich.

Tabelle 12 Ergebnisse der hämatologischen Blutuntersuchung

	Tiernummer					
Parameter	3y	4B	8C	11D	12D	13D
Erythrozyten [10^6/µl] 5.50–8.00	**3.61**↓	**5.10**↓	**4.19**↓	**5.21**↓	5.59	**5.41**↓
Hämoglobin [g/dl] 12.0–18.0	**6.2**↓	**10.3**↓	**10.3**↓	**10.1**↓	**11.4**↓	**11.5**↓
Hämatokrit [%] 37.00–55.00	**18.90**↓	**31.70**↓	**33.20**↓	**31.70**↓	**35.00**↓	**35.40**↓
Thrombozyten [10^3/µl] 150–500	**956**↑	438	484	**615**↑	**506**↑	**584**↑
Leukozyten (gesamt) [/µl] 6000.0–15000.0	**19150.0**↑	11050.0	**26400.0**↑	**38260.0**↑	**32660.0**↑	**17490.0**↑
Stabkernige [/µl] < 500.00	383.00	0.01	**1848.00**↑	0.04	0.03	0.02
Segmentkernige [/µl] 3300.00–11250.00	**14745.50**↑	7436.65	**18216.00**↑	**30914.08**↑	**26781.20**↑	**12890.13**↑
Lymphozyten [/µl] 780.00–4500.00	1723.50	1359.15	4488.00	3213.84	1959.60	2011.35
Monozyten [/µl] < 500.00	**2298.00**↑	**872.95**↑	**1056.00**↑	**2946.02**↑	**3266.00**↑	**1311.75**↑
Eosinophile [/µl] < 800.00	0.02	**1292.85**↑	792.00	**918.24**↑	653.20	**1171.83**↑

Tabelle 13 Ergebnisse der blutchemischen Untersuchung

	Tiernummer					
Parameter	3y	4B	8C	11D	12D	13D
Glu [mg/dl] 55.0–90.0	**102.0**↑	**95.0**↑	n.d.	**112.0**↑	66.0	**126.0**↑
Urea [mg/dl] 20.0–40.0	**15.9**↓	**18.3**↓		34.3	**10.9**↓	n.d.
Crea [mg/dl] 0.40–1.20	**0.30**↓	0.40		0.40	**0.20**↓	0.50
TP [g/dl] 6.00–7.50	**3.61**↓	**5.19**↓		**3.95**↓	**2.55**↓	**5.06**↓
Alb [g/dl] 2.58–4.73	**1.46**↓	2.69		**2.07**↓	**1.16**↓	3.15
AP [U/L] < 130	128	**257**↑		**207**↑	105	n.d.
ALT [U/L] < 80	18	**89**↑		11	8	17
CRP [U/L] < 35	**59.2**↑	34.5		**51.4**↑	**104.0**↑	11.8

Abk.: Glu = Glukose, Crea = Kreatinin, TP = Totalprotein, Alb = Albumin, AP = Alkalische Phosphatase, ALT = Alanin-Aminotransferase, CRP = C-reaktive Protein, n.d. = nicht durchgeführt

4.2.3 direkter Erregernachweis

Die Proben aller 13 Hunde unterliefen einer konventionellen Screening PCR auf CBoV-2. Eine qPCR zur Quantifizierung der Viruslast und eine In-Situ-Hybridisierung von CBoV standen nicht zur Verfügung, da diese Methoden bis dato an der VUW nicht etabliert wurden.

Als Probenmaterialien dienten hauptsächlich Kottupfer aber auch Hautgewebe bzw. Abstriche der veränderten Haut- und Schleimhautareale sowie Organproben, die im Rahmen der Sektionen entnommen wurden. Bei einem verstorbenen Welpen (Nr. 12D) wurde nach der pathologischen Untersuchung in zahlreichen Organen (Leber, Niere, Milz, Gehirn, Haut, Dünndarm und Lungengewebe) CBoV-2-spezifische Nukleinsäure mittels PCR nachgewiesen.

Bei dem Welpen Nr. 2A verlief die Screening PCR der Darmproben negativ, jedoch wurden im Rahmen einer Elektronenmikroskopischen Untersuchung des Darms Viruspartikel, die eine charakteristische Morphologie von Parvoviren aufwiesen, aufgefunden. Durch eine Immunhistochemie konnte sowohl das CPV-2 als auch das CDV als Ursache ausgeschlossen werden. Aufgrund der Anamnese und der o.a. Befunde, sowie der Tatsache, dass ein CBoV positiver Welpe aus demselben Wurf an vergleichbaren Symptomen verstarb (Nr. 1A), wird eine Infektion mit CBoV-2 angenommen. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zum Nachweis anderer differentialdiagnostisch relevanter Viren von Gastroenteritiden bei einigen Welpen eingeleitet und bei drei Tieren (Nr. 4B, 10z, 11D) mit dermatologischen Manifestationen eine Untersuchung auf CHV-1 durchgeführt. Diese PCR-Untersuchung verlief in allen drei Fällen negativ. Eine Gesamtübersicht der durchgeführten Nachweismethoden zum Ausschluss differentialdiagnostisch relevanter Viren (inkl. verwendetes Probenmaterial und angewendetes Nachweisverfahren) sind in der Tabelle 14 ersichtlich.

Tabelle 14 Ergebnisse der Untersuchungen zum Ausschluss differentialdiagnostisch relevanter Viren im Rahmen der retrospektiven Studie

Nr.	CBoV-2 PCR	weitere untersuchte Viren	Probenmaterial	Nachweisverfahren	Ergebnisse
1A	positiv	CDV	Darmgewebe	IHC	negativ
		CPV-2			
2A	negativ	CDV	Darmgewebe	IHC	negativ
		CPV-2			
3y	negativ	CPV-2	Kotabstrich	Snap-Test, PCR	negativ
4B	positiv	CDV	Liquor	Schnelltest	negativ
		CECoV	Kotabstrich	PCR	
		CPV-2			
		CHV-1	Serum	IFAT	
5B	negativ	CECoV	Darmgewebe	PCR	negativ
		CPV-2			
6C	negativ	k.A.			

