
Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.
Katrín Hartmann

Influenza A (H3N8) in der deutschen Hundepopulation - Eine Prävalenzstudie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Christina Maria Klinkenberg
aus Starnberg

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hartmann

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Korbel

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

*All meinen Lieben, die mich auf meinem Weg so geduldig und tatkräftig
unterstützt haben*

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
I. EINLEITUNG.....	8
II. LITERATURÜBERSICHT.....	9
1. INFLUENZAVIREN.....	9
1.1. Taxonomie.....	9
1.2. Morphologie.....	10
1.3. Epidemiologie.....	12
1.4. Speziesspezifität.....	15
1.5. Pathomechanismen bei Influenzavirusinfektionen.....	17
1.6. Überschreitung der Speziesbarriere.....	18
2. DAS KANINE INFLUENZAVIRUS (CIV).....	22
2.1. Pathogenese.....	24
2.2. Epidemiologie und geografische Verbreitung.....	26
2.2.1. USA.....	27
2.2.1.1. Greyhounds.....	27
2.2.1.2. Andere Hunderassen.....	31
2.2.2. Ausserhalb der USA.....	35
2.2.2.1. Australien.....	35
2.2.2.2. Europa.....	36
2.2.2.2.1. Großbritannien.....	36
2.2.2.2.2. Italien.....	38
2.3. Klinische Symptome.....	39
2.4. Diagnostik.....	40
2.4.1. Labor.....	40
2.4.2. Röntgen.....	41
2.4.3. Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit.....	41
2.4.4. Pathologische Untersuchung.....	41
2.4.5. Virusnachweis.....	44
2.4.5.1. Direkter Virusnachweis.....	45
2.4.5.1.1. Virusisolierung.....	45
2.4.5.1.2. Antigen-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.....	45
2.4.5.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion.....	46
2.4.5.2. Indirekter Virusnachweis.....	47
2.4.5.2.1. Hämagglutinationshemmtest.....	48
2.4.5.2.2. Virusneutralisationstest.....	49
2.4.5.2.3. Antikörper-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.....	49

2.4.5.2.4. Agar-Gel-Immun-Diffusionstest	50
2.4.5.2.5. Immunfluoreszenztest	50
3. ANDERE INFLUENZAVIRUSSUBTYPEN BEIM HUND.....	50
3.1. Influenza A Subtyp H3N2.....	51
3.2. Influenza A Subtyp H5N1.....	52
III. MATERIAL UND METHODEN.....	54
1. MATERIAL	54
1.1. Gesunde Hunde	54
1.1.1. Greyhounds.....	54
1.1.2. Hunde anderer Windhunderassen.....	55
1.1.3. Nicht-Windhunderassen	55
1.2. Akut respiratorisch erkrankte Hunde	55
1.3. Signalement.....	56
1.3.1. Alter	56
1.3.1.1. Gesunde Hunde	56
1.3.1.2. Kranke Hunde	56
1.3.1.3. Altersvergleich.....	57
1.3.2. Geschlecht	58
1.3.2.1. Gesunde Hunde	58
1.3.2.2. Kranke Hunde	59
1.3.3. Rasse	59
1.3.3.1. Gesunde Hunde	60
1.3.3.2. Kranke Hunde	61
1.4. Jahreszeitliche Verteilung.....	62
1.4.1. Gesunde Hunde	62
1.4.2. Kranke Hunde	63
1.5. Wohnort der Besitzer	64
1.5.1. Gesunde Hunde	64
1.5.2. Kranke Hunde	66
1.6. Anamnese.....	67
1.6.1. Anzahl der Hunde pro Haushalt.....	67
1.6.1.1. Gesunde Hunde	67
1.6.1.2. Kranke Hunde	68
1.6.2. Kontakt zu anderen Hunden	68
1.6.2.1. Gesunde Hunde.....	68
1.6.2.2. Kranke Hunde	69
1.6.3. Kontakt zu Pferden	69
1.6.3.1. Gesunde Hunde	69
1.6.3.2. Kranke Hunde	70

1.6.4.	Respiratorische Vorerkrankungen	70
	1.6.4.1. Gesunde Hunde	70
	1.6.4.2. Kranke Hunde	71
1.6.5.	Auslandsaufenthalt	71
	1.6.5.1. Gesunde Hunde	71
	1.6.5.2. Kranke Hunde	71
1.6.6.	Rennteilnahme.....	72
1.6.7.	Dauer der respiratorischen Symptome.....	73
1.6.8.	Verlauf	73
1.7.	Klinische Untersuchung.....	73
1.8.	Labordiagnostische Untersuchung.....	75
	1.8.1. Blutbild mit Differentialblutbild	75
	1.8.2. Serumchemie	76
	1.8.3. Bronchoalveoläre Lavage.....	77
	1.8.3.1. Bakteriologische Untersuchung.....	77
	1.8.3.2. Zytologische Untersuchung	78
1.9.	Bildgebende Verfahren	78
	1.9.1. Röntgen Thorax.....	78
	1.9.2. Endoskopie.....	78
2.	METHODEN	79
	2.1. Erfassung der Patientendaten	79
	2.2. Probensammlung	79
	2.2.1. Blutprobenentnahme	80
	2.2.2. Tupferprobenentnahme	80
	2.2.3. Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit	80
	2.3. Probenuntersuchung.....	81
	2.3.1. Blutbild mit Differentialblutbild	81
	2.3.2. Serumchemie	81
	2.3.3. Nachweis von Antikörpern gegen das kanine Influenzavirus	81
	2.3.3.1. Hämagglutinationshemmtest	81
	2.3.3.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.....	82
	2.3.3.3. Spezifischer Hämagglutinationshemmtest	83
	2.3.3.4. Immunfluoreszenztest	84
	2.3.4. Influenzavirus-Polymerase-Ketten-Reaktion	84
	2.3.5. Bildgebende Verfahren	87
2.4.	Statistische Auswertung	87

IV. ERGEBNISSE.....	88
1. GESUNDE HUNDE	88
2. KRANKE HUNDE.....	89
2.1. Antikörper-Prävalenz kanines Influenzavirus	89
2.2. Influenzavirus-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	92
V. DISKUSSION.....	93
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	101
VII. SUMMARY.....	103
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	105
IX. ANHANG.....	117
STANDARDISIERTES UNTERSUCHUNGSPROTOKOLL	117
BESITZERFRAGEBÖGEN	118
DANKSAGUNG	122

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	alpha
A	Adenin
AG	Aktiengesellschaft
AGID	Agar-Gel-Immun-Diffusionstest
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase
Asn	Asparagin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit
BHQ	Black Hole Quencher
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CIV	canine influenza virus (kanines Influenzavirus)
cm	Zentimeter
Co.	Compagnie
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
EHV	Equines Herpesvirus
EIV	equine influenza virus (equines Influenzavirus)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FAM	Farbstoff Carboxyfluorescein
fmol/l	Femtomol pro Liter
fl	Femtoliter
G	Guanin
g	Gramm
Gal	Galactose
ggr.	geringgradig
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
g/l	Gramm pro Liter

HA	Hämagglutinin
HAU	Hemagglutinating Units (hämagglutinierende Einheiten)
hgr.	hochgradig
HHT	Hämagglutinationshemmtest
HI	Hemagglutination Inhibition Assay (HHT)
I	Isoleukin
IFA	Immunfluorescence Assay (Immunfluoreszenztest)
IFT	Immunfluoreszenztest
IU/l	Internationale Einheit pro Liter
IVA	influenza virus A (Influenza-A-Virus)
kb	Kilobasen
KFZ	Kapilläre Füllungszeit
KI	Konfidenzintervall
km	Kilometer
L	Liter
l/l	Liter pro Liter
Leu	Leukin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lys	Lysin
M	Matrixgen
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MP	Matrixgen Probe (Matrixgen-Sonde)
max.	maximal
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mgr.	mittelgradig
Min.	Minimum
min.	minimal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol pro Liter
NA	Neuraminidase
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstruktur-Protein
NSW	New South Wales (australischer Bundesstaat)

OIE	Organisation Internationale des Épizooties
PA	saures Protein
PB	basische Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
p. o.	per os
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RBC	Red Blood Cells (Erythrozyten)
RDE	Receptor Destroying Enzyme (rezeptorzerstörendes Enzym)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Sek.	Sekunden
Ser	Serin
S/N	signal to noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)
SPF	spezifisch pathogen-frei
spp.	Spezies
<i>ssp.</i>	Subspezies
ssRNA	single-stranded RNA (einzelsträngige RNA)
Thr	Threonin
T	Thymin
Trp	Tryptophan
UK	United Kingdom (Vereinigtes Königreich)
U/l	Einheit pro Liter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
μmol/l	Mikromol pro Liter
USA	United States of America (Vereinigte Staaten Amerikas)
VNT	Virusneutralisationstest
WB	Western Blot
WBC	White Blood Cells (Leukozyten)
Y	Pyrimidin C oder T
z. B.	zum Beispiel

I. Einleitung

Infektionskrankheiten verursachen weltweit mehr Todesfälle als jede andere Erkrankungsform (SANDROCK, 2009). Influenza-A-Viren sind häufig und können bei Mensch, Pferd, Schwein sowie Hausgeflügel zu akuten respiratorischen Infektionen führen (WEBSTER et al., 1992; CRAWFORD et al., 2005). Fortschritte in der Agrarwirtschaft und Domestikation, „Crowding“, Klimawandel sowie Änderungen der Lebensumstände und -gewohnheiten von Tier und Mensch haben in der Vergangenheit zu zahlreichen Endemien und Epidemien geführt (WOLFE et al., 2007). Besonders besorgniserregend sind Veränderungen auf genetischer Ebene, die sich im Rahmen der Anpassung der Infektionserreger an immer neue Wirtsspezies vollziehen (SANDROCK, 2009).

Zu solch einer Anpassung kam es im Jahr 2004, als tausende Greyhounds und später auch Hunde anderer Rassen in weiten Teilen der USA an Infektionen mit Influenzaviren erkrankten (CRAWFORD et al., 2005). Das kanine Influenzavirus (CIV) verursacht je nach Immunitätslage des Wirtes und bakterieller Beteiligung mehr oder weniger schwere, akut auftretende respiratorische Symptomatik, wie Husten, Niesen, Nasenausfluss und auch Fieber, wobei Husten meist das Kardinalsymptom darstellt (CRAWFORD et al., 2005). Seit dem Ausbruch im Süden der USA Anfang des Jahres 2004, dem bald weitere Ausbrüche folgten, spricht man bei dieser Infektionskrankheit von einer „Panzootie“, dem veterinärmedizinischen Äquivalent zu einer Pandemie (ENSERINK, 2005).

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Ermittlung der Prävalenz von Antikörpern gegen CIV in der Hundepopulation Deutschlands. Hierzu wurden Blutproben von gesunden Hunden, die wiederum in die drei Gruppen Greyhounds, andere Windhunderassen und Nicht-Windhunde unterteilt wurden, sowie von akut respiratorisch erkrankten Hunden gesammelt und auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Influenzaviren untersucht. Von den kranken Hunden wurden darüberhinaus Tupferproben entnommen und mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auf das Vorliegen von Influenzavirus analysiert. Ein weiteres Ziel der Studie bestand in der Erhebung und Auswertung klinischer, labor diagnostischer und bildgebender Befunde von an H3N8 erkrankten Hunden.

II. Literaturübersicht

1. Influenzaviren

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und sind dafür bekannt, akut respiratorische Symptomatik bei Menschen, Schweinen sowie Pferden hervorzurufen (WEBSTER et al., 1992). Man unterscheidet Influenza-A-, -B- und -C-Viren, wobei den Influenza-A-Viren hinsichtlich ihrer Diversität sowie ihrem breiten Wirtsspektrum die größte Bedeutung zu Teil wird (NELSON & HOLMES, 2007).

1.1. Taxonomie

Anhand der zwei wesentlichen Oberflächen-Glykoproteine Hämagglutinin (HA) sowie Neuraminidase (NA) werden Influenzaviren in die verschiedenen Subtypen unterteilt, wobei man 16 Hämagglutinine und neun Neuraminidasen unterscheidet (FOUCHIER et al., 2005). Unzählige dieser Kombinationen wurden bereits bei Wasservögeln isoliert (DALY et al., 2010), welche als Virusreservoir für Influenzaviren dienen (WEBSTER et al., 1992).

Die Stammbezeichnung setzt sich zusammen aus dem Typ (z. B. A), der Herkunftsspezies bei Tierisolaten (z. B. canine), dem Ort der Isolierung (z. B. Florida), der laufenden Nummer des Stammes am Isolierungsort (z. B. 43), dem Jahr der Isolierung (z. B. 2004) sowie, in Klammern, der HA- und NA-Antigenkonfiguration (ROLLE & MAYR, 2002). So wurde beispielsweise das Isolat eines 2004 in Florida an kaniner Influenza erkrankten Greyhounds als A/canine/Florida/43/2004 (H3N8) bezeichnet (CRAWFORD et al., 2005).

Ausschließlich Influenzavirussubtypen, die zu einer Ausbreitung innerhalb der Hundepopulation im Stande sind, werden als kanine Influenzaviren bezeichnet (GIBBS & ANDERSON, 2010). Stämme hingegen, die zwar auf den Hund, jedoch nicht von Hund zu Hund übertragen werden können, wie dies in Großbritannien und Australien der Fall war, werden als Fälle equiner Influenza beim Hund bezeichnet (GIBBS & ANDERSON, 2010).

1.2. Morphologie

Influenza-A-Viren sind behüllte, negativ polarisierte, einzelsträngige Ribonukleinsäure- (RNA-) Viren mit einem Durchmesser von etwa 80 bis 120 nm, einer Länge von insgesamt etwa 13 kb (Nelson und Holmes, 2007) und etwa 500 10-14 nm langen Spikes auf der Oberfläche der Lipidhülle (WRIGHT et al., 2007). Zwei dieser Spikes, das HA sowie die NA sind für die Klassifikation entscheidend (WRIGHT et al., 2007). Das Genom setzt sich aus acht Segmenten einzelsträngiger RNA zusammen (FOUCHIER et al., 2005; WRIGHT et al., 2007), wobei ein Viruspartikel, um infektiös zu sein, auch alle dieser acht Segmente enthalten muss (WEBSTER et al., 1992). Das HA besteht aus den zwei Untereinheiten HA1 aus 324 Aminosäuren und HA2 aus 222 Aminosäuren, welche über eine Disulfidbrücke miteinander in Verbindung stehen (WEBSTER et al., 1992). Es ist für die Bindung des Virions an der Wirtszelloberfläche und somit für die Verschmelzung der viralen Hülle mit der des Wirtes verantwortlich (WEBSTER et al., 1992). Die NA ermöglicht die Virusfreisetzung aus der Wirtszelle und ist, ebenso wie das HA, in Abhängigkeit vom jeweiligen Selektionsdruck hoch mutationsfähig (WEBSTER et al., 1992).

Des Weiteren setzt sich das Influenzavirus aus den im Inneren des Virions gelegenen Segmenten Nukleoprotein (NP), Nichtstruktur-Protein (NS) 1 und 2, Matrixgen (M) 1 und 2, basischer Polymerase (PB) 1 und 2 sowie saurem Protein (PA) zusammen (Webster et al., 1992). NP bindet im Kern der infizierten Zelle virale RNA, und die Polymerasen PB1 und PB2 sind für die Transkriptionsschritte der Elongation bzw. der Initiation der RNA-Transkription verantwortlich (WEBSTER et al., 1992). Die Matrixgene M1 und M2 fungieren als Komponenten im viralen Kapsid bzw. als Ionenkanäle in Form eines integralen Membranproteins (NELSON & HOLMES, 2007). Das Nichtstruktur-Protein 1 (NS1) übernimmt die Aufgabe des RNA-Transports sowie der Translation; die Aufgabe des NS2 ist weitgehend ungeklärt (NELSON & HOLMES, 2007). Die Rolle des PA ist bisher ebenso unklar, man vermutet jedoch, dass es für das Aufwinden der Helix verantwortlich ist (WEBSTER et al., 1992). Die folgende Abbildung 1 zeigt die elektronenmikroskopische Ansicht eines Influenzaviruspartikels. In Abbildung 2 ist der strukturelle Aufbau eines Influenza-Virions im Detail zu sehen.

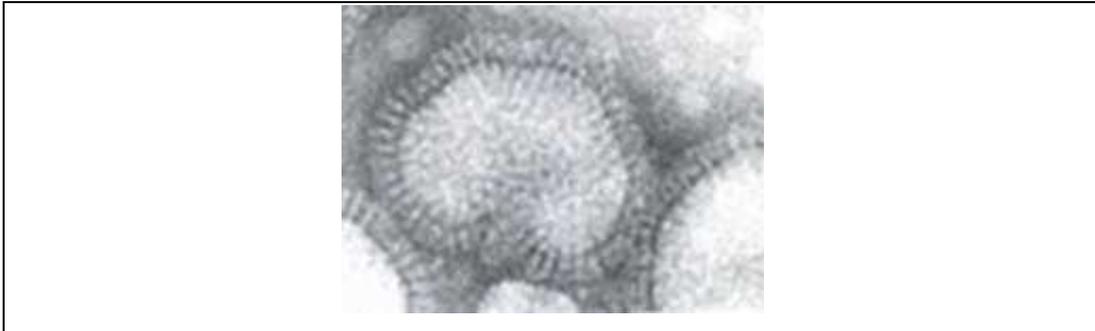


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Ansicht eines Influenzaviruspartikels (DOERR & GERRLICH, 2010).

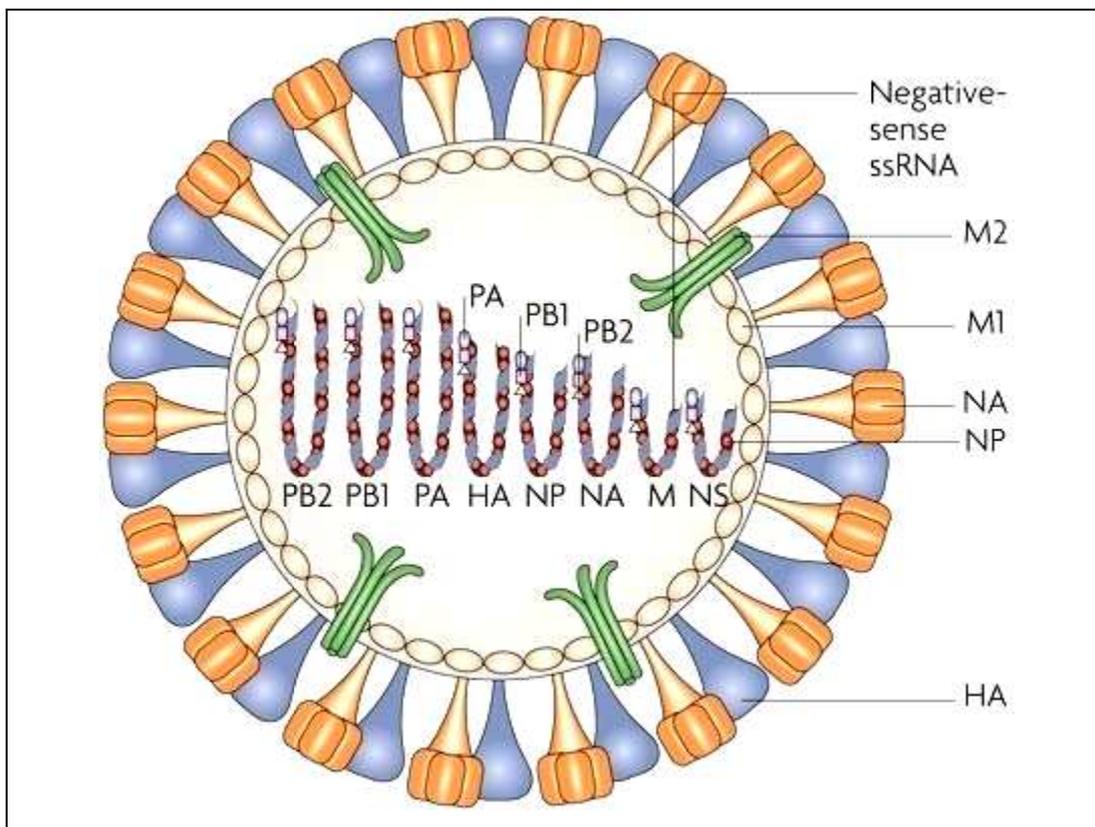


Abbildung 2: Struktureller Aufbau eines Influenza-Virions (HA = Hämaggglutinin; NA = Neuraminidase; NP = Nukleoprotein; NS = Nichtstruktur-Protein; M = Matrixgen; PB = basische Polymerase; PA = saures Protein; ssRNA = einzelsträngige Ribonukleinsäure) (NELSON & HOLMES, 2007).

1.3. Epidemiologie

Humane Influenzavirusinfektionen wurden erstmals 1918 mit der Spanischen Grippe (H1N1) nachgewiesen, die zahlreiche Todesopfer forderte (WEBSTER et al., 1992). Es folgten weitere große Epidemien wie die Asien-Grippe (H2N2) im Jahr 1957, die Hong-Kong-Grippe (H3N2) im Jahr 1968 sowie die Russische Grippe (H1N1) im Jahr 1977 (WEBSTER et al., 1992). Da alle dieser Ausbrüche, mit Ausnahme der Spanischen Grippe, ihren Ursprung in China hatten, bezeichnet man China als Epizentrum (WEBSTER et al., 1992). Die Spanische Grippe war erstmals in einem Militärlager in Kansas (USA) aufgetreten und durch US-Truppen nach Europa eingeschleppt worden (WEBSTER et al., 1992). In der gemäßigten Zone treten humane Influenzavirusinfektionen vor allem in den Wintermonaten auf (WEBSTER et al., 1992); in tropischen und subtropischen Regionen hingegen kommt es ganzjährig zu Fällen von Influenzavirusinfektionen (PRICE et al., 1989). Aus diesem Grund kann man die Tropen als ganzjähriges Reservoir für das Influenzavirus bezeichnen (RAMBAUT et al., 2008). Die Saisonalität ist auf Faktoren, wie ein vermehrtes Menschengeschehen in engen Räumen im Winter (NELSON & HOLMES, 2007) sowie eine sinkende Wirtimmunität in den Wintermonaten (SHEPHARD & SHEK, 1998; NELSON & HOLMES, 2007) zurückzuführen. Zudem spielen Zugvögel eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Epidemiologie sowie Saisonalität, da sie zu einer weltweiten Verbreitung von Influenzaviren beitragen und dadurch mit einer erhöhten Prävalenz von Influenzavirusinfektionen zu rechnen ist, wenn sich Zugvögel versammeln (SHARP et al., 1993).

Wasservögel dienen seit jeher als Virusreservoir für Influenzaviren, da Wasservögel sich durch eine asymptomatische Infektion auszeichnen, jedoch hohe Mengen an Virus mit den Fäzes ausscheiden (WEBSTER et al., 1978). Ursächlich hierfür ist die Tatsache, dass von einer Influenzavirusinfektion bei Geflügel vor allem Zellen, die den Gastrointestinaltrakt auskleiden, betroffen sind (WEBSTER et al., 1978). Somit scheinen aviäre Influenzaviren optimal an Wassergeflügel adaptiert zu sein (WEBSTER et al., 1992). Bei domestiziertem Geflügel und Säugetieren hingegen können sie unvorhersehbare Epidemien mit zahlreichen Todesfällen auslösen (WEBSTER et al., 1992). Aviäre Influenzaviren befinden sich in ihrem Reservoir, dem Wassergeflügel, in einer evolutionären

Stase und zeichnen sich, wie phylogenetische Analysen belegen, im Gegensatz zu den Influenzavirusstämmen beim Säugetier durch eine geringe Mutationsfreudigkeit aus (WEBSTER, 2002; NELSON & HOLMES, 2007). Abbildung 3 verdeutlicht die Rolle des Wassergeflügels als Reservoir für Influenzaviren.

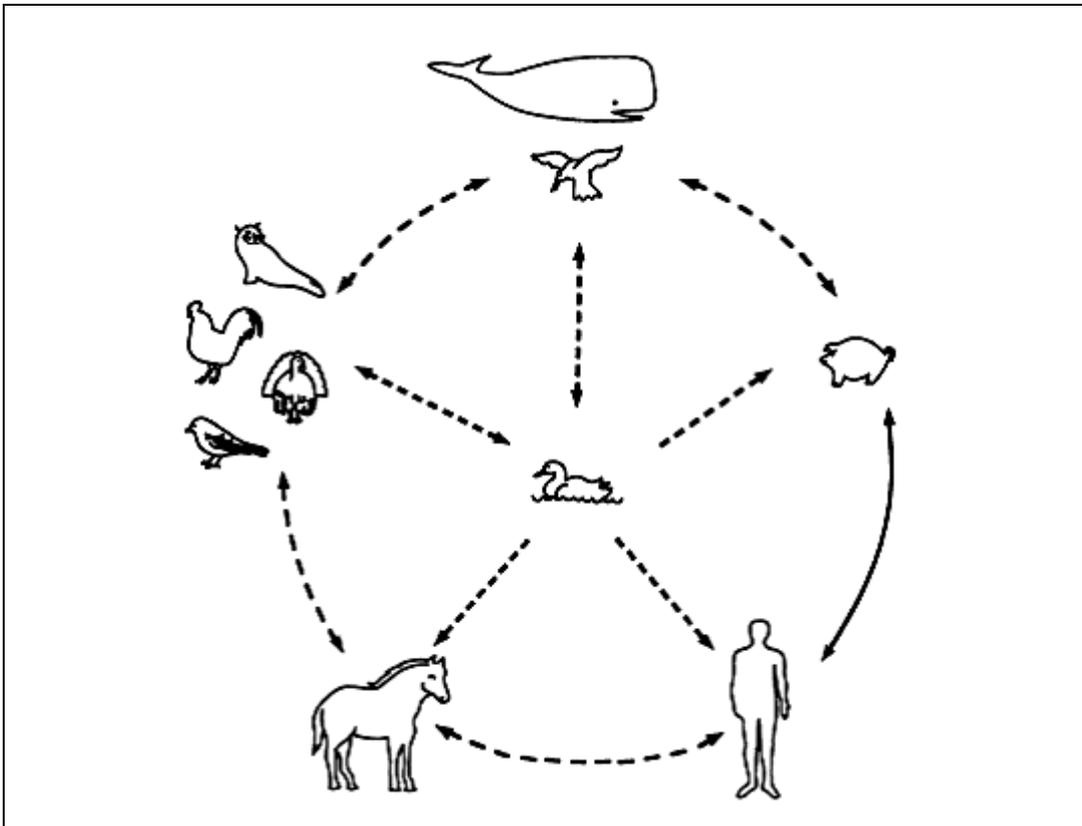


Abbildung 3: Wassergeflügel dient als Reservoir für nahezu alle Influenzavirussubtypen. Die durchgezogene Linie zwischen Mensch und Schwein verdeutlicht, dass eine direkte Übertragung von Influenzaviren vom Schwein auf den Menschen möglich ist, wohingegen die gestrichelten Linien veranschaulichen, dass für die Übertragung auf die anderen Spezies Wassergeflügel als Reservoir fungiert (WEBSTER et al., 1992).

Wahrscheinlich können Influenzaviren trotz ihrer geringen Tenazität aufgrund der Virushülle jahrelang im gefrorenen Zustand konserviert werden und auch noch nach Jahren zu Epidemien führen (WEBSTER et al., 1992; SHARP et al., 1993). Dies belegt die Spanische Grippe, die durch H1N1 verursacht wurde und im Jahr 1977 erneut als Russische Grippe auftrat. (WEBSTER et al., 1992; SHARP et al., 1993).

Ein „genetic reassortement“ eines Influenzavirus, also der Austausch einzelner Gensequenzen, erfordert die zeitgleiche Infektion mit einem aviären sowie einem anderen, z. B. humanen, Stamm (WEBSTER et al., 1992). Das Schwein diente hierbei oftmals als „mixing vessel“, da das Schwein sowohl für humane als auch für aviäre Influenzavirus-Stämme empfänglich ist (WEBSTER et al., 1992). Genetische Analysen zeigten, dass die meisten der im Inneren des humanen Influenzavirus befindlichen Gene einen gemeinsamen Vorfahren mit den porzinen Influenzavirus-Stämmen aufweisen (WEBSTER et al., 1992).

Die Veränderung der Influenzaviren im Laufe der Zeit ist also vor allem auf ein komplexes Zusammenspiel von natürlicher Selektion, Phylogenese sowie Epidemiologie zurückzuführen, wobei vor allem das „genetic reassortement“ im Rahmen eines „antigenic shift“ (Austausch ganzer Gensegmente) sowie „antigenic drift“ (Austausch einzelner Aminosäuren) immer wieder zu Pandemien in Populationen, die einer bestimmten Neukombination von HA und NA naiv gegenüber standen, geführt haben (NELSON & HOLMES, 2007). Das segmentierte Genom erleichtert hierbei den Austausch ganzer Gensegmente (WEBSTER et al., 1992; NELSON & HOLMES, 2007). Bei jeder RNA-Replikation entstehen so Varianten mit vorteilhaften Mutationen, die dem Selektionsdruck Stand halten (WEBSTER et al., 1992). Insbesondere HA und NA unterliegen als Oberflächenproteine aufgrund der Antikörperbildung des Wirtsorganismus einem hohen Selektionsdruck, um den Antikörpern des Wirtes zu entfliehen (WEBSTER et al., 1992).

Vor allem der weite Transport von Pferden aus Gründen der Zucht sowie des Pferdesports hat entscheidend zu einer weltweiten Verbreitung der equinen Influenzaviren beigetragen (MUMFORD, 1999; NEWTON et al., 1999a; NEWTON et al., 1999b). Zudem lindert eine Impfung zwar die Ausprägung der klinischen Symptome einer Infektion oder unterdrückt diese vollständig, ist jedoch oft nicht im Stande, eine Virusausscheidung nach Infektion gänzlich zu vermeiden (NEWTON et al., 2006). Dies ermöglicht eine unbemerkte Ausbreitung des Virus (NEWTON et al., 2006).

Normalerweise wird das Influenzavirus auf Individuen derselben Spezies (Mensch-zu-Mensch oder Pferd-zu-Pferd) durch Aerosole übertragen, es kann jedoch auch über direkten Kontakt zu einer Infektion kommen (DALY et al.,

2010). Neben der üblichen Infektionsroute *via* Aerosol spielen sowohl unbelebte Vektoren, wie kontaminierte Gegenstände, als auch der Mensch als belebter Vektor eine wichtige Rolle in der Epidemiologie von Influenzavirusinfektionen (CLARK, 2005). Das Kardinalsymptom einer Influenzavirus-Infektion ist Husten, der die übliche Ansteckung *via* Aerosol fördert (DALY et al., 2010). Einen entscheidenden Einfluss auf den Infektionsweg kann das Klima haben (WEBSTER et al., 1992). Englische Foxhounds, die sich auf natürlichem Weg mit H3N8 infizierten, waren mit Pferdefleisch gefüttert worden und hatten engen Kontakt zu Pferden (DALY et al., 2008). Daher wurde spekuliert, ob es bei diesem Ausbruch durch engen Kontakt oder durch die Inhalation von Viruspartikeln während der Aufnahme von Lungengewebe erkrankter Pferde zu einer Infektion der Hunde gekommen war (DALY et al., 2008). Diese Infektionsroute über die Inhalation von Viruspartikeln durch den Verzehr virushaltigen Gewebes war bereits im Fall hochpathogener aviärer Influenzaviren vom Subtyp H5N1 bei Feliden nachgewiesen worden (KEAWCHAROEN et al., 2004; SONGSERM et al., 2006).

1.4. Speziespezifität

Normalerweise weisen die einzelnen Influenzavirussubtypen eine hohe Speziespezifität auf, es kann jedoch, insbesondere zwischen Vögeln und Säugetieren, zu einer Überschreitung der Speziesbarriere kommen (WRIGHT et al., 2007). Neben H3N2, H2N2 sowie H1N1, welche in den letzten Jahrzehnten für eine Reihe von Influenzavirusinfektionen beim Menschen, zum Teil mit Todesfolge, verantwortlich waren, kam es beim Menschen auch immer wieder zu sporadischen Fällen von Infektionen mit anderen hochpathogenen aviären Influenzaviren, wie H7N7 oder H5N1 (CLAAS et al., 1998; GROEN et al., 1998; SUBBARAO et al., 1998; FOUCHIER et al., 2004). Bei Schweinen wird eine Influenzavirusinfektion in der Regel durch die Subtypen H1N1 und H3N2 (BROWN, 2000), beim Pferd hingegen durch H7N7 und H3N8 (SOVINOVA et al., 1958; WADDELL et al., 1963; WEBSTER, 1993) verursacht.

Die Wirtsspezifität beruht vermutlich vor allem auf dem HA, da dieses Oberflächenprotein für die Wirtszellerkennung entscheidend ist (WEBSTER et

al., 1992), indem es die Bindung des Virus an der Wirtszelle sowie dessen Eintritt in das Zellinnere vermittelt (SUZUKI et al., 2000).

Muranaka und Mitarbeiter (2011) analysierten die Rolle der Rezeptoren an der Oberfläche des Atmungstrakts von Pferd und Hund in Zusammenhang mit der Überschreitung der Speziesbarriere. Im Rahmen dieser Studie wurde der Respirationstrakt von zehn Vollblutpferden sowie vier gesunden Beagles nach deren Euthanasie histologisch auf die Verteilung der Rezeptoren im gesamten Respirationstrakt untersucht (SUZUKI et al., 2000; MURANAKA et al., 2011). Hierfür verwendeten sie, in Anlehnung an die Studie von Suzuki und Mitarbeitern (2000), die Lektine *Maackia amurensis* und *Sambucus nigra*, welche jeweils spezifisch für die Rezeptoren α 2,3-Galactose (Gal) und α 2,6-Gal sind, und kamen zu dem Ergebnis, dass α 2,3-Gal-Rezeptoren auf der Oberfläche des Flimmerepithels von Nase, Trachea und Bronchien sowohl des equinen, als auch des kaninen Respirationstrakts zu finden sind. Suzuki und Mitarbeiter (2000) hatten in ihrer Studie zuvor bewiesen, dass das EIV bevorzugt an α 2,3-Gal-Rezeptoren bindet. Somit gelang es Suzuki und Mitarbeitern (2000) unter Verwendung des Lektins *Maackia amurensis* zu beweisen, dass auch der kanine Respirationstrakt die zu einer Infektion mit dem equinen Influenzavirus nötigen Rezeptoren enthält. Hierfür wurde respiratorisches Gewebe eines Greyhounds sowie eines Pferdes, die aus anderen Gründen euthanasiert worden waren, immunhistochemisch untersucht (DALY et al., 2008). Muranaka und Mitarbeiter (2011) konnten zeigen, dass eine Übertragung von Pferd auf Hund ohne eine Änderung der Rezeptoraffinität möglich ist.

In Studien zuvor war belegt worden, dass aviäre Influenzaviren den α 2,3-Gal-Rezeptor präferieren, wohingegen humane Influenzaviren bevorzugt an den α 2,6-Gal-Rezeptor binden (ROGERS et al., 1983; SUZUKI et al., 2005; KOGURE et al., 2006). Es gelang auch, α 2,6-Gal-Rezeptoren in Becherzellen, Zilien sowie akzessorischen Drüsen des Respirationstrakts von Pferd und Hund nachzuweisen (SUZUKI et al., 2000; MURANAKA et al., 2011). Abbildung 4 veranschaulicht das Vorkommen bestimmter, für eine Influenzavirusinfektion entscheidender Rezeptoren, im equinen und porzinen Respirationstrakt im Vergleich.