7C	negativ	k.A.			
8C	negativ	CPV-2	Kotabstrich	PCR	negativ
9C	negativ	k.A.			
10z	positiv	CHV-1 Pan-Pox	Zungenabstrich	PCR	negativ
11D	positiv	CHV-1	Hautabstrich	PCR	negativ
		CPV-2	Kotabstrich	Snap-Test, PCR	
12D	positiv	CPV-2	Kotabstrich	Snap-Test, PCR	negativ
13D	positiv	k.A.			

Abk.: IFAT = Immuno Fluoreszenz Antikörper Test, IHC = Immunhistochemie, k.A. = keine Angabe, Snap-Test = Snap Parvo-Test (IDEXX GmbH, Kornwestheim, Deutschland), Schnelltest = *FAST*est® DISTEMPER Strip (MEGACOR Diagnostik GmbH, Hörbranz, Österreich), CDV = Canines Distemper Virus, CECoV = Canines Enterales Coronavirus, CHV-1 = Canines Herpes Virus 1, CPV-2 = Canines Parvovirus 2, Pan-Pox = Pockenviren

4.2.4 Pathologie

Die pathologischen Befunde der acht Welpen wiesen ein sehr inhomogenes Bild auf. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Ergebnisse der pathologischen Befunde in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15 Pathologische End-Befunde

Nr.	CBoV-2 PCR	Ausgeschlossene Viren	Endbefund
1A	positiv	CDV, CPV-2	CBoV-assoziierte Enteritis
2A	negativ	CDV, CPV-2	Dünndarminvagination
3y	negativ	CPV-2	nekrotische Invagination von Jejunum und Ileum
4B	positiv	CDV, CECov, CPV-2 CHV-1	Pyogranulomatöse Meningoencephalitis, chronische Enteritis, Pankreatitis
5B	negativ	CECoV, CPV-2	hgr. eitrig-nekrotisierende Hepatitis, intestinale Fibrose (Duodenum und Colon)
11D	positiv	CHV-1, CPV-2	mgr. multifokale eitrig-nekrotisierende Hepatitis mgr. multifokale ulzerative eitrige Colitis
12D	positiv	CPV-2	Dünndarminvagination mit hämorrhagischer Infarzierung Nekrose der Darmwand mit Ruptur und konsekutiver fibrinös eitriger Peritonitis
13D	positiv	k.A.	chron. eitrige Myokarditis, fibrinöse Epi- und Perikarditis, Linksherzhypertrophie mit resultierendem Herz-Kreislaufversagen, chron. Entzündung der Blinddarmwand

4.2.5 Ko-Infektionen

Bei 46 % (6/13) zeigte sich im Rahmen einer parasitologischen Kotuntersuchung eine Ko-Infektion mit Kokzidien (*Cystoisospora ohioensis*) und/oder *Giardia* spp.. Der Parasitenbefall wurde durchwegs als hochgradig eingestuft.

Eine Monoinfektion mit *Cystoisospora ohioensis* wiesen vier Welpen (C-Wurf) auf. Bei einem Welpen (Nr. 12D) wurden *Giardia* spp. nachgewiesen. Ein Welpe (Nr. 4B) war sowohl mit *Cystoisospora ohionesis* als auch *Giardia* spp. infiziert.

5 Diskussion

Das Canine Bocavirus wurde in der wissenschaftlichen Literatur bis dato nur sporadisch dokumentiert (Bodewes et al., 2014; Canuti et al., 2022a, 2022b; Kapoor et al., 2012; Li et al., 2013; Piewbang et al., 2021, 2018; Zhai et al., 2017). Vor allem im Zusammenhang mit einer Bestandsproblematik existieren bisher lediglich wenige Übersichtsarbeiten (Bodewes et al. 2014). Darüber hinaus wurde bis dato in den vorhandenen Publikationen keine einheitliche bzw. eine missverständliche taxonomische Zuordnung des Virus durchgeführt. So wird CnMV, zugehörig zur Spezies des „Carnivore Bocaparvovirus 1“, in diversen Publikationen als CBoV-1 bezeichnet. Zudem sind die von Kapoor et al. (2012) generierten und klar von CnMV zu unterscheidenden Bocavirussequenzen in der National Center of Biotechnology Information (NCBI) Genbank unter der Bezeichnung „Canine Bocavirus 1“ publiziert, obwohl dieses Virus in anderen Arbeiten (z.B.: Piewang et al., 2018) als CBoV-2 bezeichnet wird. Niu et al. (2019) führen in der Einleitung wiederum CBoV-2-Viren überhaupt nicht an und unterscheiden bei den Bocaparvoviren des Hundes lediglich zwischen CnMV, CBoV-1 und CBoV-3. Glaubt man den Einträgen des NCBI Taxonomy Browsers (Stand Jänner 2023), so findet sich das CBoV-1 unter der Spezies Carnivore Bocaparvovirus 2 und CBoV-2 und CBoV-3 unter den nicht klassifizierten Bocaparvoviren. Parallel zu den PCR-Ergebnissen, die im Rahmen dieser Diplomarbeit generiert wurden, zeigten Sequenzanalysen (Daten werden im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt), dass auch innerhalb des Militärhundebestandes unterschiedliche CBoVs zirkulieren, die sich deutlich von CnMV- sowie von CBoV-3-Sequenzen abgrenzen lassen und Ähnlichkeiten sowohl mit CBoV-2 als auch CBoV-1-Sequenzen aus der Genbank aufweisen. Es darf daher spekuliert werden, dass es sich bei den beiden Viren um Vertreter einer Spezies handelt, die - irrtümlich oder aus historischen Gründen - unterschiedlich bezeichnet wurden. Alles in Allem zeigen sich die am Institut für Virologie bisher nachgewiesenen CBoV-2-Sequenzen mit unter sehr heterogen, was auch die Notwendigkeit und Sinnhaftigkeit der Verwendung mehrerer Primer-Paare zur Absicherung fraglicher PCR-Ergebnisse erklärt.

Zudem konnten in Bezug auf Canine Bocaviren die Koch‘schen Postulate aufgrund fehlender *in vivo* und *in vitro* Versuche bisher nicht erfüllt werden. Aus diesem Grund können klinische Symptome bzw. pathohistologische Veränderungen, die zwar im Zusammenhang mit CBoV-2 vermutet oder beobachtet werden, nicht sicher als ursächlich für die vorliegenden klinischen Manifestationen angenommen werden. Es wird davon ausgegangen, dass das CBoV-2 opportunistisch und/oder synergistisch mit anderen Pathogenen agiert (Kapoor et al., 2012).

Prospektive Datenerhebung

Im prospektiven Anteil der vorliegenden Studie wurde im Rahmen der ersten Untersuchung CBoV-2 mit einer Häufigkeit von 31 % im Bestand nachgewiesen. Bei der zweiten Untersuchung waren lediglich 2 % der Hunde positiv. Bei den getesteten Hunden waren entweder der Rachen- (n = 7) oder der Rektalabstrich (n = 6) positiv, aber in keinem Fall waren beide Abstriche bei einem Hund positiv. Dies könnte damit begründet werden, dass die im Rachenabstrich positiven Hunde das Virus oro-fäkal oder oral per kontaminierte Oberflächen aufgenommen haben könnten. Eine weitere Theorie für den molekularbiologischen Nachweis von CBoV im Rachen wäre ein Tropismus des Virus zu den Tonsillen, jedoch fehlen diesbezüglich, und auch in Bezug auf die Pathogenese und den Replikationsmechanismus wissenschaftliche Studien. Ein Hinweis für diese Theorie liefern Studien über den Nachweis von HBoV in den Tonsillen (Clément et al., 2009). Darüber hinaus handelte es sich um klinische unauffällige Tiere, die vermutlich eine geringere Viruslast hatten als klinisch erkrankte Individuen. Dies kann allerdings aufgrund des Fehlens einer qPCR mit absoluter Quantifizierung nicht bestätigt werden. Da Bocaviren derselben Familie wie CPV-2 angehören, könnte die Eigenschaften des CPV-2 [erhöhte Tenazität in der Umwelt und Relevanz der indirekten Übertragungswege (Tuteja et al., 2022)] auf CBoV-2 übertragbar sein. Spezifische Studien in Bezug auf eine erhöhte Umweltresistenz existieren zu CBoV-2 derzeit nicht, was nicht zuletzt dem Mangel eines funktionierenden Zellkultursystems geschuldet ist.

Insgesamt zeigte nur einer der Hunde (Nr. 27) der prospektiven Studie klinische Symptome (milde Diarrhö) am Tag der ersten Probenentnahme. Dieser wurde lediglich im Rachenabstrich positiv befundet, im Rahmen der zweiten Beprobung jedoch negativ getestet. Dieser Hund (auch Proband des retrospektiven Teils der Studie; Nr. 10z) wies bereits im Jahr 2020 persistierende Läsionen an der Zunge bzw. der Maulschleimhaut auf, woraus wiederholt CBoV-2 per PCR nachgewiesen werden konnte. Anzumerken ist, dass nur dieser Welpe Veränderungen der Schleimhaut der Mundhöhle aufwies, im Gegensatz zu den restlichen zwölf Hunden. Möglicherweise könnte es sich bei diesem Hund um einen persistierenden CBoV-2 Träger handeln. Dies kann jedoch aufgrund fehlender Datenlage nicht sicher beantwortet werden.

Der deutliche Unterschied in Bezug auf die Häufigkeit des Virusnachweises an den beiden Untersuchungstagen könnte durch das in der Zwischenzeit neu etablierte Hygienemanagement im Militärhundezentrum begründet werden. Nach den vorangegangen Welpenverlusten wurde, gemeinsam mit dem Hygienebeauftragten der Kleintierklinik der

VUW, ein neues Hygienekonzept erstellt, welches im Früh-Sommer 2021 umgesetzt wurde. Seither werden die Welpen und deren Muttertiere in neu gebauten Zwingern strikt von den anderen Hunden des Bestandes getrennt. Neben einer Erstellung eines Schwarz-Weiß Bereichs in den neuen Zwingern wurden auch die Oberflächenmaterialien der Räumlichkeiten angepasst, um eine optimale und effiziente Desinfektion zu gewährleisten. Zusätzlich wurde eine Aufklärung bzw. Schulung der Mitarbeiter/-innen zur Optimierung des Hygienemanagements durch die Tierärzte des Bundesheeres durchgeführt und damit vermutlich eine Sensibilisierung der Mitarbeiter/-innen für diese Thematik im Bestand erreicht. Seit der Etablierung des neuen Hygienekonzepts konnten keine weiteren Todesfälle bei Welpen beobachtet werden. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass hier ein Zusammenhang mit den erhöhten Hygienestandards besteht. Eine andere Erklärung der unterschiedlichen Häufigkeitsrate könnte das Virus selbst sein. Hier könnte die Häufigkeit des Vorkommens möglicherweise saisonal abhängig sein. Ein Beispiel für eine Jahreszeiten-abhängige Prävalenz viraler Erkrankungen wäre CPV-2 (Hochphasen Mai–Juni) (Horecka et al., 2020). Auch bei HBoV wird über ein saisonales Vorkommen diskutiert (Clément et al., 2009). Hinweise hierzu über CBoV-2 selbst fehlen in der Literatur gänzlich.

Insgesamt wurden sechs (vier im ersten Untersuchungsgang, zwei im zweiten Untersuchungsgang) beprobte Hunde als fraglich positiv befundet. Die fraglichen PCR-Ergebnisse können mit der Heterogenität der Sequenz des im Bestandes zirkulierendem CBoV erklärt werden.

Die Ergebnisse der Kontrollgruppe (n = 20) fielen durchwegs negativ aus. Als limitierend muss jedoch die geringe Anzahl an untersuchten Hunden angeführt werden. Dennoch kann aufgrund der zahlreichen positiv getesteten Hunde im Militärhundebestand angenommen werden, dass in diesem ein erhöhter Infektionsdruck herrscht, da viele Hunde auf engem Raum gehalten werden. Anzumerken ist jedoch, dass es z.T. unterschiedliche Probenmaterialien untersucht wurden. Um die Tiere der Kontrollgruppe und deren Tierhalter keinem unnötigen Stress auszusetzen bzw. potenzielle Verletzungen bei der Probenentnahme zu vermeiden, wurde auf eine Beprobung des Rachenraumes - wie sie für die Hunde des Bestandes stattgefunden hat (Rachen- und Rektalabstrich) – verzichtet. Es wurden lediglich Tupferproben des frisch abgesetzten Kotes entnommen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Tierbesitzer/-innen instruiert, wie eine adäquate Tupferprobe des frisch abgesetzten Kotes ihrer Tiere entnehmen werden sollte.