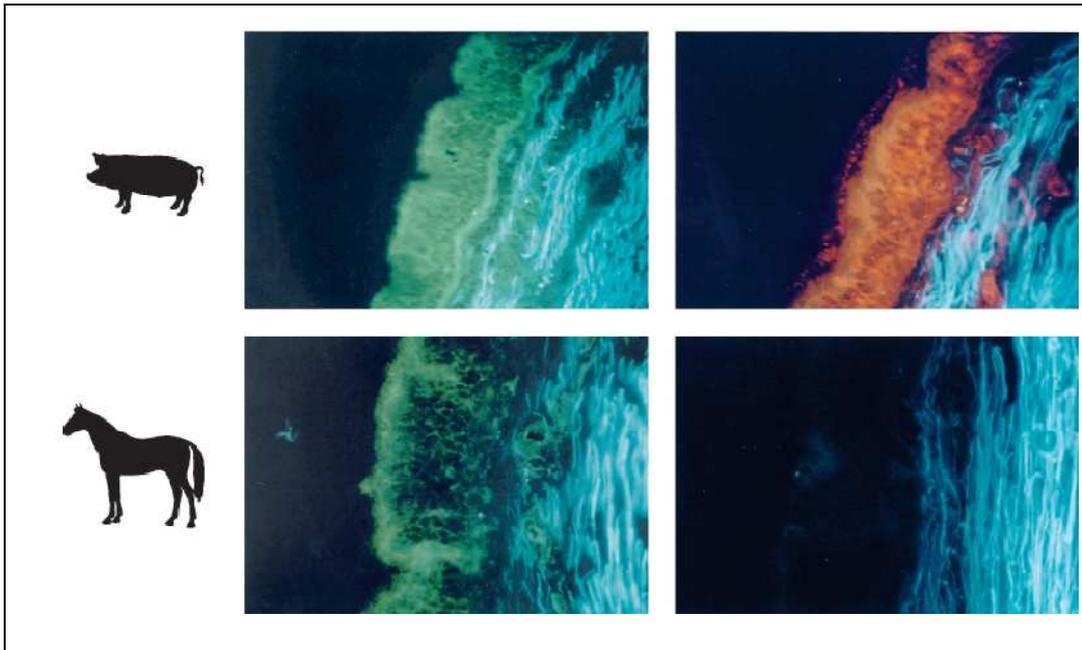


Abbildung 4: Die immunhistochemische Färbung von Trachealepithel verdeutlicht, dass der porzine Respirationstrakt im Bereich der Trachea sowohl $\alpha 2,3$ -Gal- (grüne Fluoreszenz; linke Abbildungen) als auch $\alpha 2,6$ -Gal-Rezeptoren (rote Fluoreszenz; rechte Abbildungen) besitzt, wohingegen der equine Respirationstrakt in diesem Bereich nur erstere aufweist (SUZUKI et al., 2000).

1.5. Pathomechanismen bei Influenzavirusinfektionen

Bei einer Influenzavirusinfektion handelt es sich um eine Tröpfcheninfektion, bei der Viruspartikel durch direkten Kontakt *via* Aerosol übertragen werden (WEBSTER et al., 1992). Eine weitere Infektionsmöglichkeit stellt die Inhalation von Viruspartikeln während des Verzehrs virushaltigen Fleisches dar. Dass es auch durch den Konsum infizierten Geflügels zu einer Übertragung hoch pathogener aviärer Influenzaviren vom Subtyp H5N1 kommen kann, war bereits bei Tigern, Leoparden (KEAWCHAROEN et al., 2004) und einem Hund (SONGSERM et al., 2006) nachgewiesen worden. Zudem war Kuiken und Mitarbeitern (2004) die experimentelle Infektion von Katzen durch Fütterung virushaltigen Hühnerfleisches gelungen.

HA bindet an bestimmte Aminosäurerezeptoren, auch als Sialorezeptoren bezeichnet, an der Oberfläche des Respirationstraktes oder des respiratorischen

Epithels, wohingegen NA die Freisetzung replizierter Viruspartikel aus den infizierten Epithelialzellen ermöglicht (MURANAKA et al., 2011). Obwohl alle Influenzaviren Oligosaccharide anhand der terminalen Aminosäuren erkennen, unterscheiden sich die Hämagglutinine in ihrer Bindungsspezifität anhand der Aminosäureabfolge der Sialorezeptoren (MURANAKA et al., 2011). Das HA, insbesondere die HA1-Domäne weist die höchste Konzentration an Epitopen auf und unterliegt auch dem größten Selektionsdruck (NELSON & HOLMES, 2007).

Das Influenzavirus repliziert in den Epithelzellen des Respirationstrakts von der Nase bis zu den terminalen Luftwegen, in den bronchialen Epithelzellen sowie in den Alveolarmakrophagen. So führt es zur Zellnekrose und prädisponiert den Wirtsorganismus für Sekundärinfektionen durch Kommensalen, wie *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pasteurella multocida* und Mykoplasmen (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Die primäre virale Infektion führt zu einer massiven Einwanderung von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems in das betroffene Gebiet (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Dies wiederum führt zu Rhinitis, Tracheitis, Bronchitis sowie Bronchiolitis (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Aufgrund bakterieller Sekundärinfektionen kommt es dann meist zu einer Einwanderung neutrophiler Granulozyten.

1.6. Überschreitung der Speziesbarriere

RNA-Viren sind aufgrund ihrer hohen Mutationsrate in der Lage, in kürzester Zeit neue Varianten mit Pandemie-Potential hervorzubringen (DOMINGO et al., 1997; MURCIA et al., 2010). Dank dieser Mutationsfreudigkeit, gekoppelt mit der großen Vielfalt möglicher Subtypen, kommt es auch in geimpften Populationen immer wieder zum plötzlichen Auftreten von Epidemien (MURCIA et al., 2010). Bei einer Veränderung der Aminosäureabfolge der viralen RNA spricht man von „genetic reassortement“ (NELSON & HOLMES, 2007). Hierbei gibt es zwei Mechanismen. Man unterscheidet den Austausch einzelner Aminosäuren („antigenic drift“) und den Austausch ganzer Gensegmente, den man als „antigenic shift“ bezeichnet (NELSON & HOLMES, 2007). Eine schrittweise

Mutation im Rahmen einer Veränderung einzelner Aminosäuren vereinfacht die Anpassung an eine neue Wirtsspezies sowie die Immunevasion (RAMBAUT et al., 2008; RUSSELL et al., 2008). Es stellt sich die Frage, ob die bereits veränderte Virusform von einem Wirt auf eine andere Wirtsspezies übertragen wird oder, ob es erst in der neuen Wirtsspezies zu Mutationen kommt (KUIKEN et al., 2006). In der Tat sind zahlreiche Wirt-Virus-Interaktionen nötig, um dem Virus eine Anpassung an eine neue Wirtsspezies (WEBBY et al., 2004) sowie eine Etablierung in dieser (WEBSTER et al., 1992; LIPATOV et al., 2004) zu ermöglichen.

Um diese Frage beantworten zu können, führten Murcia und Mitarbeiter (2010) ein Experiment durch, im Rahmen dessen zwei Antikörper-negative Pferde mit A/equine/Newmarket/1/93 infiziert wurden. Diese Pferde wiederum infizierten weitere Pferde durch engen Kontakt. Im Rahmen dieses Experiments gelang es, neun von zehn Pferden zu infizieren (MURCIA et al., 2010). Da das HA1-Gen die Rezeptor-Bindungs-Domäne vermittelt, führt eine Mutation im Bereich dieses Gens zu einer Änderung der Antigenität und ermöglicht somit eine Überschreitung der Speziesbarriere (MURCIA et al., 2010). Murcia und Mitarbeiter (2010) verglichen die Gensequenzen der experimentell infizierten Pferde mit denen von fünf feldinfizierten Pferden aus dem Jahr 2003 im Vereinigten Königreich. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass bereits 2003 multiple Mutationen stattgefunden hatten. Die Untersuchung der Gensequenzen von im Jahr 2004 in den USA infizierten Hunden sowie von EIV-Isolaten aus der gleichen Zeit zeigte bei den Hundeisolaten folgende drei Mutationen auf dem HA-Gen. Asparagin war an Position 54 durch Lysin und an Position 83 durch Serin ersetzt worden. An Position 222 wurde Tryptophan gegen Leucin ausgetauscht. Diese Veränderungen in der Aminosäureabfolge waren auch bei den experimentell infizierten Pferden zu finden. Die Tatsache, dass die Mutationen sowohl bei den Hunden als auch bei den Pferden auftraten, schloss eine rein experimentell herbeigeführte Mutation aus (MURCIA et al., 2010). Dadurch gelang es zu beweisen, dass Veränderungen im Virusgenom sowohl von einer auf eine andere Spezies übertragen werden als auch erst in einer neuen Wirtsspezies entstehen können (MURCIA et al., 2010).

Weil das HA eine entscheidende Komponente der Wirtsspezifität darstellt

(SUZUKI et al., 2000), wurde die Nukleinsäure dieses Genomabschnittes untersucht und die verschiedenen Sequenzen von Pferd und Hund miteinander verglichen. Für sechs amerikanische CIV-Isolate aus den Jahren 2003 bis 2005 konnten fünf Änderungen in der Aminosäureabfolge nachgewiesen werden (PAYUNGPORN et al., 2008), die der folgenden Tabelle 1 zu entnehmen sind.

Tabelle 1: Veränderungen der Aminosäureabfolge zwischen den kaninen Isolaten A/canine/Florida/43/2004 sowie 242/2003 und den equinen Isolaten (PAYUNGPORN et al., 2008).

Position auf dem HA-Gen	54	83	222	328	483
EIV	Asparagin (Asn)	Asparagin (Asn)	Tryptophan (Trp)	Isoleukin (I)	Asparagin (Asn)
CIV	Lysin (Lys)	Serin (Ser)	Leukin (Leu)	Threonin (Thr)	Threonin (Thr)

Die Isolate A/canine/Jacksonville/2005, A/canine/Miami/2005, A/canine/Iowa/2005 und A/canine/Texas/2005 formen eine Untergruppe, welche sich durch drei Veränderungen in der Aminosäureabfolge von den älteren Isolaten A/canine/Florida/242/2003 und A/canine/Florida/43/2004 unterscheidet (PAYUNGPORN et al., 2008). Die Substitutionen befinden sich hierbei an Position 118 und 261 (PAYUNGPORN et al., 2008), die auch bei humanen Influenzaviren die Antikörper-Bindungsstelle darstellen, an der es häufig im Rahmen einer Immunevasion zu Substitutionen kommt (BUSH et al., 1999; PLOTKIN & DUSHOFF, 2003).

Die Tatsache, dass es im Experiment von Yamanaka und Mitarbeitern (2009) zu keinen der oben genannten Substitutionen kam, lässt vermuten, dass die Substitutionen nicht essentiell für die Überschreitung der Speziesbarriere sind. Veränderungen in der Aminosäureabfolge können aber Virusvermehrung und Pathogenität im kaninen Respirationstrakt entscheidend steigern (YAMANAKA et al., 2009).

Bei den meisten Veränderungen in der Aminosäureabfolge mag es sich somit teilweise um stumme Mutationen ohne Einfluss auf die Antigenität handeln (PAYUNGPORN et al., 2008). Die Divergenz beweist jedoch, dass ein Anpassungsprozess an eine neue Wirtsspezies stattgefunden hat, und es sich bei dem CIV somit um eine separate Viruslinie handelt (PAYUNGPORN et al., 2008). Dies wiederum ermöglicht eine horizontale Übertragung in der Hundepopulation (PAYUNGPORN et al., 2008). Abbildung 5 veranschaulicht die phylogenetische Verwandtschaft der equinen und kaninen Isolate.

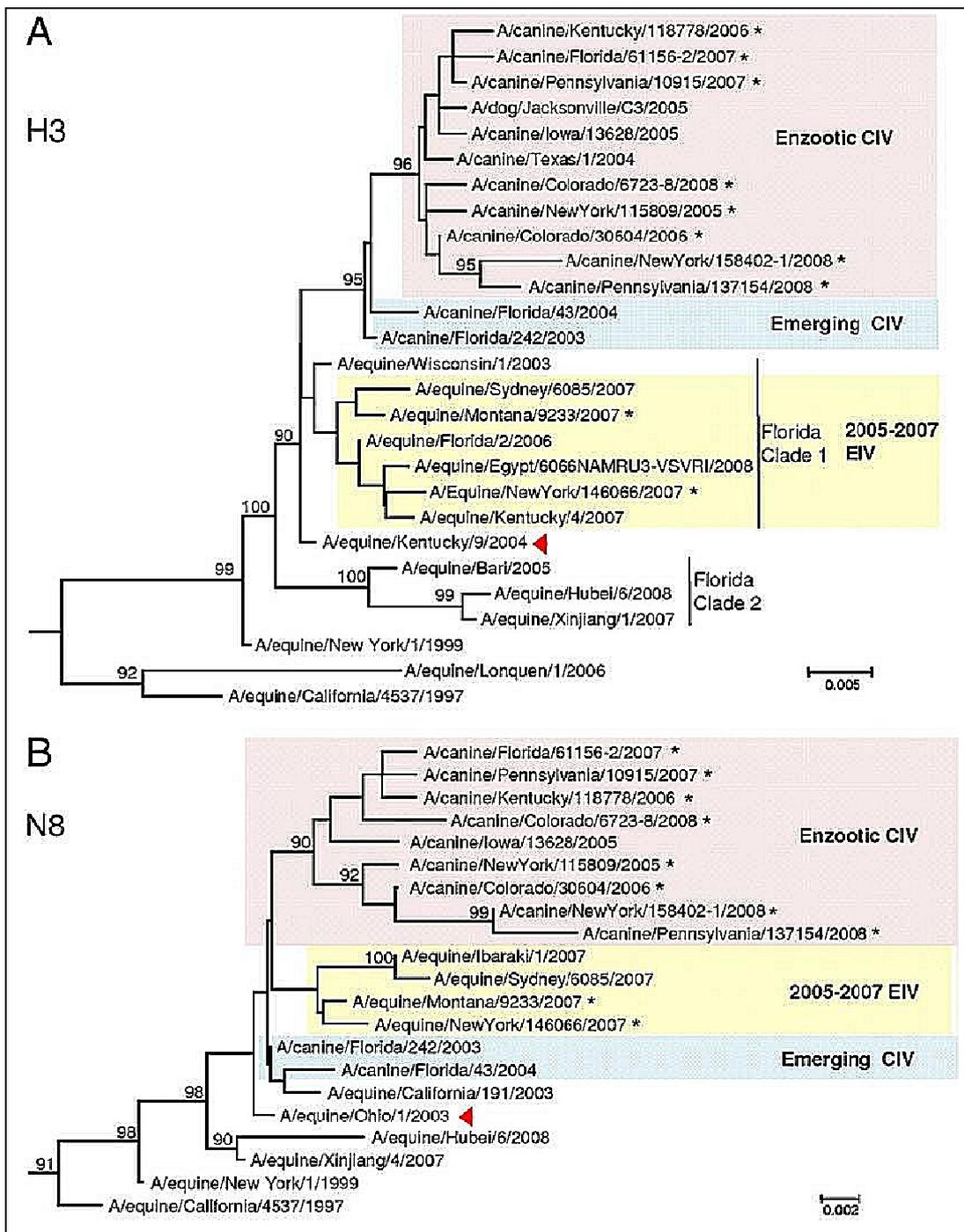


Abbildung 5: Phylogenetische Verwandtschaft der kaninen und equinen Isolate. Mit „Emerging CIV“ sind jeweils die ersten kaninen Isolate aus den Jahren 2003 und 2004 bezeichnet, die mit den equinen Isolaten zu 96 % genetisch identisch sind. Als „Enzootic CIV“ sind die kaninen Isolate ab 2005 bezeichnet, die weitere Modifikationen auf genetischer Ebene erfuhren und in der amerikanischen Hundepopulation als enzootisch gelten. Die roten Pfeile kennzeichnen die equinen Isolate, die phylogenetisch am engsten mit den kaninen Isolaten verwandt sind (CIV = canine influenza virus (kanines Influenzavirus); EIV = equine influenza virus (equines Influenzavirus)) (RIVAILLER et al., 2010).

2. Das kanine Influenzavirus (CIV)

Bei dem kaninen Influenzavirus handelt es sich um ein mit den equinen Stämmen verwandtes, zu über 96 % genetisch identisches Influenza-A-Virus vom Subtyp H3N8, das erstmals im Jahr 2004 in den USA als Ursache akuter respiratorischer Erkrankungen bei Hunden nachgewiesen wurde (CRAWFORD et al., 2005). Zuerst trat das Virus bei Greyhounds, später bei Hunden verschiedenster Rassen auf (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Insbesondere Hunde in Einrichtungen mit hoher Besatzungsdichte und ständigem Wechsel, wie Tierheime, Zuchten, Zoogeschäfte, auf Hundeschauen und in Tierkliniken, waren betroffen (CRAWFORD et al., 2005). Es erkrankten Hunde jeglicher Rasse, jeglichen Alters und unabhängig vom Immunstatus (CRAWFORD et al., 2005). Bisher existieren keine Berichte über Infektionen des Menschen oder anderer Säugetiere mit dem CIV durch einen Hund (CRAWFORD et al., 2005). Eine Studie zeigt, dass Pferde für das kanine Influenzavirus empfänglich sind, jedoch nach Infektion nur milde oder keine Symptome zeigen (CRAWFORD et al., 2005).

Molekularanalysen zufolge hat sich das kanine Influenzavirus zwar aus der equinen Variante durch die Übertragung zwischen beiden Spezies entwickelt, es ist jedoch zu einer Anpassung des Virus an den Hund gekommen (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Dies führte zur Entwicklung eines hundespezifischen Pathogens (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al.,

2008). Diese Adaption ermöglichte wiederum eine effektive Replikation im kaninen Respirationstrakt und somit ein Hervorrufen klinischer Symptome sowie eine Aufrechterhaltung der Infektkette durch Hund-zu-Hund-Übertragung (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008).

Im Jahr 2004 infizierten Crawford und Mitarbeiter (2005) vier sechs Monate alte Beagles intratracheal oder intranasal mit dem Isolat A/canine/Florida/43/2004, um dessen Infektiosität genauer zu untersuchen. Alle experimentell infizierten Hunde entwickelten über die beiden Folgetage nach Inokulation Fieber, es traten jedoch keine anderen klinischen Symptome innerhalb der nächsten 14 Tage auf, und nur zwei Beagles schieden an den ersten beiden Tagen des Experiments oder an vier aufeinanderfolgenden Tagen nachweisbare Mengen an Virus aus (CRAWFORD et al., 2005). Mit Hilfe einer immunhistochemischen Untersuchung von Lungengewebe gelang bei allen experimentell infizierten Beagles ein positiver Virusnachweis (CRAWFORD et al., 2005). Bei allen Hunden war es zu einer Bildung von Antikörpern an Tag 7 gekommen, was beweist, dass auch Hunde, die nicht der Rasse Greyhound angehören, für eine Infektion mit dem 2004 in Florida gewonnenen Isolat empfänglich sind (CRAWFORD et al., 2005).