Retrospektive Datenerhebung

Bei den retrospektiven Fällen erfolgte eine rein deskriptive Datenaufarbeitung. Auf eine genauere Beschreibung der Krankheitsverläufe, der Therapie etc. wurde verzichtet, da eine Vergleichbarkeit anhand der Inhomogenität der Daten nicht gegeben war. Auch wurden zum Teil Hundewelpen inkludiert, die einen negativen CBoV-2 Befund aufwiesen. Aufgrund der Ähnlichkeit der gezeigten Symptome bzw. der jeweiligen Wurfzugehörigkeit wurden diese dennoch in dieser Studie miteinbezogen, da ein falsch-negatives Ergebnis seitens der virologischen Nachweismethoden nicht ausgeschlossen werden kann.

Molekularbiologischer Nachweis (PCR)

Bei dem D-Wurf (Nr. 11D – 13D) wurden alle drei Welpen per PCR positiv auf CBoV-2 getestet. Bei jeweils zwei Wurfgeschwistern (Nr. 1A und 2A; Nr. 4B und 5B) in anderen Würfen wurde ein Tier positiv und das andere negativ getestet, obwohl hier ein sehr ähnliches Krankheitsbild vorlag und auch beide Welpen verstarben. Hierbei könnte dennoch davon ausgegangen werden, dass die negativ getesteten Hunde nur zu diesem Zeitpunkt keine Virusausscheidung zeigten. Während im Kottupfer des Welpen Nr. 1A CBoV-2-spezifische Nukleinsäure nachgewiesen werden konnte, gelang dies bei Nr. 2A nicht. Lediglich im pathologischen Befund des Welpen Nr. 2A wurde beschrieben, dass im Rahmen einer Elektronenmikroskopischen Untersuchung des Darmes zahlreiche Viruspartikel nachgewiesen werden konnten, die eine typische Morphologie von Parvoviren aufwiesen. Dieser Nachweis in Kombination mit dem Ausschluss einer CPV-2 Infektion legen nahe, dass auch Hund Nr. 2A mit CBoV-2 infiziert war.

Im Rahmen einer virologischen Untersuchung konnte bei dem verstorbenen Hundewelpe Nr. 11D in verschiedenen Organen (Milz, Niere, Leber, Haut, Gehirn, Lunge und Dünndarm) CBoV mittels PCR gesondert nachgewiesen werden. Im Rahmen der histologischen Untersuchung wurden an der Leber multifokale Mikroabszesse aufgefunden und eine Karyorrhexis zahlreicher follikulärer Lymphozyten in der Milz. Die Niere, die Lunge, der Dünndarm und das Gehirn wiesen trotz der positiven CBoV-2-PCR keine histologischen Auffälligkeiten auf. Das Auffinden der Virus-Nukleinsäure in diesen Organen könnte durch eine vorangegangene Virämie erklärt werden. Auch in der Literatur wird der Nachweis von CBoV-2 in z.B. der Leber (ohne pathohistologische Veränderungen) oder dem Gehirn dokumentiert (Li et al., 2013; Piewbang et al., 2021).

Die Welpen des C-Wurfes (Nr. 6C - 9C) zeigten zwar Symptome (Vomitus, Diarrhö, Hautläsionen), die mit einer klinisch manifesten CBoV-2-Infektion in Zusammenhang gebracht werden könnten, wurden jedoch durchwegs negativ auf CBoV-2 getestet. Der gesamte C-Wurf galt nach kurzer Krankheitsdauer als genesen und wies keine Rezidive der klinischen Symptome auf. Eine Theorie für die negative Befundung könnte eventuell eine geringe Viruslast sein, die u.U. einen Einfluss auf den Outcome der Erkrankung haben kann. Publikationen hierzu existieren leider nicht. Die Etablierung einer qPCR an der VUW könnte in Zukunft helfen, eventuell auch Hunde mit einer geringen Viruslast zu detektieren.

Klinische Symptome

Die in der Literatur beschriebenen Symptome (Diarrhö, Vomitus, respiratorische und neurologische Auffälligkeiten) konnten auch bei den Hunden in den retrospektiv aufgearbeiteten Fällen des Militärhundebestandes gezeigt werden. Darüber hinaus wiesen alle in dieser Studie inkludierten erkrankten Welpen miteinander vergleichbare Hautveränderungen in Form von Bläschen, Papeln und Pusteln auf, die meist an spezifischen Körperregionen (v.a. Innenseite der Ohrmuscheln und Bauchunterseite) zu beobachten waren. Derartige Hautläsionen wurden bisher nicht im Zusammenhang mit einer CBoV-2 Infektion beim Hund beschrieben. Es existieren lediglich zwei Publikationen über HBoV positive Kinder mit möglichen HBoV-assoziierten Hautläsionen. Die Hautläsionen äußerten sich als makulopapuläre Erytheme auf der Brust und makuläre Erytheme im Gesicht sowie bei einem Kind in Form eines Exanthema subitum (Hautläsionen v.a. am Rumpf) (Arnold et al., 2006; Pierangeli et al., 2008). Auch über CPV-2 existieren einzelne Fallbeschreibungen, in denen die betroffenen Welpen durchaus vergleichbare Hautläsionen (Ulzera an Zehenballen und an der Zunge , Mund- und Vaginalschleimhaut, abdominale und perivulväre Erytheme, Bläschen in der Maulhöhle sowie disseminierte Erytheme und Alopezie am ganzen Körper) aufwiesen (Favrot et al., 2000; Woldemeskel et al., 2011). Während die in dieser Studie beschriebenen Hautläsionen klinisch von denen, die mit HBoV assoziiert wurden, abwichen, gibt es bei durch CPV-2 hervorgerufenen Hautläsionen gewisse Übereinstimmungen mit der Lokalisation und der Art der dermatologischen Manifestationen. So zeigten sich, wie bereits im vorherigen Absatz erwähnt, bei CPV-2 Mund- und Vaginalschleimhaut von Erythemen und Bläschen betroffen – Areale die sich auch bei den vermuteten CBoV assoziierten Hautveränderungen betroffen zeigten.