Nachdem bewiesen werden konnte, dass das CIV bei Pferden zu Influenza-ähnlichen Symptomen führt (CRAWFORD et al., 2005) und Katzen ebenfalls für das CIV empfänglich sind (JIRJIS et al., 2010), es jedoch bei diesen Spezies nicht zu schwerwiegender klinischer Symptomatik kommt, infizierten Jirjis und Mitarbeiter (2010) vier nachweislich CIV-negative Beagles intratracheal und hielten diese zusammen mit acht nachweislich CIV-negativen Beagles. Basierend auf Pathogenitäts- und Immunogenitätsstudien von Deshpande und Mitarbeitern (2009) wurde hierfür A/canine/Florida/14/2006 gewählt. Die Studie führte zu dem Ergebnis, dass alle experimentell infizierten Hunde mehr oder weniger schwere Symptome, wie Husten, Niesen oder Nasenausfluss zeigten, jedoch keines der Tiere Fieber entwickelte (JIRJIS et al., 2010). Zudem hatten alle experimentell infizierten Hunde an Tag 10 Antikörper gebildet, wohingegen keiner der Kontakthunde zu diesem Zeitpunkt messbar hohe Antikörper-Titer aufwies (JIRJIS et al., 2010). An Tag 21 euthanasierte Kontakthunde hingegen hatten zum Zeitpunkt der Euthanasie nachweisbar hohe Antikörper-Titer entwickelt (JIRJIS et al., 2010). Bei allen experimentell infizierten Hunden war eine Virusausscheidung

an Tag 1 bis 6 nachweisbar, wohingegen sechs der acht Kontakthunde zu einem Zeitpunkt zwischen Tag 3 und 13 Virus ausschieden (JIRJIS et al., 2010). Alle infizierten Hunde wiesen zudem in der pathologischen Untersuchung Lungenveränderungen auf (JIRJIS et al., 2010). Somit war auf der Grundlage dieses Experiments bewiesen, dass eine Hund-zu-Hund-Übertragung des CIV möglich ist, wenngleich die Inkubationszeit und die Dauer bis zur Antikörperbildung bei den Kontakthunden deutlich länger war als bei den experimentell infizierten Hunden (JIRJIS et al., 2010).

Spekulationen von Jirjis zufolge beeinflussen Genetik, Virulenz sowie Höhe und Dauer der Virusausscheidung entscheidend den klinischen Schweregrad der Erkrankung (JIRJIS et al., 2010).

2.1. Pathogenese

Die Übertragung des CIV findet über oronasale Kontakte, beispielsweise gegenseitiges Beschnupern, von gesunden und infizierten Hunden statt sowie über die Inhalation von Aerosolen, die bei Husten und Niesen frei werden (CRAWFORD et al., 2005; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009). Zudem kann eine Infektion über die Inhalation von Viruspartikeln während der Aufnahme virushaltigen Fleisches erfolgen. Die Tatsache, dass die Hunde, welche 2002 in England erkrankt waren, in Pferdenähe gehalten worden waren, spricht für eine aerogene Übertragung des Virus von den infizierten Pferden auf die Hunde (DALY et al., 2008). Hinzu kommt, dass die betroffenen Hunde in der Woche vor dem Ausbruch mit Pferdefleisch zweier kürzlich getöteter Pferde gefüttert worden waren (DALY et al., 2008). Da jedoch Virus ausschließlich in veränderten Lungenarealen nachgewiesen werden konnte, ist eine aerogene Infektion wahrscheinlicher als die Theorie einer oralen Aufnahme (DALY et al., 2008). Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die orale Aufnahme von Lungengewebe erkrankter Pferde eine Inhalation ausreichend großer Virusmengen ermöglicht hat.

Als im Jahr 2007 in Sydney, im australischen Bundesstaat New South Wales (NSW), etwa 5000 Pferdeställe von einem Ausbruch equiner Influenza betroffen

waren, führten Spokes und Mitarbeiter (2009) eine Studie zur Erforschung der Epizootiologie durch. Hierfür wurden detaillierte Fragebögen an Inhaber von betroffenen Pferdeställen herausgegeben, um Risikofaktoren wie Personal- und Tierbewegungen sowie Teilen von Gegenständen zwischen den einzelnen Pferdeställen zu analysieren. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass unter günstigen klimatischen Bedingungen eine Übertragung über eine Entfernung von bis zu 1 km möglich war und belebte Vektoren, vor allem Vögel und Säugetiere, eine entscheidende Rolle in der Epidemiologie spielten (SPOKES et al., 2009).

In Japan führte man eine experimentelle Untersuchung zum Übertragungsmodus durch (YAMANAKA et al., 2009). Hierfür verwendete man das Isolat A/equine/Ibaraki/1/2007 (IBK07), welches im Jahr 2007 während einer Epizootie in Japan von einem Pferd gewonnen worden war (YAMANAKA et al., 2009). Drei Antikörper-negative Pferde wurden mit Hilfe eines Ultraschall-Verneblers infiziert und jeweils ein Pferd wurde mit je einem Antikörper-negativen Beagle für 14 Tage aufgestallt (YAMANAKA et al., 2009). Ab Tag 15 bis 21 wurden die Hunde separat in getrennten Räumen gehalten. Jedes der Studientiere wurde zwischen Tag 0 und 21 täglich einer klinischen Untersuchung unterzogen. Blutentnahmen für einen Hämagglutinationshemmtest (HHT) fanden bei den Pferden an Tag 0, 8 und 12 und bei den Kontakthunden an Tag 0, 8, 12, 16 und 21 statt (YAMANAKA et al., 2009). Die Pferde zeigten die für eine Influenzavirusinfektion klassische biphasische Fieberkurve, wohingegen die Kontakthunde weder Fieber noch andere klinische Symptome entwickelten. Für Virusisolierung sowie –genomamplifizierung mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) entnahm man bei den Pferden Nasentupfer an Tag 0 bis 14, bei den Kontakthunden täglich bis zum 21. Tag. Alle Studientiere entwickelten hohe Antikörper-Titer (YAMANAKA et al., 2009). Bei den Pferden war ab Tag zwei über fünf bis sechs Tage eine kontinuierliche Virusausscheidung nachzuweisen, wohingegen einer der Hunde zu keinem Zeitpunkt, die anderen beiden an jeweils zwei Tagen geringe Mengen an Virus ausschieden. Keines der von den Hunden gewonnenen Virusisolate zeigte an den Positionen 54, 83, 222, 328 und 483 des HA eine Abweichung in der Aminosäureabfolge, wie dies bei den amerikanischen Isolaten aus dem Jahr 2004 (PAYUNGPORN et al., 2008) der Fall gewesen war (YAMANAKA et al., 2009). Anhand dieser Studie gelang es zu beweisen, dass

Hunde sich direkt bei an einer EIV-Infektion erkrankten Pferden anstecken können, wobei die klinischen Symptome im Fall der experimentell infizierten Beagles nur sehr mild waren (YAMANAKA et al., 2009). Hunde könnten also als Quelle einer horizontalen Verbreitung in der Hundepopulation und als belebter Vektor für eine Ausbreitung in der Pferdepopulation dienen (YAMANAKA et al., 2009). Zudem fand man heraus, dass die Aminosäureabfolge des Stammes Ibaraki 07 (IBK07) aus Japan, welches im August 2007 nach 36 Jahren ohne EIV-Ausbrüche von einer EIV-Epidemie heimgesucht wurde, zu 98,1 bis 98,7 % mit den amerikanischen EIV-Stämmen der Jahre 2003 bis 2005 übereinstimmte (YAMANAKA et al., 2009). Das Fehlen jeglicher klinischer Symptome bei den japanischen Hunden mag zum einen an der geringen Anzahl der Kontakthunde, zum anderen aber auch an einer Attenuierung des experimentell verabreichten Virus durch Passage im embryonierten Hühnerei gelegen haben (KIRKLAND et al., 2010).

Die Inkubationszeit beträgt zwei bis vier Tage, wobei der Peak der Virusausscheidung in der präklinischen Phase, also der Inkubationszeit, beginnt und an Tag 7 bis 10 endet (CRAWFORD et al., 2005; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009). Einige Hunde scheiden zwar Virus aus, zeigen aber keinerlei Symptome. Sie sind also für die Aufrechterhaltung der Infektkette verantwortlich (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009). Es muss somit jeder Hund, ob symptomatisch oder nicht, als potentiell kontagiös erachtet werden (CRAWFORD et al., 2005). Es sollten stets, vor allem in Einrichtungen mit hoher Populationsdichte, strenge Hygienemaßnahmen mit Isolation kranker Hunde und deren Kontakthunde eingehalten werden (CRAWFORD et al., 2005).

2.2. Epidemiologie und geografische Verbreitung

Das kanine Influenzavirus hat weite Kreise in der Hundepopulation gezogen. Mittlerweile konnten Ausbrüche auf verschiedenen Kontinenten nachgewiesen werden.

2.2.1. USA

In den Jahren 2004 bis 2006 hat sich das Influenzavirus in der amerikanischen Hundepopulation stark ausgebreitet. Zunächst schienen ausschließlich rennaktive Greyhounds betroffen zu sein, ab 2005 traten jedoch auch Fälle bei Hunden verschiedener anderer Rassen auf (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008).

2.2.1.1. Greyhounds

Im Januar 2004 gab es einen Ausbruch von akuten Atemwegsinfektionen bei 22 Greyhounds in Florida. Dabei traten zwei unterschiedliche Krankheitsverläufe auf. Bei 14 von 22 Hunden kam es zu einer mildereren Form der Erkrankung, die initial durch Fieber und später Husten für zehn bis 14 Tage mit darauffolgender Rekonvaleszenz gekennzeichnet war. Die restlichen acht Hunde verstarben perakut an einer Lungenblutung (CRAWFORD et al., 2005). Pathohistologische Untersuchungen, die bei sechs der acht verendeten Greyhounds durchgeführt worden waren, ergaben eine Tracheitis, Bronchitis, Bronchiolitis sowie suppurative Bronchopneumonie einhergehend mit massiven Blutungen in Lunge, Mediastinum sowie Pleurahöhle (CRAWFORD et al., 2005). Mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sowie PCR konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den auslösenden Erregern um ein Influenzavirus handelte (CRAWFORD et al., 2005). Zudem konnte die Hämagglutination mit Referenzantisera gegen das EIV vom Subtyp H3 gehemmt werden, jedoch nicht durch spezifische Antisera gegen aviäre, porcine oder humane Influenza-A-Stämme. Sequenzanalysen ergaben eine Übereinstimmung der acht Gene des kaninen Isolates mit dem equinen Influenzavirus von über 96 %. Im Gegensatz dazu stimmten vergleichbare Gensequenzen aviärer, humaner oder porciner Influenza-A-Isolate nur zu 80 bis 94 % mit dem kaninen Stamm überein (CRAWFORD et al., 2005).

Anhand dieser Daten ging der kanine Stamm als A/canine/Florida/43/2004 als ein mit dem equinen Influenzavirus nahe verwandtes H3N8-Virus in die Geschichte ein (CRAWFORD et al., 2005). Weil nahezu alle Gene des kaninen Isolates mit dem equinen Stamm übereinstimmten, gingen Crawford und Kollegen (2005)

davon aus, dass es zu einer Übertragung des EIV auf den Hund gekommen war. Eine immunhistochemische Untersuchung des Lungengewebes der Greyhounds mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen das H3-Antigen erhärtete den Verdacht, dass ein Influenzavirus vom Subtyp H3 bei den betreffenden Hunden die Pneumonie verursacht hatte, da virales Antigen im Zytoplasma des bronchialen und bronchiolären Epithels sowie in den im Lumen und den Alveolen befindlichen Makrophagen nachgewiesen werden konnte (CRAWFORD et al., 2005).

Um die Rolle des Influenzavirusstammes A/canine/Florida/43/2004 bei Erkrankungen des Respirationstraktes zu ermitteln, wurden Serumpaare aus der akuten Phase sowie der Rekonvaleszenz von elf kranken sowie 16 asymptomatischen Kontakthunden auf virusspezifische Antikörper mittels HHT und Virusneutralisationstest (VNT) untersucht. Eine vierfache Antikörper-Titererhöhung zwischen akuter und rekonvaleszenter Phase trat in beiden Untersuchungsmethoden bei acht der elf (73 %) klinisch kranken Hunde auf. Zudem kam es bei sechs der 16 (38 %) asymptomatischen Kontakttiere im HHT und bei acht der 16 (50 %) in der VNT zu einem vierfachen Antikörper-Titeranstieg (CRAWFORD et al., 2005). Damit wurde bewiesen, dass eine akute Infektion der Hunde mit A/canine/Florida/43/2004 vorlag, welche in zeitlichem Zusammenhang mit dem Auftreten von respiratorischen Symptomen bei den meisten der betroffenen Hunde stand (CRAWFORD et al., 2005).

Drei Monate später sammelte man Einzelblutproben von weiteren 46 asymptomatischen Hunden, die mit den erkrankten Tieren gehalten worden waren (CRAWFORD et al., 2005). Von den 46 Hunden waren 43 in beiden Tests Antikörper-positiv. Dies entspricht einer Prävalenz von 93 % (CRAWFORD et al., 2005). Von den insgesamt 73 getesteten Hunden waren also 93 % sowohl im HHT als auch im VNT positiv, wobei sich diese Prävalenz aus 82 % der erkrankten und 95 % der gesunden Kontakthunde zusammensetzt (CRAWFORD et al., 2005). Die hohe Prävalenz von 95 % bei Hunden ohne Krankheitsgeschichte ließ vermuten, dass Infektionen mit dem CIV subklinisch verlaufen und somit eine effektive und unentdeckte Verbreitung des Virus in der Hundepopulation ermöglichen können (CRAWFORD et al., 2005).

Um zu untersuchen, ob das Influenzavirus bereits vor dem Ausbruch im Januar

2004 in der Greyhoundpopulation in Florida zirkulierte, testeten Crawford und Mitarbeiter (2005) asservierte Sera von 65 Greyhounds auf Antikörper gegen A/canine/Florida/43/2004. Bei 33 Proben aus den Jahren 1996 bis 1998 konnten keine Antikörper detektiert werden (CRAWFORD et al., 2005). Bei neun von 32 Proben aus den Jahren 2000 bis 2003 konnten jedoch mit beiden Testmethoden Antikörper nachgewiesen werden (CRAWFORD et al., 2005). Die Antikörperpositiven Hunde stammten jeweils von Rennbahnen in Florida, bei denen in den Jahren 1999 bis 2003 Ausbrüche respiratorischer Infektionen ungeklärter Ätiologie aufgetreten waren, was vermuten lässt, dass ein dem A/canine/Florida/43/2004 ähnliches Virus die Ursache für diese Ausbrüche gewesen war (CRAWFORD et al., 2005). Um in diese Richtung weitere Untersuchungen anzustreben, wurden Zellen aus asservierten Gewebeproben von Greyhounds, welche im März 2003 an einer hämorrhagischen Bronchopneumonie verendet waren, in Zellkultur untersucht. Zellen eines dieser Lungenhomogenisate wiesen in der ersten Passage bereits H3N8 auf. Dabei ergaben Sequenzanalysen eine 99 %ige Übereinstimmung mit A/canine/Florida/43/2004. Somit konnte bewiesen werden, dass ein dem Influenzavirus vom Januar 2004 ähnliches, im Folgenden als A/canine/Florida/242/2003 bezeichnetes Influenzavirus, in der Greyhoundpopulation bereits vor 2004 kursiert war (CRAWFORD et al., 2005).

Im Juni und August des Jahres 2004 folgten weitere Ausbrüche respiratorischer Erkrankungen auf 14 Rennbahnen in verschiedenen Bundesstaaten der USA (YOON et al., 2005). Internetmeldungen zufolge waren etwa 10 000 Greyhounds in den Bundesstaaten Florida, Texas, Alabama, Arkansas, West Virginia und Kansas betroffen (CRAWFORD et al., 2005; YOON et al., 2005). Crawford und Mitarbeiter (2005) sammelten Serumproben von insgesamt 94 Hunden von vier verschiedenen Rennstrecken in der akuten Phase der Erkrankung, vor dem siebten Tag nach Auftreten klinischer Symptome und in der Phase der Genesung, mindestens 21 Tage nach Ausbruch der Erkrankung. Bei 56 % dieser Hunde waren Antikörper gegen A/canine/Florida/43/2004 (mit Titern von über 1:32) nachweisbar, und alle unter ihnen wiesen einen vierfachen Antikörper-Titeranstieg zwischen der akuten Phase der Erkrankung und der Rekonvaleszenzphase auf. Zudem konnte man in Serumproben von 29 gesunden Hunden aus West Virginia und Kansas Antikörper nachweisen (CRAWFORD et

al., 2005).

Im April 2004 kam es zu einem Ausbruch in Iowa, bei dem fast 100 % der Greyhounds eines Rennstalls an respiratorischen Symptomen erkrankten (YOON et al., 2005). Die Mortalitätsrate betrug 5 %. Die meisten der betroffenen Hunde überlebten und erholten sich, einige verstarben jedoch an einer pathohistologisch nachgewiesenen hämorrhagischen Pneumonie (YOON et al., 2005). Lungengewebe von vier der verendeten Hunde wurde zur Untersuchung an die Iowa State University versandt. Dort konnte A/canine/Iowa/13628/2005 isoliert werden (CRAWFORD et al., 2005). Sequenzanalysen ergaben eine Übereinstimmung von 96 bis 98 % mit der Nukleotidsequenz equiner Isolate (CRAWFORD et al., 2005). Die geografische Entfernung zu den Fällen in Florida sowie die Unabhängigkeit von Erkrankungsfällen beim Pferd bewies, dass hier ein an den Hund adaptiertes Virus in der Hundepopulation kursierte (YOON et al., 2005).

Von Januar bis Mai 2005 kam es erneut auf 20 verschiedenen Rennstrecken in elf Bundesstaaten zu Ausbrüchen von Atemwegserkrankungen (CRAWFORD et al., 2005). Betroffen waren etwa 20 000 Greyhounds in Florida, Texas, Arkansas, Arizona, West Virginia, Kansas, Iowa, Colorado, Rhode Island, Wisconsin und Massachusetts (CRAWFORD et al., 2005). Crawford und Mitarbeiter (2005) untersuchten 96 Serumpaare von sieben verschiedenen Rennbahnen in Florida, jeweils aus der akuten und der Rekonvaleszenzphase (CRAWFORD et al., 2005). Antikörper gegen CIV wiesen 100 % der Hunde auf. Bei 58 % der untersuchten Hunde war zwischen der akuten und der Rekonvaleszenzphase ein vierfacher Antikörper-Titeranstieg messbar (CRAWFORD et al., 2005).

Aus der Lunge eines Greyhound, der im Juli 2004 auf einer Rennstrecke im Bundesstaat Texas an einer hämorrhagischen Bronchopneumonie verendet war, konnte Influenzavirus vom Subtyp H3N8 isoliert werden. Sequenzanalysen des HA sowie der NA dieses Isolates, das man als A/canine/Texas/1/2004 bezeichnet hatte, ergaben eine Übereinstimmung von 99 % mit A/canine/Florida/43/2004 (CRAWFORD et al., 2005).

Letztendlich konnten drei eng miteinander verwandte Influenzavirusstämme bei schweren Ausbrüchen innerhalb von 16 Monaten aus verschiedenen

geografischen Regionen der USA isoliert werden. Aufgrund dessen und wegen der hohen Prävalenz von Antikörpern gegen das Influenzavirus unter den rennaktiven Greyhounds konnte bewiesen werden, dass in den Jahren 2003 bis 2005 phylogenetisch ähnliche CIV-Stämme weite Kreise in der amerikanischen Greyhoundpopulation zogen (CRAWFORD et al., 2005).

2.2.1.2. Andere Hunderassen

Die hohe Antikörperprävalenz unter den rennaktiven Greyhounds ließ vermuten, dass auch andere Hunderassen empfänglich für das CIV sein könnten (CRAWFORD et al., 2005). Aus diesem Grund veranlasste man die Untersuchung auf Antikörper von insgesamt 70 Hunden aus einem Tierheim im Nordosten von Florida, vier Tierkliniken im Raum Florida sowie einer Tierklinik in New York, die alle akute respiratorische Symptome aufwiesen. Bei 97 % dieser Hunde konnten Antikörper gegen A/canine/Florida/43/2004 nachgewiesen werden (PAYUNGPORN et al., 2008). Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchung gelang es zu beweisen, dass auch andere Hunderassen empfänglich für eine Infektion sind (CRAWFORD et al., 2005).

In den Jahren 2004 und 2005 wurden Serumproben von Hunden verschiedener Rassen mit akuter respiratorischer Symptomatik in Tierheimen, Hundepensionen sowie Tierkliniken in Florida und New York gesammelt und auch bei diesen Hunden konnten Antikörper gegen das CIV nachgewiesen werden (CRAWFORD et al., 2005). Im April und Mai des Jahres 2005 erkrankten in einem Tierheim im Nordosten Floridas mindestens 58 Hunde im Alter von drei Monaten bis neun Jahren akut an respiratorischen Symptomen. Dabei waren sowohl reinrassige Hunde als auch Mischlinge betroffen. Von 18 der erkrankten Hunde hatten 17 (94 %) in Serumeinzelproben Antikörper gegen A/canine/Florida/43/2004, und bei fünf untersuchten Serumpaaren konnte ein vierfacher Antikörper-Titeranstieg zwischen akuter Phase und Genesung nachgewiesen werden. Von den betroffenen Hunden hatten mindestens zehn eine Pneumonie entwickelt, von denen sechs euthanasiert werden mussten (PAYUNGPORN et al., 2008).

Im Mai 2005 erkrankten ausserdem in einer Tierklinik im Südosten Floridas etwa 40 Hunde an akuten Atemwegsinfektionen, von denen drei eine Pneumonie

entwickelten, die für ein Tier tödlich endete. Von 19 Serumpaaren konnte in elf (58 %) eine Antikörperbildung nachgewiesen werden, und sechs von neun (67 %) Serumeinzelpben ergaben einen positiven Influenzavirus-Antikörpernachweis. Die gewonnenen Isolate wurden als A/canine/Jacksonville/2005 und A/canine/Miami/2005 bezeichnet (PAYUNGPORN et al., 2008).

Ab August 2005 bis April 2008 begann man mit einer USA- und Kanada-weiten Sammlung von Serumproben kranker Hunde mit akuter respiratorischer Symptomatik. Hierbei wurden mehr als 5000 Blutproben untersucht, und es konnten Antikörper-positive Reagenten in 25 Bundesstaaten der USA sowie in Kanada nachgewiesen werden (PAYUNGPORN et al., 2008).

Die geografische Ausbreitung der CIV-Ausbrüche von Florida nach New York basiert mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Tatsache, dass im Frühjahr und Herbst zahlreiche Urlauber und mit ihnen Hunde in die genannten Regionen verreisten (DUBOVI & NJAA, 2008). Zudem tragen Tierhilfsorganisationen durch die Verbringung von Hunden entscheidend zu einer Verbreitung bei (DUBOVI & NJAA, 2008).

In einer späteren Prävalenzstudie von Holt und Mitarbeitern (2010) waren 26 von 118 (22 %) an Erkrankungen der Atemwege leidenden Hunden in Philadelphia Antikörper-positiv. Zudem wurden durch dieselbe Forschungsgruppe 31 von 74 (42 %) Hunden in amerikanischen Tierheimen positiv getestet (HOLT et al., 2010). Die Prävalenz von Antikörpern gegen CIV bei 394 Hunden, die infolge des Hurricane Katrina an der Golfküste der USA gerettet worden waren, hingegen lag nur bei 0,5 % (LEVY et al., 2011).

Die folgende Abbildung 6 zeigt die epidemiologische Verbreitung des CIV innerhalb der USA.

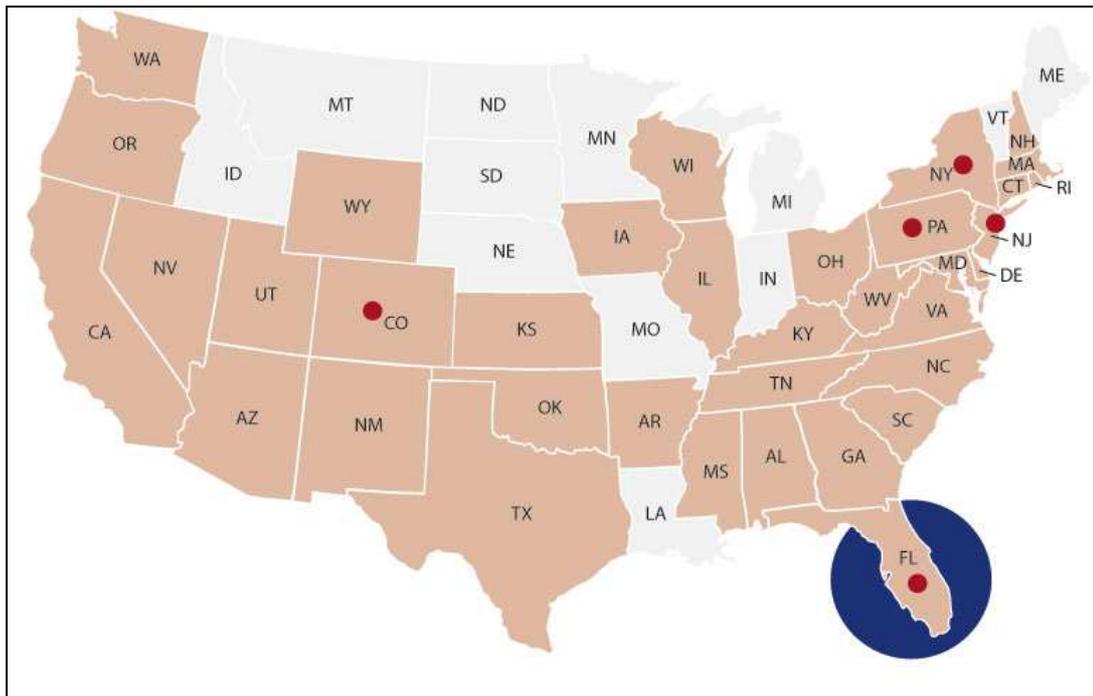


Abbildung 6: Landkarte der USA. Epidemiologie der Influenzavirusinfektionen. In den rosa hinterlegten Staaten ist das CIV aufgetreten, die roten Punkte symbolisieren Staaten, in denen das CIV enzootisch ist und der blaue Kreis um den Bundesstaat Florida symbolisiert die Rolle Floridas als ersten Staat der USA, in dem das CIV aufgetreten ist (http://doginfluenza.com/states_with_civ.asp, aufgerufen im August 2011).

Die folgende Tabelle 2 zeigt die Zahl der positiven Hunde, die bei einer großangelegten Untersuchung auf Antikörper gegen H3N8 bei Hunden verschiedener Rassen mittels HHT in den einzelnen Staaten der USA ermittelt wurde.

Tabelle 2: Ergebnis einer durch die University of Cornell, USA, durchgeführten Prävalenzstudie (modifiziert nach <http://diaglab.vet.cornell.edu/pdf/CIV-Status.pdf>, aufgerufen im Juni 2009)

US-Bundesstaat	Anzahl getesteter Proben	Anzahl positiver Proben	Prävalenz (%)
Alabama	37	1	2,7
Alaska	11	0	0,0
Arizona	60	12	20,0
Arkansas	8	0	0,0
Kalifornien	1373	61	4,4
Kanada	106	0	0,0
Colorado	638	247	38,7

Conneticut	208	51	24,5
Delaware	85	29	34,1
Florida	1108	180	16,3
Georgia	78	3	3,9
Hawaii	1	0	0,0
Idaho	18	0	0,0
Illinois	158	26	16,5
Indiana	38	0	0,0
Iowa	17	0	0,0
Kansas	18	0	0,0
Kentucky	32	3	9,4
Louisiana	30	0	0,0
Maine	44	0	0,0
Maryland	79	3	3,8
Massachusetts	175	30	17,1
Michigan	43	0	0,0
Minnesota	73	0	0,0
Mississippi	15	0	0,0
Missouri	15	0	0,0
Montana	27	0	0,0
Nebraska	9	0	0,0
Nevada	16	0	0,0
New Hampshire	19	1	5,3
New Jersey	1580	191	12,1
New Mexico	27	1	3,7
New York	2247	384	17,1
North Carolina	82	4	4,9
North Dakota	2	0	0,0
Ohio	197	8	4,1
Oklahoma	75	4	5,3
Oregon	116	2	1,7
Pennsylvania	424	78	18,4
Puerto Rico	8	0	0,0
Rhode Island	16	0	0,0
South Carolina	31	1	3,2
South Dakota	20	0	0,0
Tennessee	20	0	0,0
Texas	151	7	4,6
Utah	12	1	8,3
Vermont	30	0	0,0
Virginia	173	10	5,8
Washington	138	3	2,2
Washington DC	40	7	17,5
West Virginia	11	0	0,0
Wisconcin	98	1	1,0
Wyoming	146	43	29,5
Gesamt	10183	1392	13,7

In einer anderen, in Kanada durchgeführten Prävalenzstudie, war einer von 225 untersuchten Hunden Antikörper-positiv, was einer Prävalenz von 0,4 % entspricht. Es handelte sich hierbei um einen aus Florida importierten Greyhound (KRUTH et al., 2008).

2.2.2. Ausserhalb der USA

Auch ausserhalb der USA kam es zu Ausbrüchen kaniner Influenza, die im Folgenden beschrieben werden.

2.2.2.1. Australien

Als in Australien Hunde jeglichen Alters und jeglicher Rasse, die in unmittelbarer Nähe von an EIV-Infektion erkrankten Pferden gehalten worden waren, Inappetenz, Lethargie, Nasenausfluss und Husten zeigten, begannen Kirkland und Mitarbeiter (2010) Hunde, die in der Nähe von großen Pferdeställen oder zusammen mit erkrankten Hunden gehalten worden waren sowie solche, deren Besitzer Umgang mit erkrankten Pferden oder Hunden gehabt hatten, klinisch zu untersuchen. Ausserdem entnahm man Proben von Hunden, die zusammen mit Pferden gehalten wurden, aus fünf verschiedenen Regionen, jeweils 20 bis 60 km vom ersten equinen Krankheitsfall entfernt. Man sammelte von jedem der 40 Hunde Nasentupfer sowie Serum. Hiervon reagierten 23 in HHT und im ELISA unter Verwendung von Antigen gegen A/equine/Sydney/2007 positiv. Dies entspricht einer Prävalenz von 57,5 % (KIRKLAND et al., 2010). Von 26 Hunden nahm man 14 bis 16 Tage später in der Rekonvaleszenzphase eine weitere Serumprobe. Zwei Jahre später waren bei einer Untersuchung von 19 der 40 Hunde die HHT-Titer unverändert im Vergleich zur Erstuntersuchung. Der Antikörper-ELISA hingegen fiel bei allen Tieren negativ aus. Jeder Antikörper-positive Hund war in Pferdenähe gehalten worden, hatte jedoch nicht in jedem Fall engen Kontakt zu Pferden gehabt. Es gab bei diesem Ausbruch keinen Hinweis auf eine laterale Übertragung auf Hunde, die keinen Pferdekontakt gehabt hatten (KIRKLAND et al., 2010). Bei einer Sequenzanalyse des HA-, NA- sowie M-Gens der Isolate A/canine/Sydney/6525/2007 sowie

A/canine/Sydney/6692/2007 aus Tupfern zweier Hunde sowie A/equine/Sydney/6085/2007 aus Proben eines Pferdes aus demselben Reitstall fand man homologe Gensequenzen. Man ging also von einer direkten Übertragung des unveränderten Virus vom Pferd auf den Hund aus. Vergleiche mit der Genbank ergaben eine hohe Übereinstimmung mit A/equine/Kanazawa/2007 sowie A/equine/Ibaraki/1/2007, die man während eines Ausbruchs einer EIV-Infektion in Japan isoliert hatte (KIRKLAND et al., 2010).

In Australien konnten weder eine Übertragung des Virus durch Menschen als belebte Vektoren noch eine horizontale Übertragung von Hund zu Hund nachgewiesen werden (KIRKLAND et al., 2010). Symptomatische Hunde schieden nur sehr geringe Mengen Virus aus (KIRKLAND et al., 2010).

2.2.2.2. Europa

Neben den USA und Australien waren auch Großbritannien und Italien von Ausbrüchen kaniner Influenza betroffen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

2.2.2.2.1. Großbritannien

Im Frühjahr des Jahres 2003 erkrankten zwischen März und Mai mehr als 1300 Pferde an zwölf verschiedenen Standorten im Vereinigten Königreich zeitgleich an Husten, Nasenausfluss und in manchen Fällen Fieber. Allein in Newmarket waren 21 Rennställe betroffen. Als Ursache für diese Epizootie konnte EIV sowohl mittels Antikörpernachweis als auch direkt in Nasen- und Rachentupfern nachgewiesen werden. Die meisten der betroffenen Pferde waren innerhalb der letzten drei Monate geimpft worden (NEWTON et al., 2006). Im Zusammenhang mit diesem Ausbruch equiner Influenza kam es auch in der Hundepopulation Großbritanniens zum Auftreten akut respiratorischer Symptome, die auf eine Übertragung des Virus von betroffenen Pferden auf Hunde zurückzuführen war (NEWTON et al., 2007).

Daly und Mitarbeiter (2008) begannen in einer retrospektiven Studie in

Großbritannien einen schweren Ausbruch von respiratorischen Infektionen bei 92 englischen Foxhounds im Vereinigten Königreich im Jahr 2002 auf dessen Ursache zu untersuchen. Bei diesen Hunden war das Kardinalsymptom plötzlich auftretender Husten gewesen, wobei einige Hunde Schwäche bis hin zu Bewusstlosigkeit zeigten und einer akut verstorben war. Sechs weitere Hunde waren euthanasiert worden. Die pathohistologische Untersuchung hatte eine subakute bronchointerstitielle Pneumonie ergeben, wobei man eine Virusinfektion als Ursache vermutete. Man untersuchte asservierte Gewebeproben der zwei im Jahr 2002 obduzierten Hunde immunhistochemisch auf das Vorliegen von CIV und wurde in Makrophagen und Epithelzellen pathologisch veränderter Lungenareale fündig. Die Immunhistochemie von Lunge, Leber, Milz, Myokard, Darm, Pankreas und Oropharynx hingegen fiel negativ aus (DALY et al., 2008). Des Weiteren wurde das Gewebe einer PCR sowie einer Gensequenzanalyse unterzogen, welche zu dem Ergebnis führte, dass das isolierte Virus zu 100 % mit den equinen Isolaten Newmarket/1/93 und 05/03 übereinstimmte. Lysin an Position 261 sowie Isoleukin an Position 242 ermöglichten eine eindeutige Zuordnung zu der amerikanischen Linie des EIV, da alle europäischen Linien, die seit 1998 isoliert worden waren, Valin an Position 242 aufwiesen (DALY et al., 2008).

Im Jahr 2005 begann man ausserdem Serumproben von Hunden zu sammeln, die von dem Ausbruch 2002 betroffen gewesen waren, sowie von drei weiteren Gruppen von Foxhounds aus derselben Region. Es wurde pro Gruppe Serum von 31 bis 33 Hunden im Alter von neun Monaten bis neun Jahren untersucht (DALY et al., 2008). Man führte dabei eine Antikörperuntersuchung mittels HHT durch. Bei neun Hunden konnten Antikörper gegen A/equine/Newmarket/1/93 und 2/93 nachgewiesen werden, wobei acht davon den Ausbruch 2002 überlebt hatten, einer jedoch nach 2002 geboren war. Dies belegt, dass es zu weiteren Infektionen nach 2002 gekommen sein musste (DALY et al., 2008).

Der Nachweis unverändert hoher Antikörper-Titer auch bei den australischen Hunden 2 Jahre nach deren Erkrankung an CIV-Infektion untermauert den Verdacht, dass die Antikörper-Titer im Fall der Englischen Foxhounds tatsächlich auf den einige Jahre zurückliegenden Ausbruch einer Infektion mit EIV im Vereinigten Königreich zurückzuführen waren (KIRKLAND et al., 2010). Wie in

Australien schien es in Großbritannien, im Gegensatz zu den Ausbrüchen in den USA, nicht zu einer Zirkulation des Virus in der Hundepopulation gekommen zu sein (SMITH et al., 2005; KIRKLAND et al., 2010).

Im Dezember 2004 wurden mehrere 100 Sera von Hunden in ganz Großbritannien auf Antikörper gegen CIV getestet (SMITH et al., 2005). Es wurden keine Antikörper nachgewiesen. Diese Prävalenz-Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass CIV zu diesem Zeitpunkt nicht in Großbritannien zu zirkulieren schien und die Ausbrüche in den Jahren 2002 und 2003 somit einmalige Ereignisse von CIV-Infektionen in Großbritannien darstellten (SMITH et al., 2005).