Limitierend für die vorliegende Studie ist die Anzahl an getesteten Hautproben der Welpen, um die Hautläsionen in tatsächlichen Zusammenhang mit einer CBoV Infektion zu bringen. Es

wurde lediglich von drei Hunden (Nr. 10z, 11D, 13D) Schleimhaut- bzw. Hautmaterial einer konventionellen PCR auf CBoV unterzogen und bei einem zusätzlichen Hund Hautmaterial gepoolt mit Darmgewebe (Nr. 12D) mittels einer PCR untersucht. Alle vier Ergebnisse lieferten zwar ein positives PCR-Ergebnis, können aber u.a. aufgrund der unzureichenden Untersuchung auf andere mögliche Ursachen nicht mit Sicherheit in einem unmittelbaren Zusammenhang mit CBoV-2 gebracht werden. Allerdings wurde bei zwei der o.a. Hunde (Nr. 10z und 11D) zusätzlich CHV-1 mittels PCR ausgeschlossen. CHV-1 stellt in Bezug auf die Hautveränderungen eine der wichtigsten Differentialdiagnosen dar, daher kann zumindest bei diesen zwei Hunden mit großer Wahrscheinlichkeit von einer möglichen CBoV-2-assoziierten dermatologischen Manifestation ausgegangen werden. Ein weiterer CBoV-2 positiver Welpe (Nr. 4B; PCR aus Kotabstrich positiv) wurde im Rahmen einer serologischen Untersuchung (IFAT) negativ auf CHV-1 getestet.

Dennoch liefern die einheitlich betroffenen Hautareale sowie die Art der Hautläsionen der 13 Welpen einen starken Hinweis dafür, dass CBoV-2 als ursächliches Agens angenommen werden kann. Die Etablierung weiterer diagnostischer Nachweisverfahren (wie z.B. einer Immunhistochemie) wäre für weitere Bestätigungen einer möglichen CBoV-2-assoziierten dermalen Ausprägung unerlässlich.

Blutparameter

Die initialen Blutbefunde von insgesamt sechs Hundewelpen der retrospektiven Studie wurden in die Diplomarbeit inkludiert. Von diesen sechs Hunden waren insgesamt fünf CBoV-2 positiv (3y, 4B, 11D, 12D, 13D). Bei dem Hundewelpe Nr. 8C konnte zwar kein CBoV-2 per PCR nachgewiesen werden, er wurde aber dennoch aufgrund der gezeigten charakteristischen Symptome und der negativen CPV-2 PCR in diese Studie inkludiert. Alle sechs Hunde wiesen eine ggr. bis mgr. Anämie auf, die wahrscheinlich mit dem geringen Alter der Hunde (Welpen) im Zusammenhang steht. Interessanterweise konnte bei fünf Welpen eine milde bis moderate Leukozytose nachgewiesen werden. Im Differentialblutbild konnte bei allen acht Welpen eine Monozytose und bei fünf von sechs Welpen eine Neutrophilie beobachtet werden, das im auffallenden Gegensatz zu einer Infektion mit CPV-2 steht, die in der Regel durch eine sehr ausgeprägte Neutropenie gekennzeichnet ist (Sato-Takada et al., 2022).

Bei der Hälfte der Hundewelpen konnte eine Eosinophilie nachgewiesen werden, wobei nur bei einem Welpen im Rahmen der parasitologischen Kotuntersuchung *Cystoisospora*

ohioensis und *Giardia* spp. detektiert werden konnte, die als mögliche Ursache mit einer Eosinophilie in Zusammenhang gebracht werden könnte.

In den Blutchemie Parametern zeigte sich beispielweise bei vier Welpen (Nr. 3y, 4B, 11D und 13D) eine (stressinduzierte) Hyperglykämie, bei allen fünf Welpen eine Hypoproteinämie und zusätzlich bei drei Welpen (Nr. 3y, 11D, 12D) eine Hypalbuminämie (beide erniedrigten Parameter wahrscheinlich Diarrhö assoziiert) sowie bei zwei Welpen (Nr. 4B und 11D) eine erhöhte Alkalische Phosphatase (Wachstums bedingt).

Aufgrund der geringen Anzahl der Hunde mit vorhandenen Blutbefunden ist die Aussagekraft grundsätzlich limitierend und daher kann wegen der fehlenden klinischen Datenlage kein Vergleich zu anderen Studien gezogen werden. Auch inwiefern CBoV ursächlich für die hier beschriebenen Blutbild-Veränderungen der Welpen sein könnte oder doch eine bakterielle Sekundärinfektion ausschlaggebend war, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht ansatzweise zufriedenstellend beantworten.

Differentialdiagnostik

Eine weitere Limitation für diese Studie stellt das Vorgehen der Diagnostik zum Ausschluss von differentialdiagnostisch relevanten viralen Gastroenteritiden dar. Die durchgeführten Testungen verliefen zwar negativ, es fand aber kein einheitliches Testregime bei den 13 Welpen statt. Beispielweise wurde CPV-2 weitgehend (8/13) mittels unterschiedlicher Verfahren (Antigen Schnelltest, PCR) ausgeschlossen, jedoch fehlen bei insgesamt vier Welpen jegliche Daten. Auch wurden keine Testungen zum Ausschluss des Caninen Adenovirus vorgenommen, auch wenn es keine Hinweise darauf im Zuge der pathohistologischen Untersuchungen (u.a. Einschlusskörperchen) gab. Auch eine PCR zum Nachweis von CECoV wurde bei lediglich bei zwei der 13 Welpen durchgeführt. Wie bereits in der Diskussion über die gezeigten dermatologischen Veränderungen erwähnt, wurde auch in Bezug auf epitheliotrope Viren kein einheitliches Testschema vorgenommen. Hier wäre es sinnvoll in Zukunft bei passender Symptomatik eine einheitliche Diagnostik bei betroffenen Hundewelpen des Bestandes vorzunehmen.

Pathologie

Pathohistologisch zeigte keiner der Hunde mit vorliegendem Pathologiebefund Ähnlichkeiten zu einer Parvovirus-Enteritis auf [z.B. Nekrosen des Kryptenepithels, verkürzte und atrophierte Zotten (Tuteja et al., 2022)].