2.2.2.2.2. Italien

Seit dem Jahr 2000 hatte es in Italien zahlreiche Ausbrüche von Influenzavirusinfektionen und damit potentielle Ansteckungsmöglichkeiten für die italienische Hundepopulation bei Geflügel (H7N1, H7N3 sowie H5N2) und Pferd (H3N8) gegeben (CAPUA et al., 2002b; CAPUA et al., 2002a; MARTELLA et al., 2007). De Benedictis und Mitarbeiter (2010) untersuchten Serumproben von insgesamt 6858 italienischen Hunden, die in den Jahren 2006 bis 2008 im Rahmen der Evaluierung der Effektivität einer Tollwut-Vakzine gesammelt worden waren, auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Influenzaviren. Hierbei wurde als Screeningtest ein Nukleoprotein-ELISA (NP-ELISA) verwendet und dieser im positiven Fall mittels HHT und Immunfluoreszenztest (IFT) bestätigt. Die Prävalenz lag mit 2 von 6858 bei 0,03 %. Bei dem einen der beiden positiven Hunde handelte es sich um ein Tier, das drei Jahre zuvor zeitgleich mit dem Ausbruch in den USA in Florida gelebt hatte, der andere positive Reagent hatte zwar zu keinem Zeitpunkt Europa verlassen, war jedoch zum Zeitpunkt eines Ausbruchs equiner Influenza in Italien in engem Kontakt mit Pferden gestanden (MARTELLA et al., 2007; DE BENEDICTIS et al., 2010). Beide Hunde hatten laut Besitzer zu keinem Zeitpunkt die für eine Influenzavirusinfektion typische klinische Symptomatik, wie Fieber, Husten, Niesen oder Nasenausfluss, gezeigt (DE BENEDICTIS et al., 2010).

De Benedictis und Mitarbeiter (2010) konnten in ihrer Prävalenzstudie somit beweisen, dass die Hundepopulation Italiens keine große Rolle in der Ökologie und Epidemiologie der Influenzavirusinfektion spielt. Risikofaktoren wie der internationale Transport sowie der Kontakt zu anderen Spezies (in diesem Fall Pferden) konnten erneut untermalt werden (DE BENEDICTIS et al., 2010). In einer anderen Studie im Jahr 2009 konnten für den Nordosten Italiens unter 637 Hunden und Katzen mittels ELISA bei keinem einzigen Tier Antikörper gegen Influenzavirus ermittelt werden (PICCIRILLO et al., 2010).

2.3. Klinische Symptome

Die Inkubationszeit beträgt zwei bis vier Tage. Dabei erfolgt die höchste Virusausscheidung in der präklinischen Phase, also in der Zeit vor Auftreten klinischer Symptome und sistiert nach etwa sieben bis zehn Tagen. (CRAWFORD et al., 2005; DESHPANDE et al., 2009).

Ursprünglich ging man von einer Erkrankungsrate von nahezu 100 % in einer naiven Hundepopulation aus (CRAWFORD et al., 2005). Bei einem mildereren Krankheitsverlauf kommt es initial zu Fieber, welchem sich trockener oder produktiver Husten sowie Niesen, Nasen- und evtl. Augenausfluss über zehn bis 14 Tage und letztendlich Genesung anschließen (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009). Der trockene Husten, der das Kardinalsymptom darstellt, ähnelt dem im Rahmen des Zwingerhusten-Komplexes beschriebenen. Bei einer bakteriellen Sekundärinfektion kann es zu mukösem bis purulentem Nasenausfluss sowie produktivem Husten kommen (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Bei etwa 20 % der betroffenen Tiere kommt es aufgrund einer Verkomplizierung durch bakterielle Sekundärinfektionen zu einem schwereren Krankheitsverlauf mit erhöhter Atemfrequenz und forciertes Atmung, produktivem Husten sowie hohem Fieber von 40 bis 41 °C (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). 1 bis 5 % der Tiere versterben perakut an massiven Blutungen in Lunge, Mediastinum und Pleurahöhle (CLARK, 2005; CRAWFORD et al., 2005; YOON et al., 2005). Diese Hämorrhagien konnten bisher ausschließlich bei Greyhounds, nicht aber bei feldinfizierten Hunden

anderer Rassen pathologisch nachgewiesen werden (PAYUNGORN et al., 2008). Eine allein mit dem CIV assoziierte Mortalitätsrate ist zudem aufgrund der hohen Inzidenz von Sekundärinfektionen bakterieller Natur schwer festzulegen (DUBOVI & NJAA, 2008).

In einer Studie, die Crawford und Mitarbeiter im Jahr 2004 durchführten, hatten 36 von 73 gesunden Kontakthunden nachweisbar hohe Antikörper-Titer und 43 von 46 klinisch unauffälligen Kontakthunden waren drei Monate nach dem Ausbruch der CIV-Infektion in der Greyhoundpopulation Antikörper-positiv. Somit gelang es zu beweisen, dass es je nach Durchseuchungsgrad sowie Immunitätsstatus der jeweiligen Hundepopulation neben den beiden klinischen Formen auch zu einer subklinischen Infektion kommen kann, welche zu einer unbemerkten Verbreitung der Infektion durch stumme Ausscheider beitragen kann und somit eine entscheidende Rolle in der Epizootiologie des CIV spielt (CRAWFORD et al., 2005). Die anfänglich vermutete Morbiditätsrate von 100 % konnte somit nicht bestätigt werden.

2.4. Diagnostik

Die CIV-Infektion kann nicht allein anhand der klinischen, bildgebenden und labordiagnostischen Befunde diagnostiziert werden, da diese nicht pathognomonisch für eine CIV-Infektion sind (DUBOVI & NJAA, 2008). Im Fall einer infektiösen Tracheobronchitis mit den klassischen Zwingerhustenerregern erkranken jedoch weniger Tiere in einer geimpften Population klinisch als im Fall einer CIV-Infektion, bei der Morbiditätsraten von 60 bis 80 % keine Seltenheit sind (DUBOVI & NJAA, 2008).

2.4.1. Labor

CIV-infizierte Hunde ohne sekundäre bakterielle Pneumonie weisen meist ein unverändertes Blutbild und Serumprofil auf. Hunde hingegen, bei denen es zu einer bakteriellen Sekundärinfektion kommt, zeigen in der labordiagnostischen Untersuchung oft eine Leukozytose mit Neutrophilie und Linksverschiebung

(CRAWFORD et al., 2005).

2.4.2. Röntgen

Das Röntgenbild erkrankter Hunde kann Auffälligkeiten zeigen, die von einer bronchointerstitiellen oder alveolären Zeichnung bis hin zur Konsolidierung ganzer Lungenlappen reichen (CRAWFORD et al., 2005). Dies erlaubt jedoch ebenso wie die Blutuntersuchung keine ätiologische Diagnose (CRAWFORD et al., 2005).

2.4.3. Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit

In bakteriologischen Untersuchungen der transtracheal, endotracheal sowie durch Bronchoalveolarlavage gewonnenen Flüssigkeit wird oft ein weites Spektrum an grampositiven und gramnegativen Bakterien gefunden (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Hierdurch wird lediglich das Vorliegen einer bakteriellen Sekundärinfektion bestätigt. In der zytologischen Untersuchung dominieren neutrophile Granulozyten und Makrophagen als vorherrschender Zelltyp (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008).

2.4.4. Pathologische Untersuchung

In der pathologischen Untersuchung fallen Lungenödem oder -kongestion, Epithelnekrosen sowie Erosionen im gesamten Bereich der Luftwege und Rhinitis, Tracheitis, Bronchitis, Bronchiolitis sowie in schweren Fällen Bronchopneumonie auf (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008). Hierbei kommt es auf der gesamten Länge der Luftwege zu einem Verlust des Flimmerepithels und der damit verbundenen Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance, einer Schädigung des verbleibenden respiratorischen Epithels sowie einer Infiltration der Submucosa mit neutrophilen Granulozyten, Entzündungszellen, Lymphozyten sowie Makrophagen (CRAWFORD et al., 2005). Auch in der pathologischen Untersuchung nach experimenteller Infektion findet man mildere und schwerwiegendere Verlaufsformen (DUBOVI & NJAA, 2008). Aufgrund von Ödem sowie Zellinfiltrationen entzündlicher Art kommt es

zu einer massiven Verdickung der Alveolarsepten. Die Veränderungen auf alveolärer Ebene reichen von lokal begrenzten atelektatischen Arealen bis hin zu Aggregaten zellulären Debris (DUBOVI & NJAA, 2008). Es dominieren mehr oder weniger degenerierte neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen und Aggregate aus untergegangenen Epithelzellen im Alveolarlumen (CRAWFORD et al., 2005). Zudem kann es zu einer Vergrößerung sowie Ödematisierung der bronchialen Lymphknoten kommen (DUBOVI & NJAA, 2008).

Bei allen der sechs von acht untersuchten, bei dem ersten Ausbruch einer CIV-Infektion auf einer Rennbahn in Florida verendeten Greyhounds fielen massive Blutungen in Lunge, Mediastinum sowie Pleurahöhle auf (CRAWFORD et al., 2005). Ähnliche Befunde konnten durch Deshpande und Mitarbeiter (2009) nach experimenteller Infektion trotz Fehlen einer bakteriellen Sekundärinfektion reproduziert werden. Bei dieser schweren Verlaufsform kommt es zu einer massiven Ansammlung hämorrhagischen Exsudats in Luftwegen, Alveolarlumen sowie im Interstitium (DUBOVI & NJAA, 2008). Zudem wurden Vaskulitiden sowie intravaskuläre Thromben in Zusammenhang mit dieser Verlaufsform beschrieben (CRAWFORD et al., 2005; YOON et al., 2005). Die Ursache, warum diese schwere Verlaufsform nur bei Greyhounds auftrat, konnte bislang nicht ermittelt werden.

Abbildung 7 zeigt Lungenveränderungen, die bei den erkrankten Greyhounds 2004 auftraten (JIRJIS et al., 2010). Die Lungen zeichneten sich durch eine dunkelrote bis schwarze Färbung sowie durch eine palpatorisch feststellbare moderate bis massive Verdichtung des Lungengewebes aus (CRAWFORD et al., 2005; YOON et al., 2005). Man spricht in diesem Fall auch von einer Hepatisation des Lungengewebes (CRAWFORD et al., 2005). Diese massiven pulmonalen Blutungen waren im Fall des Ausbruchs in Iowa (USA) 2005 auf eine Koinfektion mit *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* zurückzuführen (YOON et al., 2005). Die Abbildungen 8 und 9 veranschaulichen das pathohistologische Bild von mit H3N2 experimentell infizierten Hunden.

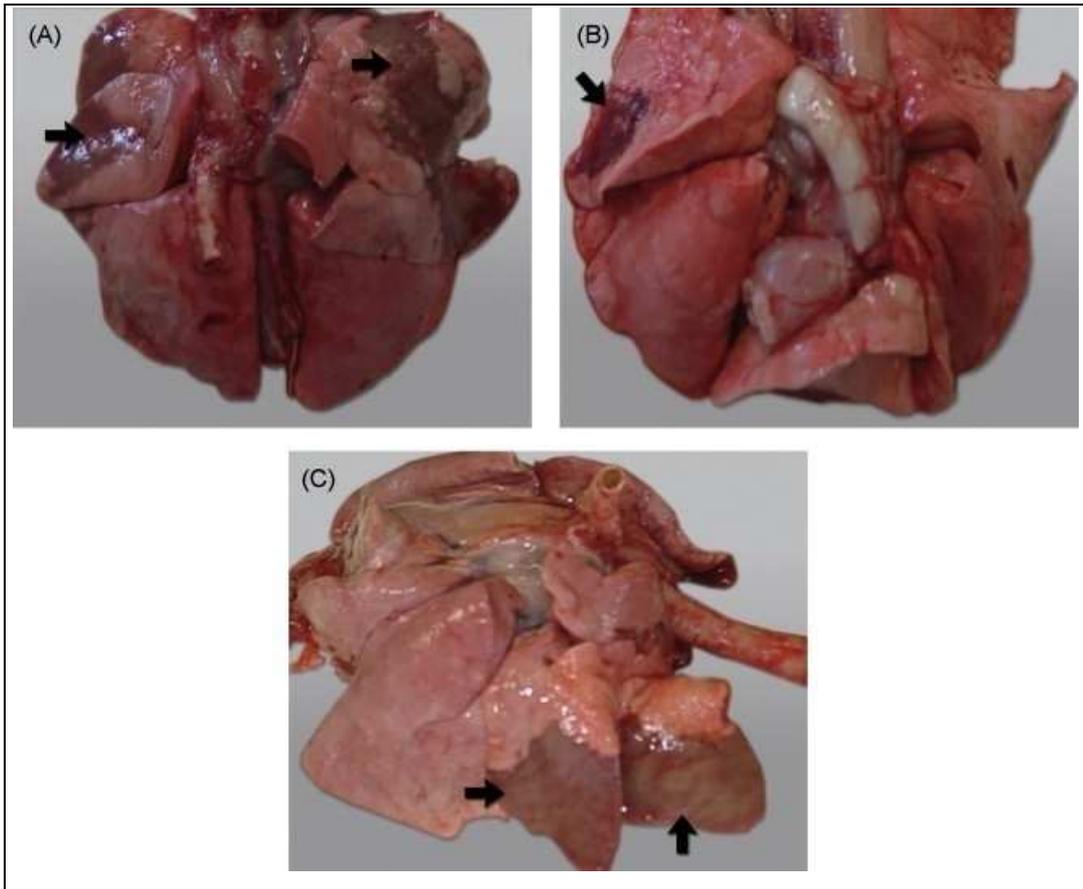


Abbildung 7: Lungen verendeter Greyhounds mit CIV-Infektion aus dem Jahr 2004. Die Pfeile markieren konsolidierte, atelektatische Lungenareale (JIRJIS et al., 2010).

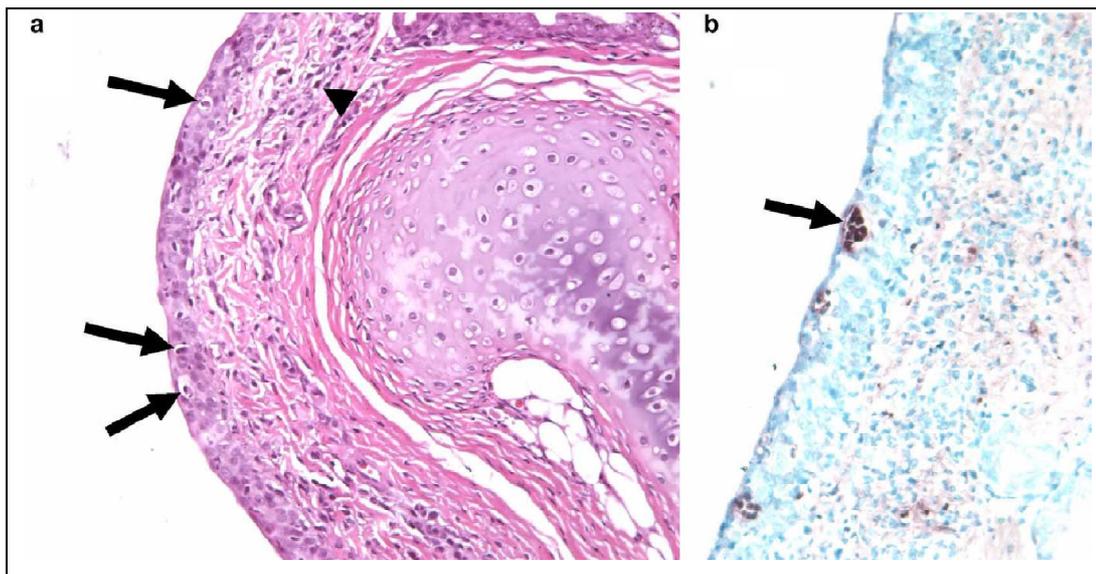


Abbildung 8: Nekrotisierende Tracheitis bei einem experimentell mit H3N2 infizierten Hund an Tag 3 nach Infektion. Auf Bild a ist squamöse Metaplasie

der Trachea mit neutrophilen Granulozyten und apoptotischen Einschlusskörperchen (Pfeile) zu sehen. Lymphozyten sowie mononukleäre Zellen bestimmen die Submucosa (Pfeilspitze). Bild b zeigt apoptotische neutrophile Granulozyten im Bereich der Läsion (Pfeil) (JUNG et al., 2010).

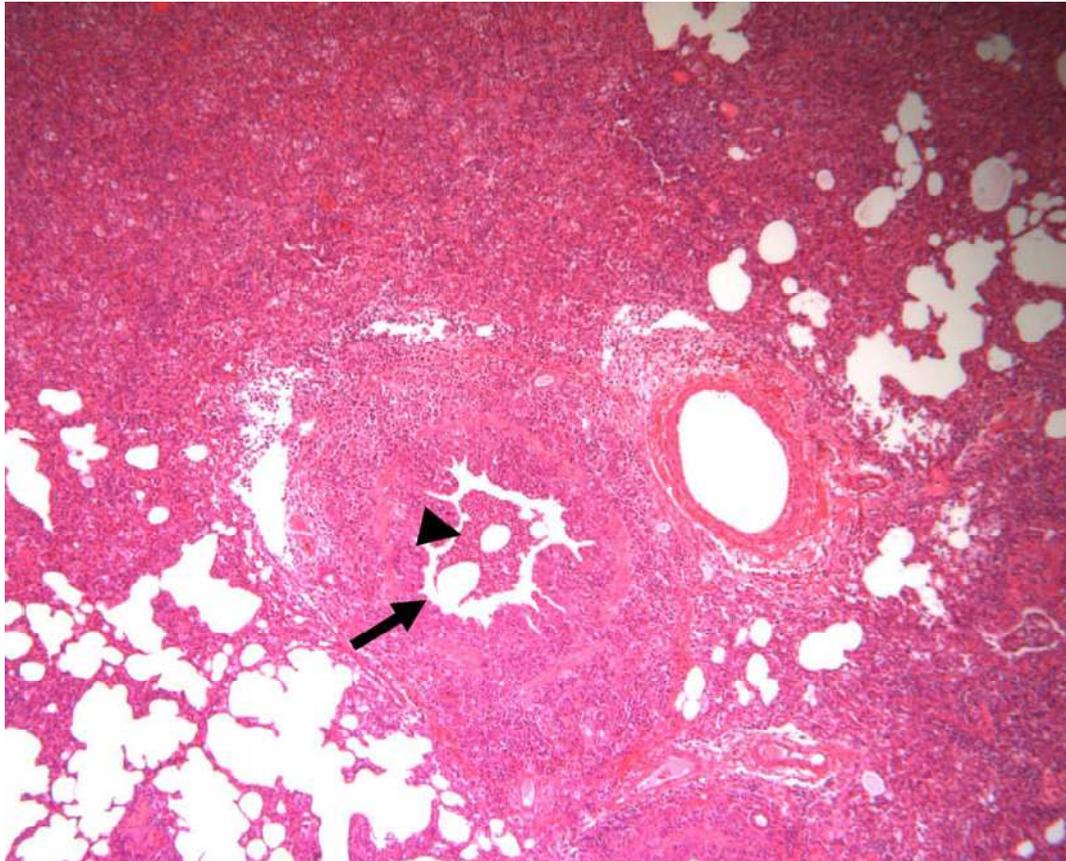


Abbildung 9: Bronchointerstitielle Pneumonie bei einem experimentell mit H3N2 infizierten Hund an Tag 6 nach Infektion. Bronchial- sowie Alveolarepithel sind hochgradig nekrotisch und befinden sich zusammen mit Entzündungszellen, wie neutrophilen Granulozyten, im Lumen der Luftwege (JUNG et al., 2010).

2.4.5. Virusnachweis

Man unterscheidet den direkten vom indirekten Virusnachweis. In den folgenden Kapiteln wird auf die einzelnen Nachweismethoden eingegangen.

2.4.5.1. Direkter Virusnachweis

Ein direkter Virusnachweis kann mittels Virusisolierung, Antigen-ELISA oder PCR aus Tupferprobenmaterial, aus Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit (BALF) oder aus frischem Lungen- oder Trachealgewebe von verstorbenen oder euthanasierten Hunden durchgeführt werden (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Eine Probennahme in der akuten Phase der Erkrankung ist für den Erfolg der genannten Methoden essentiell (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008; DUBOVI, 2010; RIVAILLER et al., 2010).

2.4.5.1.1. Virusisolierung

Die Virusisolierung kann sowohl im embryonierten Hühnerei als auch in Madin-Darby Canine Kidney- (MDCK-) Zellkultur erfolgen (GAUSH & SMITH, 1968; HARDER & VAHLENKAMP, 2010). Für den Nachweis im Hühnerei sollten die Proben mindestens einer Passage unterzogen werden, da sich Influenzaviren vom Subtyp H3 im embryonierten Hühnerei schlechter vermehren als andere Influenzavirus-Subtypen (DUBOVI & NJAA, 2008). Keine der beiden Methoden der Virusisolierung scheint der anderen überlegen zu sein (DUBOVI & NJAA, 2008). Um eine möglichst hohe Nachweisrate zu erreichen, sollten beide Methoden Verwendung finden (DUBOVI & NJAA, 2008). In der Regel sollten die Proben zunächst auf Influenzaviren generell untersucht werden und im Fall eines positiven Nachweises dann nach Virusisolierung der genaue Influenzavirus-Subtyp bestimmt werden (DUBOVI & NJAA, 2008). Bisher erfolgte die Virusisolierung meist im embryonierten Hühnerei, was zwar eine sehr sensitive, jedoch zeitintensive Methode darstellt, die etwa ein bis zwei Wochen in Anspruch nimmt. Zu diesem Zeitpunkt könnte der Virusnachweis jedoch bereits klinisch nicht mehr relevant sein (SPACKMAN et al., 2002).

2.4.5.1.2. Antigen-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Da bei Pferden der Antigen-ELISA eine etablierte Methode des direkten Virusnachweises darstellt, wäre die logische Folgerung daraus, dass diese Methode beim Hund ebenso erfolgversprechend sein könnte (DUBOVI & NJAA,

2008). Nasen- und Rachentupfer aus der akuten Phase der Erkrankung können mittels eines ELISA-Testkits für den Nachweis humaner Influenzaviren untersucht werden (DUBOVI & NJAA, 2008). Dieses Testkit ist zwar im Stande, CIV nachzuweisen, jedoch in seiner Sensitivität aufgrund der beim Hund im Vergleich zu Mensch, Schwein und Pferd niedrigeren Virusausscheidung herabgesetzt (DUBOVI & NJAA, 2008). Daher ist der Antigen-ELISA zwar nicht für einzelne an CIV-Infektionen erkrankte Hunde geeignet, mag jedoch im Fall einer Häufung von Krankheitsfällen innerhalb einer Population einen Ausbruch von CIV detektieren, da die Wahrscheinlichkeit in diesem Fall höher ist, dass sich einige der erkrankten Hunde in der Phase der höchsten Virusausscheidung befinden (DUBOVI & NJAA, 2008). Weitere Nachteile des Antigen-ELISA bestehen darin, dass es im Fall des Vorhandenseins von Antikörpern gegen Influenzavirus zu Kreuzreaktionen kommt (HARDER & VAHLENKAMP, 2010). Zudem sind kommerziell erhältliche ELISA-Testkits nicht Subtyp-spezifisch (HARDER & VAHLENKAMP, 2010).

2.4.5.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit der PCR können geringe Mengen an Virus nachgewiesen werden (CRAWFORD et al., 2005). Es kann jedoch aufgrund des Zeitpunktes der Probenentnahme zu falsch-negativen Ergebnissen kommen (CRAWFORD et al., 2005). Ein positives PCR-Ergebnis kann auch noch drei bis vier Tage nach Auftreten klinischer Symptome erzielt werden (DUBOVI & NJAA, 2008). Laut Dubovi und Njaa (2008) ist bereits ab dem dritten Tag nach Auftreten klinischer Symptome mit einer schlechten Sensitivität zu rechnen (RIVAILLER et al., 2010). Als ideales Probenmaterial haben sich laut einer Studie, bei der je 77 Nasen- und Rachentupfer experimentell infizierter Hunde auf CIV getestet wurden, Nasentupfer erwiesen (DUBOVI & NJAA, 2008). In der betreffenden Studie konnte nur bei 32 % der getesteten Hunde im Rachentupfer, hingegen bei 72 % der Studiehunde im Nasentupfer CIV nachgewiesen werden (DUBOVI & NJAA, 2008). Zudem konnte mit Hilfe dieser Studie belegt werden, dass nach Tag 8 bis 9 nach Infektion kein Virusnachweis mehr positiv verlief (DUBOVI & NJAA, 2008). Bei nahezu 75 % der PCR-positiven Proben gelingt eine

Virusisolierung im embryonierten Hühnerei (DUBOVI & NJAA, 2008). Im Fall einer postmortalen Untersuchung ist der Virusnachweis mittels PCR öfter erfolgreich als die Virusisolierung, da zum Zeitpunkt des Todes bereits eine Immunantwort stattgefunden hat, bei der durch die Bildung von Antikörpern Virus abgefangen und so die Virusisolierung erschwert wird (DUBOVI & NJAA, 2008).

Ein Vorteil der PCR ist, dass der Umgang mit infektiösem Material auf ein Mindestmaß reduziert wird (SPACKMAN et al., 2002). Zudem bietet die PCR den Vorteil der Zeitersparnis und der Reduktion des Risikos der Kreuzkontamination neuer Proben mit zuvor amplifizierten Produkten, da nach Ablauf der PCR kein Öffnen der Proben enthaltenden Röhrchen stattfindet (SPACKMAN et al., 2002). Der große Vorteil der PCR besteht in deren Geschwindigkeit, da bis zu 28 Proben in weniger als drei Stunden getestet werden können (SPACKMAN et al., 2002). Zudem kann mit Hilfe der Virusisolierung im embryonierten Hühnerei nur lebendes Virus, nicht aber durch Transport oder Desinfektionsmittel inaktiviertes Virus identifiziert werden, was mit Hilfe der PCR möglich ist (SPACKMAN et al., 2002). Dies erklärt, warum bei Proben, welche in der PCR positiv getestet werden, die Virusisolierung negativ ausfallen kann (SPACKMAN et al., 2002). Faktoren, welche die PCR negativ beeinflussen könnten, sind die PCR inhibierende, in der Probe befindliche Substanzen sowie ineffiziente RNA-Extraktion und das Potential von RNA, vor der Untersuchung zerstört zu werden (SPACKMAN et al., 2002). RNA ist relativ instabil und RNA-zerstörende Enzyme sind ubiquitär vorhanden (SPACKMAN et al., 2002). Zudem könnten Variationen in der RNA-Sequenz den RNA-Nachweis erschweren oder unmöglich machen. Darüberhinaus ist die PCR im Stande, nicht-infektiöse Partikel zu identifizieren, welche unter Umständen 90 % einer Virusaufbereitung ausmachen können (SPACKMAN et al., 2002).

2.4.5.2. Indirekter Virusnachweis

Ein indirekter Virusnachweis kann über die Detektion von CIV-spezifischen Antikörpern erfolgen. Der Antikörpernachweis stellt in Kombination mit der mikrobiologischen Untersuchung die genaueste Nachweismethode einer CIV-

Infektion dar, wenn die PCR bei einem Tier mit hohem Infektionsverdacht negativ verlief (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008; DUBOVI, 2010). Der indirekte Virusnachweis ist die einzige Möglichkeit, eine CIV-Infektion zu bestätigen, wenn Hunde zum Zeitpunkt der Vorstellung seit mehr als fünf Tagen Symptome zeigen (DUBOVI & NJAA, 2008). Für den Nachweis einer akuten Infektion sind Untersuchungen einer Serumprobe in der akuten Phase der klinischen Erkrankung, vor dem siebten Tag nach Auftreten der klinischen Symptome, sowie einer Blutprobe in der Rekonvaleszenzphase nach zehn bis 14 Tagen erforderlich (CRAWFORD et al., 2005). Eine vierfache Titererhöhung zwischen beiden Blutproben, spricht für eine akute Infektion mit CIV (CRAWFORD et al., 2005).

Für den indirekten Virusnachweis können HHT, VNT, ELISA, Immunfluoreszenztest (IFT) und Agar-Gel-Immun-Diffusionstest (AGID) verwendet werden (CRAWFORD et al., 2005). Der Nachweis von Antikörpern ist frühestens ab dem siebten Tag nach Auftreten klinischer Symptome möglich, da erst ab diesem Tag mit nachweisbar hohen Antikörper-Titern zu rechnen ist (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Dubovi und Njaa (2008) zufolge, ist ein Antikörper-Nachweis an Tag 8 bis 10 nach Infektion, also sechs bis acht Tage nach Auftreten klinischer Symptome, bereits möglich und erreicht an Tag 13 bis 14 Werte zwischen 1:512 und 1:1024 (DUBOVI & NJAA, 2008; ROSAS et al., 2008).

2.4.5.2.1. Hämagglutinationshemmtest

Mit Hilfe des HHT werden Antikörper gegen virales HA detektiert (LU et al., 1982). Zu beachten ist, dass für den Nachweis von CIV *tom turkey red blood cells* statt *chicken red blood cells* verwendet werden müssen, da Influenzaviren vom Subtyp H3 *turkey red blood cells* effektiver agglutinieren (DUBOVI & NJAA, 2008). Auf der Basis von Untersuchungen bei spezifisch pathogen-freien Hunden, bei denen HHT-Titer < 1:4 nachgewiesen wurden, wird ein HHT-Titer von > 1:32 als Beweis für das Vorliegen einer CIV-Infektion angesehen (PAYUNGPORN et al., 2008). Ab Tag sieben nach Infektion ist mittels HHT ein Antikörper-Titer messbar, wohingegen zu diesem Zeitpunkt meist kein Virus mehr im

Respirationstrakt nachweisbar ist (RIVAILLER et al., 2010). Ein Nachteil des HHT besteht darin, dass Säugetiersera häufig natürliche Inhibitoren der Hämagglutination enthalten und es deshalb zu falschen Testergebnissen kommen kann (LU et al., 1982).

2.4.5.2.2. Virusneutralisationstest

Neben dem HHT stellt der VNT eine weitere Methode des indirekten Erregernachweis dar (CRAWFORD et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008). Dieser ist als Routinetest laut Crawford und Mitarbeitern (2005) sowie Dubovi und Njaa (2008) zu aufwendig.

2.4.5.2.3. Antikörper-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Überdies ist ein Antikörper-Nachweis mittels ELISA möglich. Hierbei gelingt der Nachweis von Anti-Nukleoprotein-Antikörpern einer Studie von Lee und Mitarbeitern (2009) zufolge bereits ab Tag 6 *post infectionem*, wohingegen ein positiver Antikörper-Titer bei denselben experimentell infizierten Tieren mittels HHT erst am Tag 8 *post infectionem* nachgewiesen werden konnte. Der Nukleoprotein-ELISA stellt somit die sensitivere Testmethode dar (LEE et al., 2009). Zudem waren in dieser Studie elf bis 100 % der getesteten Hunde im ELISA Antikörper-positiv, wohingegen mittels HHT bei denselben Tieren nur Prävalenzen von 0 bis 35 % nachgewiesen werden konnten (LEE et al., 2009). In ihrer Studie zur Untersuchung des ELISA als Screeningtest konnten De Benedictis und Mitarbeiter (2010) eine Sensitivität von 94,0 % sowie eine Spezifität von 98,7 % ermitteln. Zudem eignet sich der ELISA als Testmethode, da im Gegensatz zum HHT der Kontakt zu jedem Influenzavirus-Subtyp nachgewiesen wird (DE BENEDICTIS et al., 2010). Mit Hilfe der Mikrotiterplatten können große Probenmengen in kurzer Zeit analysiert werden (DE BENEDICTIS et al., 2010). Somit stellt der ELISA eine hochsensitive sowie -spezifische Methode zum Nachweis einer Influenzavirus-Exposition beim Hund dar (DE BENEDICTIS et al., 2010). Positive Proben sollten jedoch, wie die Studie von De Benedictis und Mitarbeitern (2010) zeigt, mittels HHT oder IFT

nachgetestet werden. In dieser Studie waren zwar 82 von 6858 getesteten italienischen Hunden im ELISA positiv, jedoch konnten nur zwei der positiven Reagenten mittels HHT und IFT bestätigt werden. Es handelte sich somit vermutlich um 80 falsch-positive ELISA-Ergebnisse (DE BENEDICTIS et al., 2010). Die Spezifität und Sensitivität des HHT sowie des IFT konnten im Rahmen der genannten Studie aufgrund der geringen Anzahl an positiven Reagenten nicht ermittelt werden (DE BENEDICTIS et al., 2010).

2.4.5.2.4. Agar-Gel-Immun-Diffusionstest

Der AGID erwies sich im Rahmen der Studie von De Benedictis und Mitarbeitern (2010) als nicht geeignet zum Screening. Nur 43 der 97 positiven Kontrollsera konnten detektiert werden (DE BENEDICTIS et al., 2010). Diese Kontrollsera stammten von nachweislich im Jahr 2004 in Florida CIV-infizierten Greyhounds (DE BENEDICTIS et al., 2010).

2.4.5.2.5. Immunfluoreszenztest

Mit Hilfe des IFT werden Anti-Influenza-Antikörper mit dem Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat im Fluoreszenzmikroskop detektiert (DE BENEDICTIS et al., 2010). Die Vorteile liegen laut De Benedictis und Mitarbeitern (2010) darin, dass diese Methode wie auch der HHT eine Subtyp-spezifische Testung ermöglicht. Von Nachteil sind jedoch die hohen technischen Anforderungen an das Labor sowie die subjektive Interpretation der Ergebnisse (DE BENEDICTIS et al., 2010).

3. Andere Influenzavirussubtypen beim Hund

Nachdem in den letzten Jahren Influenzaviren bei Spezies wie Hund und Katze, die bisher einer Influenzavirusinfektion gegenüber als refraktär galten, nachgewiesen werden konnten (KEAWCHAROEN et al., 2004), wurden mehrere Studien hinsichtlich einer Interspezies-Übertragung verschiedener Influenzavirus-

Subtypen durchgeführt.

3.1. Influenza A Subtyp H3N2

Einer Studie von Choi und Mitarbeitern (2005) zufolge war ein aviärer Influenzavirusstamm vom Subtyp H3N2 in Süd-Korea auf den Hund übertragen worden (CHOI et al., 2005). Es gelang der Nachweis, dass eine Infektion mit H3N2 bei Hunden zur klinischen Erkrankung sowie zu einer Übertragung von Hund zu Hund und somit zu einer Ausbreitung in der Hundepopulation führen kann (SONG et al., 2008; SONG et al., 2009). Die Übertragung hochpathogener aviärer Influenzaviren vom Subtyp H3N2, die zwischen Mai und Dezember 2007 in Südkorea kursierten, auf Hunde konnte wiederholt in Tierkliniken nachgewiesen werden (SONG et al., 2008). Bei kaninen und aviären Isolaten lag eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen von über 97 % vor. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer direkten Übertragung des Virus vom Geflügel auf den Hund gekommen sein muss (SONG et al., 2009).

In einer Prävalenzstudie konnten Lee und Mitarbeiter (2009) in Korea bei im Haus gehaltenen Hunden aus Einzelhundehaltungen eine deutlich niedrigere Antikörper-Prävalenz (0,5 %) gegen H3N2 nachweisen als bei Tieren aus Hundefarmen sowie auf Tiermärkten, bei denen die Prävalenz bei bis zu 100 % lag (LEE et al., 2009).

Song und Mitarbeitern (2009) gelang die experimentelle Infektion von vier Beagles sowie deren Kontakthunden mit dem Isolat A/canine/Korea/01/07. Alle der kontaktfiziertierten sowie der intranasal infizierten Versuchshunde entwickelten Fieber sowie eine in der pathologischen Untersuchung nachweisbare multifokale Konsolidierung der Lunge, wie sie bereits bei Influenzavirusinfektionen anderer Spezies beschrieben worden war. Zudem traten massive Nekrosen und Entzündungen der oberen sowie der unteren Atemwege, multilobuläre nekrotisierende Tracheobronchitis, Bronchiolitis sowie Alveolitis auf. Virusausscheidung und Antikörper-Titer konnten ebenfalls bei allen infizierten Hunden nachgewiesen werden. Bei den intranasal infizierten Beagles waren in dieser Studie früher Virus und Antikörper-Titer nachweisbar als bei den

kontaktinfizierten Artgenossen (SONG et al., 2009).