Abschließend lässt sich sagen, dass in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass in einer Hundepopulation eines konkreten Bestandes, bis zu einem Drittel der Hunde positiv auf CBoV-2 getestet werden konnte. Ein Teil dieser Hunde war auch klinisch erkrankt. Inwieweit CBoV-2 ursächlich für die gezeigten klinischen Symptome oder synergistisch mit z.B. bakteriellen/parasitären Gastroenteritiden war, lässt sich nicht sicher beantworten. Im Hinblick auf die Frage, ob eine CBoV-2 Infektion bestandsgefährdend für Jungtiere sein kann, sind weitere Studien jedoch unerlässlich. Bei Auftreten von charakteristischen, mit CBoV-2-assoziierten Symptomen (v.a. bei Welpen oder Junghunden), sollte CBoV-2 unbedingt differentialdiagnostisch berücksichtigt werden. Bei einer Bestätigung durch einen positiven CBoV-2 Befund könnte zudem – an eine Evaluierung und Anpassung der Hygienestandards gedacht werden, da zumindest in dem beschriebenen Hundebestand nach adäquater Anpassung des Hygienemanagements bis dato ein Ausbleiben von erkrankten Welpen beobachtet werden konnte. Weiterführend wäre auch die Etablierung eines Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern gegen CBoV-2 sinnvoll, denn dieses könnte wichtige Hinweise bzgl. der Prävalenz in einer Hundepopulation liefern. Auch die Validierung einer qPCR würde bei der Interpretation der Relevanz eines Erregernachweises hilfreich sein.

Trotz zahlreicher Limitationen kann diese Studie einen Einblick über ein wenig dokumentiertes Virus und dessen mögliche klinische Manifestationen sowie der Rolle im Rahmen einer Bestandsproblematik geben.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Überblick über einen Hundebestand mit rezidivierenden Canine Bocavirus 2 (CBoV-2) -Infektionen zu geben. Im prospektiven Teil dieser Arbeit wird mittels konventioneller PCR die Häufigkeit von CBoV-2 in einem Militärhundebestand ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine retrospektive Aufarbeitung klinisch erkrankter Hunde dieses Bestandes.

Zur Ermittlung der Häufigkeit des Auftretens von CBoV-2 wurden alle anwesenden Hunde des Bestandes an zwei Zeitpunkten (im Juni und August 2021) beprobt. Dazu wurden jeweils Rachen- als auch Rektalabstriche der adulten Hunde des Bestandes entnommen. Zu beiden Zeitpunkten gab es auch Welpen am Gelände, diese wurden aus hygienischen Gründen nicht beprobt, um das Infektionsrisiko möglichst gering zu halten. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe (n = 20) aus klinisch unauffälligen Privathunden verschiedenster Rassen und unterschiedlichen Alters beprobt. Insgesamt wurden 190 Proben entnommen und mittels Screening PCR auf das Vorhandensein von CBoV-2-spezifischer Nukleinsäure untersucht. Neben des für die Routinediagnostik verwendeten Primerpaares wurden auch zwei weitere Primer-Paare zur Verifizierung fraglicher Ergebnisse verwendet.

Bei der retrospektiven Aufarbeitung wurden insgesamt 13 Welpen des oben genannten Bestandes, die im Zeitraum zwischen 2015 und 2021 klinisch erkrankten, mit einbezogen. Hier wurde zusätzlich eine deskriptive Aufarbeitung der Fälle (Klinische Symptomatik, Blutlaboruntersuchungen, Ausschluss anderer relevanter viraler Differentialdiagnosen, Outcome und fallweise Pathologiebefund) durchgeführt.

Am ersten Untersuchungszeitpunkt wurde bei 31 % (12/39) der untersuchten Hunde der prospektiven Studie CBoV-2 nachgewiesen. Bei der zweiten Untersuchung wurden 2 % (1/47) positiv getestet. Bei allen Hunden der Kontrollgruppe (n = 20) verlief die PCR Untersuchung auf CBoV-2 negativ.

Bei der Aufarbeitung der 13 retrospektiven Fälle wurden insgesamt sechs Tiere nachweislich per konventioneller PCR auf CBoV-2 positiv getestet. Klinisch wiesen alle Welpen Hautveränderungen in Form von Bläschen, Papeln oder Pusteln an durchaus vergleichbaren Hautregionen auf. Weitere Symptome umfassten Diarrhö (83 %), Vomitus (77 %) sowie respiratorische (15 %) und neurologische (8 %) Symptome. Insgesamt verstarben acht der 13 Welpen (fünf der positiv und drei der negativ getesteten Tiere).

7 Summary

Aim of this work was to provide an overview of a dog population with recurrent Canine Bocavirus infections. Additionally, to the prospective part of this study that covers the determination of the prevalence of CBoV-2 in the entire stock using conventional PCR, the work also includes a retrospective workup of medical histories of clinically ill dogs from the same stock.

In the prospective part of the survey, all dogs of the stock were sampled at two points in time (June and August 2021). For this purpose, throat and rectal swabs were taken from the adult dogs of this population. At both times, puppies were also present but were not sampled for hygienic reasons in order to keep the risk of infection as low as possible. In addition, a control group (n = 20) of clinically healthy privately owned dogs of various breeds and different ages were sampled.

A total of 190 samples were taken and tested for the presence of CBoV-2 specific nucleic acid using screening PCR. In addition to the primers used for routine diagnostics, two other primer pairs were used to verify any questionable result.

The retrospective review covers a total of 13 puppies from the same stock that showed clinical signs between 2015 and 2021. Workup of the medical history of these cases (clinical signs, blood laboratory parameters, exclusion of other relevant viral differential diagnoses, outcome and case-by-case pathology findings) was investigated descriptively only.

At the time of the first examination within the prospective part of the survey, CBoV-2 was detected in 31 % (12/39) of the dogs. At the second examination, 2 % (1/47) tested positive. All PCR testing in the control group (n = 20) was negative.

The workup of the 13 retrospective cases revealed a total of six animals tested positive for CBoV-2 via screening PCR. All puppies suffered from skin lesions (papules, vesicles or pustules). Other signs included diarrhea (83 %), vomiting (77 %), and respiratory (15 %) as well as neurological (8 %) abnormalities. A total of eight of the 13 puppies died (five of the positive and three of the negatively tested animals).

8 Literaturverzeichnis

Akturk, H., Sık, G., Salman, N., Sutcu, M., Tatli, B., Ciblak, M.A., Erol, O.B., Torun, S.H., Citak, A., Somer, A., 2015. Atypical presentation of human bocavirus: Severe respiratory tract infection complicated with encephalopathy. J Med Virol 87, 1831–1838. https://doi.org/10.1002/jmv.24263

Al Bishawi, A., Ben Abid, F., Ibrahim, W., 2021. Bocavirus Infection in a Young Pregnant Woman: A Case Report and Literature Review. Am J Case Rep 22, e928099. https://doi.org/10.12659/AJCR.928099

Allison, A.B., Kohler, D.J., Fox, K.A., Brown, J.D., Gerhold, R.W., Shearn-Bochsler, V.I., Dubovi, E.J., Parrish, C.R., Holmes, E.C., 2013. Frequent Cross-Species Transmission of Parvoviruses among Diverse Carnivore Hosts. J Virol 87, 2342–2347. https://doi.org/10.1128/JVI.02428-12

Arnold, J.C., Singh, K.K., Spector, S.A., Sawyer, M.H., 2006. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. Clin Infect Dis 43, 283–288. https://doi.org/10.1086/505399

Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A., Kajima, M., 1970. Recovery and characterization of a minute virus of canines. Infect Immun 1, 503–508. https://doi.org/10.1128/iai.1.5.503-508.1970

Bodewes, R., Lapp, S., Hahn, K., Habierski, A., Förster, C., König, M., Wohlsein, P., Osterhaus, A.D.M.E., Baumgärtner, W., 2014. Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. Vet Microbiol 174, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.025

Canuti, M., Fry, K., Cluff, H.D., Mira, F., Fenton, H., Lang, A.S., 2022a. Co-circulation of five species of dog parvoviruses and canine adenovirus type 1 among gray wolves (Canis lupus) in northern Canada. Transbound Emerg Dis. https://doi.org/10.1111/tbed.14474

Canuti, M., Mira, F., Sorensen, R.G., Rodrigues, B., Bouchard, É., Walzthoni, N., Hopson, M., Gilroy, C., Whitney, H.G., Lang, A.S., 2022b. Distribution and diversity of dog parvoviruses in wild, free-roaming and domestic canids of Newfoundland and Labrador, Canada. Transbound Emerg Dis. https://doi.org/10.1111/tbed.14620

Carrino, M., Tassoni, L., Campalto, M., Cavicchio, L., Mion, M., Corrò, M., Natale, A., Beato, M.S., 2022. Molecular Investigation of Recent Canine Parvovirus-2 (CPV-2) in Italy Revealed Distinct Clustering. Viruses 14, 917. https://doi.org/10.3390/v14050917

Clément, N., Battaglioli, G., Jensen, R.L., Schnepp, B.C., Johnson, P.R., St. George, K., Linden, R.M., 2009. Prevalence of Human Bocavirus in Human Tonsils and Adenoids. Emerg Infect Dis 15, 1149–1150. https://doi.org/10.3201/eid1507.090102

Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family Parvoviridae. Arch Virol 159, 1239–1247. https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1

Deng, X., Yan, Z., Cheng, F., Engelhardt, J.F., Qiu, J., 2016. Replication of an Autonomous Human Parvovirus in Non-dividing Human Airway Epithelium Is Facilitated through the DNA Damage and Repair Pathways. PLoS Pathog 12, e1005399. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005399

DVG-Desinfektionsmittelliste für den Tierhaltungsbereich https://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=2150 (Zugriff 03.08.2022)

Ergul, A.B., Altug, U., Aydin, K., Guven, A.S., Altuner Torun, Y., 2017. Acute necrotizing encephalopathy causing human bocavirus. Neuroradiol J 30, 164–167. https://doi.org/10.1177/1971400916687586

Favrot, C., Olivry, T., Dunston, S.M., Degorce-Rubiales, F., Guy, J.S., 2000. Parvovirus infection of keratinocytes as a cause of canine erythema multiforme. Vet Pathol 37, 647–649. https://doi.org/10.1354/vp.37-6-647

Greene, C.E. (Ed.), 2012. Infectious diseases of the dog and cat, 4th ed. ed. Elsevier/Saunders, St. Louis, Mo.

Horecka, K., Porter, S., Amirian, E.S., Jefferson, E., 2020. A Decade of Treatment of Canine Parvovirus in an Animal Shelter: A Retrospective Study. Animals (Basel) 10, 939. https://doi.org/10.3390/ani10060939

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses https://ictv.global/taxonomy (Zugriff 10.09.2022)

Kapoor, A., Mehta, N., Dubovi, E.J., Simmonds, P., Govindasamy, L., Medina, J.L., Street, C., Shields, S., Lipkin, W.I., 2012. Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease. J Gen Virol 93, 341–346. https://doi.org/10.1099/vir.0.036624-0

Kapoor, A., Slikas, E., Simmonds, P., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Alam, M.M., Sharif, S., Angez, M., Zaidi, S., Delwart, E., 2009. A newly identified bocavirus species in human stool. J Infect Dis 199, 196–200. https://doi.org/10.1086/595831

Li, L., Pesavento, P.A., Leutenegger, C.M., Estrada, M., Coffey, L.L., Naccache, S.N., Samayoa, E., Chiu, C., Qiu, J., Wang, C., Deng, X., Delwart, E., 2013. A novel bocavirus in canine liver. Virol J 10, 54. https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-54

Manteufel, J., Truyen, U., 2008. Animal bocaviruses: a brief review. Intervirology 51, 328–334. https://doi.org/10.1159/000173734

Niu, J., Yi, S., Wang, H., Dong, G., Zhao, Y., Guo, Y., Dong, H., Wang, K., Hu, G., 2019. Complete genome sequence analysis of canine bocavirus 1 identified for the first time in domestic cats. Arch Virol 164, 601–605. https://doi.org/10.1007/s00705-018-4096-z

Pfankuche, V.M., Bodewes, R., Hahn, K., Puff, C., Beineke, A., Habierski, A., Osterhaus, A.D.M.E., Baumgärtner, W., 2016. Porcine Bocavirus Infection Associated with Encephalomyelitis in a Pig, Germany1. Emerg Infect Dis 22, 1310–1312. https://doi.org/10.3201/eid2207.152049

Pierangeli, A., Scagnolari, C., Trombetti, S., Grossi, R., Battaglia, M., Moretti, C., Midulla, F., Antonelli, G., 2008. Human bocavirus infection in hospitalized children in Italy. Influenza Other Respir Viruses 2, 175–179. https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00057.x

Piewbang, C., Jo, W.K., Puff, C., Ludlow, M., van der Vries, E., Banlunara, W., Rungsipipat, A., Kruppa, J., Jung, K., Techangamsuwan, S., Baumgärtner, W., Osterhaus, A.D.M.E., 2018. Canine Bocavirus Type 2 Infection Associated With Intestinal Lesions. Vet Pathol 55, 434–441. https://doi.org/10.1177/0300985818755253

Piewbang, C., Wardhani, S.W., Dankaona, W., Lacharoje, S., Chai-In, P., Yostawonkul, J., Chanseanroj, J., Boonrungsiman, S., Kasantikul, T., Poovorawan, Y.,

Techangamsuwan, S., 2021. Canine bocavirus-2 infection and its possible association with encephalopathy in domestic dogs. PLoS One 16, e0255425. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255425

Polo, D., Lema, A., Gándara, E., Romalde, J.L., 2021. Prevalence of human bocavirus infections in Europe. A systematic review and meta-analysis. Transbound Emerg Dis. https://doi.org/10.1111/tbed.14233

Qiu, J., Söderlund-Venermo, M., Young, N.S., 2017. Human Parvoviruses. Clin Microbiol Rev 30, 43–113. https://doi.org/10.1128/CMR.00040-16

Sato-Takada, K., Flemming, A.M., Voordouw, M.J., Carr, A.P., 2022. Parvovirus enteritis and other risk factors associated with persistent gastrointestinal signs in dogs later in life: a retrospective cohort study. BMC Vet Res 18, 96. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03187-7

Schildgen, O., Qiu, J., Söderlund-Venermo, M., 2012. Genomic features of the human bocaviruses. Future Virol 7, 31–39. https://doi.org/10.2217/fvl.11.136

Schildgen, O., Schildgen, V., 2018. The Role of the Human Bocavirus (HBoV) in Respiratory Infections. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology 281–301. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95111-9_12

Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 379–384. https://doi.org/10.1073/pnas.0406765102

Silverstein, D., Hopper, K., 2015. Small Animal Critical Care Medicine, 2nd ed. ed. Elsevier.

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1507401 (Zugriff 25.01.2023)

Tuteja, D., Banu, K., Mondal, B., 2022. Canine parvovirology – A brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 82, 101765. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101765

Venn, E.C., Preisner, K., Boscan, P.L., Twedt, D.C., Sullivan, L.A., 2017. Evaluation of an outpatient protocol in the treatment of canine parvoviral enteritis. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 27, 52–65. https://doi.org/10.1111/vec.12561

Woldemeskel, M., Liggett, A., Ilha, M., Saliki, J.T., Johnson, L.P., 2011. Canine parvovirus-2b-associated erythema multiforme in a litter of English Setter dogs. J Vet Diagn Invest 23, 576–580. https://doi.org/10.1177/1040638711403429

Xiong, Y.-Q., You, F.-F., Chen, X.-J., Chen, Y.-X., Wen, Y.-Q., Chen, Q., 2019. Detection and phylogenetic analysis of porcine bocaviruses carried by murine rodents and house shrews in China. Transbound Emerg Dis 66, 259–267. https://doi.org/10.1111/tbed.13011

Zhai, S.-L., Lin, T., Chen, Y.-W., Liu, R., Lv, D.-H., Wen, X.-H., Zhu, X.-L., Wang, D., Li, F., Wei, W.-K., 2017. First complete genome sequence of canine bocavirus 2 in mainland China. New Microbes New Infect 18, 47–49. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.04.002

Zhao, H., Zhao, L., Sun, Y., Qian, Y., Liu, L., Jia, L., Zhang, Y., Dong, H., 2012. Detection of a Bocavirus Circular Genome in Fecal Specimens from Children with Acute Diarrhea in Beijing, China. PLoS One 7, e48980. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048980

9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 GESAMTÜBERSICHT DER BEPROBTEN TIERE DES MILITÄRHUNDEZENTRUMS 18
TABELLE 2 GESAMTÜBERSICHT DER KONTROLLGRUPPE 21
TABELLE 3 REAKTIONSGEMISCH INKL. MENGENANGABEN FÜR EINE PCR-REAKTION 26
TABELLE 4 DIE FÜR DIE PCR-AMPLIFIKATION VERWENDETEN PRIMER PAARE 26
TABELLE 5 THERMOZYKLISCHE BEDINGUNGEN DER PRIMER CBOV-1563-F/1782-R 27
TABELLE 6 THERMOZYKLISCHE BEDINGUNGEN DER PRIMER CBOV-926-F/1993-R 27
TABELLE 7 THERMOZYKLISCHE BEDINGUNGEN DER PRIMER CBOV-1563-F/1925-R 27
TABELLE 8 HUNDE DES ERSTEN PROBENDURCHGANGES (JUNI 2021) MIT POSITIVEN CBOV PCR-RESULTATEN 29
TABELLE 9 HUNDE DES ZWEITEN PROBENDURCHGANGES (AUGUST 2021) MIT POSITIVEN CBOV PCR-RESULTATEN 30
TABELLE 10 GESAMTÜBERSICHT DER RETROSPEKTIVEN FÄLLE 32
TABELLE 11 GESAMTÜBERSICHT DER SYMPTOME 33
TABELLE 12 ERGEBNISSE DER HÄMATOLOGISCHEN BLUTUNTERSUCHUNG 41
TABELLE 13 ERGEBNISSE DER BLUTCHEMISCHEN UNTERSUCHUNG 42
TABELLE 14 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUM AUSSCHLUSS DIFFERENTIALDIAGNOSTISCH RELEVANTER VIREN IM RAHMEN DER RETROSPEKTIVEN STUDIE 44
TABELLE 15 PATHOLOGISCHE END-BEFUNDE 46

10 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BEIDSEITIGE LÄSION AN DER ZUNGE (WELPE NR. 10; PFEIL MARKIERUNG DER ZUNGENLÄSION) 36
ABBILDUNG 2: PERSISTIERENDE LÄSION AM HINTEREN DRITTEL DER ZUNGE (WELPE NR. 10; PFEIL MARKIERUNG DER ZUNGENLÄSION) 36
ABBILDUNG 3: PERIORALE HAUTLÄSIONEN (WELPE NR. 11D) 37
ABBILDUNG 4: PERIORALE HAUTLÄSIONEN (WELPE NR. 11D) 37
ABBILDUNG 5: HAUTLÄSIONEN AN DER INNENSEITE DER OHRMUSCHEL (WELPE NR. 11D) 38
ABBILDUNG 6: HAUTLÄSIONEN VENTRALES ABDOMEN (WELPE NR. 11D) 39