Um die Korrelation zwischen der ausgeschiedenen Virusmenge und der Schwere der klinischen Symptome näher zu untersuchen, infizierten Song und Mitarbeiter (2011) einen zehn Wochen alten, Antikörper-negativen Beagle mit dem koreanischen Isolat und hielten diesen zusammen mit sieben weiteren Antikörper-negativen Beagles. Bei vier der Kontakthunde sowie dem experimentell infizierten Beagle wurden über 14 Tage klinische Symptome wie Husten, Niesen, Nasenausfluss sowie Fieber beobachtet (SONG et al., 2011). Eine Virusausscheidung fand bei allen acht Hunden statt. Diese fiel bei den symptomatischen Hunden deutlich höher aus als bei den asymptomatischen Studienteilnehmern (SONG et al., 2011). Das lässt darauf schließen, dass die Höhe der Virusausscheidung mit dem Schweregrad der klinischen Symptomatik korreliert (WRIGHT PF, 2007; JIRJIS et al., 2010).

Eine weitere großangelegte Prävalenzstudie in Japan ergab, dass 12 von insgesamt 582 Hunden Antikörper gegen H3N2 aufwiesen. Dies entspricht einer Prävalenz von 2,1 % (SAID et al., 2010).

3.2. Influenza A Subtyp H5N1

In Asien, Europa sowie Afrika kam es zu einer Verbreitung hochpathogener Influenzaviren vom Subtyp H5N1 bei zahlreichen Spezies. Zunächst wurde von Erkrankungsfällen bei Feliden berichtet (KEAWCHAROEN et al., 2004; THANAWONGNUWECH et al., 2005; KLOPFLEISCH et al., 2007; LESCHNIK et al., 2007). Erkrankungsfälle wurden auch bei thailändischen Hunden nachgewiesen. Unter 629 Hunden wurde eine Antikörper-Prävalenz von 25 % in Thailand ermittelt (BUTLER, 2006). Katzen sowie Tiger hatten sich durch den Verzehr kontaminierten Geflügelfleisches infiziert (SONGSERM et al., 2006).

Als im Oktober 2004 ein Hund infolge des Verzehrs infizierten Entenfleisches schwere klinische Symptome entwickelte und schließlich daran verendete, gelang Songserm und Mitarbeitern (2006) die Virusisolierung aus Proben des Hundes im embryonierten Hühnerei. Das Isolat wurde als A/dog/Thailand/KU-08/04 bezeichnet und phylogenetische Analysen des HA sowie der NA ergaben Identität

mit Isolaten von Tigern, Hühnern, Enten und Menschen (SONGSERM et al., 2006).

Bei einer experimentellen Infektion, die Giese und Mitarbeiter (2008) in Deutschland durchführten, konnten Katzen erfolgreich mit dem Isolat A/cat/Germany/R606/2006 infiziert werden. Lediglich bei einem der Kontakthunde hingegen konnten Antikörper sowie Virus nachgewiesen werden (GIESE et al., 2008). Im Rahmen des Experiments hatte man vier Hunde und drei Katzen nasopharyngeal mit dem oben genannten Isolat inokuliert (GIESE et al., 2008). Es kam zu keiner nennenswerten Kontaktinfektion zwischen beiden Spezies, wohl aber zu einer schweren Erkrankung der experimentell infizierten Katzen (GIESE et al., 2008). Aus diesem Experiment kann gefolgert werden, dass Katzen empfänglicher für eine Infektion sind als Hunde (GIESE et al., 2008). Es handelte sich um klinisch gesunde Hunde und ein schwerer Krankheitsverlauf kann bei immunsupprimierten sowie kranken Tieren nicht ausgeschlossen werden (GIESE et al., 2008).

III. Material und Methoden

1. Material

An der vorliegenden Studie nahmen 310 Hunde teil. Untersucht wurden Hunde mit akuten respiratorischen Symptomen sowie klinisch gesunde Hunde. Die Gruppe der klinisch gesunden Hunde setzte sich aus gesunden Greyhounds, gesunden Hunden anderer Windhunderassen, wie Afghane, Saluki, Whippet oder Barsoi, und einer gesunden Kontrollgruppe aus Nicht-Windhunden jeglicher Rasse inklusive Mischlingen zusammen. Die Probensammlung erfolgte zwischen dem 01.04.2010 und dem 31.05.2011.

1.1. Gesunde Hunde

Die Gruppe der klinisch gesunden Hunde bestand aus insgesamt 272 Hunden, bei denen die klinische Untersuchung, abgesehen von dermatologischen Problemen, beispielsweise aufgrund einer Futtermittelallergie, oder orthopädischen Erkrankungen, wie Coxarthrose oder Hüftdysplasie, ohne besonderen Befund verlief. Die Studienteilnehmer dieser Gruppe ließen sich in nachfolgende drei Untergruppen unterteilen. Bei den Vertretern der Greyhounds musste es sich um reinrassige Greyhounds handeln und bei den Windhunden anderer Rassen um reinrassige Vertreter der jeweiligen Windhunderasse. Ergab die klinische Untersuchung Auffälligkeiten, wie eine erhöhte Körpertemperatur, reduziertes Allgemeinbefinden, verschärfte Atemgeräusche bei der Lungenauskultation, ein Herzgeräusch, Nasenausfluss oder war Husten auslösbar, so führte dies zum Ausschluss aus der Studie.

1.1.1. Greyhounds

In die Gruppe der gesunden Greyhounds wurden klinisch gesunde Hunde der Rasse Greyhound unabhängig von Alter und Rennaktivität aufgenommen. Hierbei ist zu beachten, dass es zwei genetisch nahezu komplett voneinander getrennte Linien, die Renn- und die Showlinie, gibt und in den USA nahezu ausschließlich

Vertreter der Rennlinie erkrankt sind, da diese dort, wie auch in Deutschland, wesentlich weiter verbreitet sind. Es wurden 88 Vertreter der Rennlinie und 23 Vertreter der Showlinie in die Studie eingeschlossen. Die Blutprobenentnahme erfolgte hauptsächlich im Rahmen von Hundezucht- und -rennveranstaltungen.

1.1.2. Hunde anderer Windhunderassen

Neben den Greyhounds wurden zusätzlich 58 gesunde Hunde anderer Windhunderassen wie Whippet, Saluki, Barsoi, Afghane, Deerhound, Galgo Español und Magyar Agar in die Studie eingeschlossen.

1.1.3. Nicht-Windhunderassen

Diese Gruppe setzte sich aus klinisch gesunden Hunden jeglicher Rasse und jeglichen Alters zusammen. Von insgesamt 103 Hunden dieser Gruppe stammten 29 (28,2 %) von Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik München. Zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme befanden sich 9/103 (8,7 %) gesunden Nicht-Windhunden im Besitz der Windhundeeigentümer und wurden im Rahmen von Hunderennen beprobt und 8/103 (7,8 %) Hunden befanden sich zu diesem Zeitpunkt in Hundezuchten.

1.2. Akut respiratorisch erkrankte Hunde

In die Gruppe der Hunde mit akuten respiratorischen Symptomen wurden zunächst 38 Tiere aufgenommen, die seit höchstens 14 Tagen an Husten, Niesen oder Nasenausfluss litten. Einige dieser Tiere zeigten zugleich unspezifische Symptome wie Leistungsschwäche oder Inappetenz. Tiere, bei denen die respiratorische Symptomatik bereits länger als 14 Tage andauerte, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Zudem wurden Hunde, bei denen sich im weiteren Verlauf aus bildgebender Diagnostik wie Röntgen, Endoskopie oder Echokardiographie Hinweise auf Erkrankungen anderer Genese, wie Neoplasien, Herzerkrankungen oder anatomische Missbildungen (Brachycephalensyndrom,

Trachealkollaps, Epiglottic Entrappement) des Respirationstraktes ergaben, aus der Studie ausgeschlossen. Drei akut respiratorisch kranke Hunde mussten wegen anderer Grunderkrankungen, die ursächlich für die respiratorische Symptomatik waren, aus der Studie ausgeschlossen werden und eine Besitzerin stimmte der Blutprobenentnahme bei ihrem Hund nicht zu. Somit lagen Blutproben von 34 an akuter respiratorischer Symptomatik erkrankten Studientieren sowie Nasen- und Rachentupfer von 35 Studienteilnehmern aus dieser Gruppe zur Analyse vor.

1.3. Signalement

Das Signalement jedes Patienten wurde in den im Folgenden aufgeführten Punkten in Tabellen festgehalten und statistisch ausgewertet.

1.3.1. Alter

Bei 301 der 307 Studienteilnehmer (98,0 %) war das Alter bekannt.

1.3.1.1. Gesunde Hunde

Bei 266/272 (97,8 %) gesunden Studienteilnehmern lagen Altersangaben vor. Das jüngste Tier war zwei Monate, der älteste Hund 14 Jahre und sieben Monate zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Bei sechs Hunden lag keine Information zu deren Alter vor. Tabelle 3 ist das Alter der einzelnen Gruppen der gesunden Hunde zu entnehmen.

1.3.1.2. Kranke Hunde

Tabelle 3 zeigt einen Überblick über die Altersverteilung der gesunden und der kranken Studienteilnehmer.

Tabelle 3: Alter der Studienteilnehmer (in Jahren); (n = Anzahl der Vertreter der Gruppe, bei denen Angaben zu deren Alter vorlagen; Min. = Minimum; Max. = Maximum)

Gruppen	Min.	Max.	Median	Mittelwert	Standardabweichung
Greyhounds (n = 105)	0,2	14,0	4,3	4,98	3,60
andere Windhund- rassen (n = 58)	0,5	14,5	3,8	4,81	3,52
gesunde Nicht- Windhunde (n = 103)	0,5	14,6	5,0	5,38	3,42
gesunde Hunde gesamt (n = 266)	0,2	14,6	4,3	5,10	3,51
kranke Hunde (n = 35)	0,3	12,8	3,0	4,33	4,07
Studienteil- nehmer gesamt (n = 301)	0,2	14,6	4,0	5,01	3,58

1.3.1.3. Altersvergleich

Der einzige statistisch signifikante Altersunterschied ergab sich beim Vergleich der Gruppe der gesunden Nicht-Windhunde mit den kranken Hunden. Beide Gruppen unterschieden sich bezüglich des Alters mit einem p-Wert von 0,038 signifikant. Hierbei waren die Studienteilnehmer aus der Gruppe der kranken Hunde signifikant jünger als die Vertreter der klinisch gesunden Nicht-Windhunde. Der Vergleich der restlichen Gruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Tabelle 4 zeigt jeweils die Ergebnisse des Altersvergleichs der einzelnen Gruppen.

Tabelle 4: Ergebnisse des Altersvergleichs (in Jahren) der einzelnen Gruppen; der fettgedruckte p-Wert ist mit $< 0,050$ statistisch signifikant

Gruppen	Greyhounds	andere Windhundrassen	Nicht-Windhunde	kranke Hunde
Greyhounds	-	0,812	0,338	0,216
andere Windhundrassen	0,812	-	0,249	0,193
Nicht-Windhunde	0,338	0,249	-	0,038
kranke Hunde	0,216	0,193	0,038	-

1.3.2. Geschlecht

Das Geschlecht jedes Studienteilnehmers wurde erfasst und im Anschluss ausgewertet.

1.3.2.1. Gesunde Hunde

Bei allen der 272 Studientiere lag eine Angabe zu deren Geschlecht vor. Tabelle 5 zeigt die Geschlechtsverteilung der einzelnen Studienteilnehmer.

Tabelle 5: Geschlechtsverteilung der einzelnen Gruppen der 272 klinisch gesunden Studienteilnehmer

Geschlecht	Gruppe	Anzahl	Anteil an der Gesamtheit der jeweiligen Gruppe (%)
männlich intakt	gesunde Hunde gesamt	97/272	35,7
	Greyhounds	48/111	43,2
	Windhunde (ausser Greyhounds)	26/58	44,8
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	23/103	22,3
männlich kastriert	gesunde Hunde gesamt	23/272	8,5
	Greyhounds	1/111	0,9
	Windhunde (ausser Greyhounds)	2/58	3,4
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	20/103	19,4
weiblich intakt	gesunde Hunde gesamt	92/272	33,8
	Greyhounds	52/111	46,8
	Windhunde (ausser Greyhounds)	24/58	41,4
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	16/103	15,5
weiblich kastriert	gesunde Hunde gesamt	60/272	22,1
	Greyhounds	10/111	9,0
	Windhunde (ausser Greyhounds)	6/58	10,3
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	44/103	42,7

1.3.2.2. Kranke Hunde

Bei allen Vertretern dieser Gruppe lagen Informationen zu deren Geschlecht vor. Tabelle 6 zeigt die Geschlechtsverteilung der an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunde.

Tabelle 6: Geschlechtsverteilung der 35 an akuter respiratorischer Symptomatik erkrankten Hunde

Geschlecht	Anzahl	Anteil an der Gesamtheit der kranken Hunde (%)
männlich intakt	16	45,7
männlich kastriert	6	17,1
weiblich intakt	4	11,4
weiblich kastriert	9	25,7

1.3.3. Rasse

Die Rasse der einzelnen Studienteilnehmer wurde für die Gruppe der klinisch gesunden Hunde (ausser Windhunde) und Windhunde anderer Rassen sowie die Gruppe der an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunde erfasst. In die Gruppe der klinisch gesunden Greyhounds wurden ausschließlich reinrassige Greyhounds eingeschlossen. Berücksichtigt wurde, ob es sich um einen Vertreter der Renn- oder der Showlinie handelte.

1.3.3.1. Gesunde Hunde

Bei allen 272 gesunden Hunden lag eine Angabe zu deren Rasse vor. Die Gruppe der 111 klinisch gesunden Greyhounds setzte sich aus 23 (20,7 %) Vertretern der Showlinie und 88 (79,3 %) Vertretern der Rennlinie zusammen. Die Show-Greyhounds zeichnen sich durch einen großrahmigeren Körperbau sowie eine geringere Bemuskelung aus und werden lediglich zu Ausstellungszwecken gezüchtet. Der prozentuale Anteil der klinisch gesunden Greyhounds an der Gesamtpopulation der klinisch gesunden Hunde lag mit insgesamt 111 Vertretern bei 40,8 %. Einige Vertreter der Showlinie nahmen nicht ausschließlich an Zuchtausstellungen, sondern gelegentlich an sogenannten „Coursing“-Rennen auf Grasrennbahnen teil und waren somit nicht gänzlich vom Rennsport ausgeschlossen. Dies war unter den 23 Studienteilnehmern der Showlinie nur bei einem (4,3 %) Hund der Fall. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über die Rasseverteilung der Windhunde (ausser Greyhounds).

Tabelle 7: Rasseverteilung der 58 Vertreter der Gruppe der Hunde anderer Windhunderassen

Rasse	Anzahl der Vertreter	Anteil der Vertreter an der gesamten Gruppe (%)
Whippet	19	32,8
Saluki	16	27,6
Barsoi	14	24,1
Afghane	4	6,9
Deerhound	3	5,2
Galgo Español	1	1,7
Magyar Agar	1	1,7

In der Gruppe der gesunden Hunde (ausser Windhunde) waren mit 45 von 103 (43,7 %) Hunden Mischlinge aus verschiedenen Rassen am häufigsten vertreten. Tabelle 8 zeigt die Rasseverteilung der Vertreter der klinisch gesunden Nicht-Windhunde.

Tabelle 8: Rasseverteilung der 103 klinisch gesunden Nicht-Windhunde

Rasse	Anzahl der Vertreter	Anteil an der Gruppe der gesunden Nicht-Windhunde (%)
Mischling	45	43,7
Labrador Retriever	9	8,7
Deutscher Schäferhund	8	7,8
Jack Russel Terrier	4	3,9
Mops	4	3,9
Border Collie	3	2,9
Golden Retriever	3	2,9
Australian Shepherd	2	1,9
Beagle	2	1,9
Dackel	2	1,9
Australian Cattle dog	2	1,9
Königspudel	2	1,9
Havanese	2	1,9
Entlebucher Sennenhund	1	1,0
Boxer	1	1,0
Weimaraner	1	1,0
Irish Setter	1	1,0
Magyar Vizsla	1	1,0
Spitz	1	1,0
Fox Terrier	1	1,0
Rhodesian Ridgeback	1	1,0
Berner Sennenhund	1	1,0
Portuguese Waterdog	1	1,0
Papillon	1	1,0
Kanadischer Schäferhund	1	1,0
Gordon Setter	1	1,0
Belgischer Schäferhund	1	1,0
Shi Tzu	1	1,0

1.3.3.2. Kranke Hunde

Mit 9/35 Hunden (25,7 %) waren Mischlinge unter den an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunden, wie in der Gruppe der klinisch gesunden Hunde (ausser Windhunde), am häufigsten vertreten. Tabelle 9 zeigt die Rasseverteilung der kranken Hunde.

Tabelle 9: Rasseverteilung der 35 an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Studienteilnehmer

Rasse	Anzahl der Vertreter	Anteil an der Gruppe der kranken Hunde (%)
Mischling	9	25,7
Australian Shepherd	3	8,6
Magyar Vizsla	3	8,6
Zwergpinscher	3	8,6
Labrador Retriever	2	5,7
Dobermann	2	5,7
Siberian Husky	2	5,7
Beagle	1	2,9
Boxer	1	2,9
Dackel	1	2,9
Mops	1	2,9
Rhodesian Ridgeback	1	2,9
Mittelschnauzer	1	2,9
Yorkshire Terrier	1	2,9
Leonberger	1	2,9
Französische Bulldogge	1	2,9
Airedale Terrier	1	2,9
Toy-Pudel	1	2,9

1.4. Jahreszeitliche Verteilung

Der Zeitpunkt der Probenentnahme wurde ebenfalls tabellarisch erfasst, um anschließend im Fall eines positiven Ergebnisses statistisch auswerten zu können, ob positive Reagenten mit einer bestimmten Jahreszeit korrelierten.

1.4.1. Gesunde Hunde

Vom 01.04.2010 bis 31.05.2011 wurden 272 Blutproben von klinisch gesunden Hunden entnommen. Abbildung 10 zeigt die jahreszeitliche Verteilung der Blutprobenentnahme bei den gesunden Hunden der drei verschiedenen Gruppen.

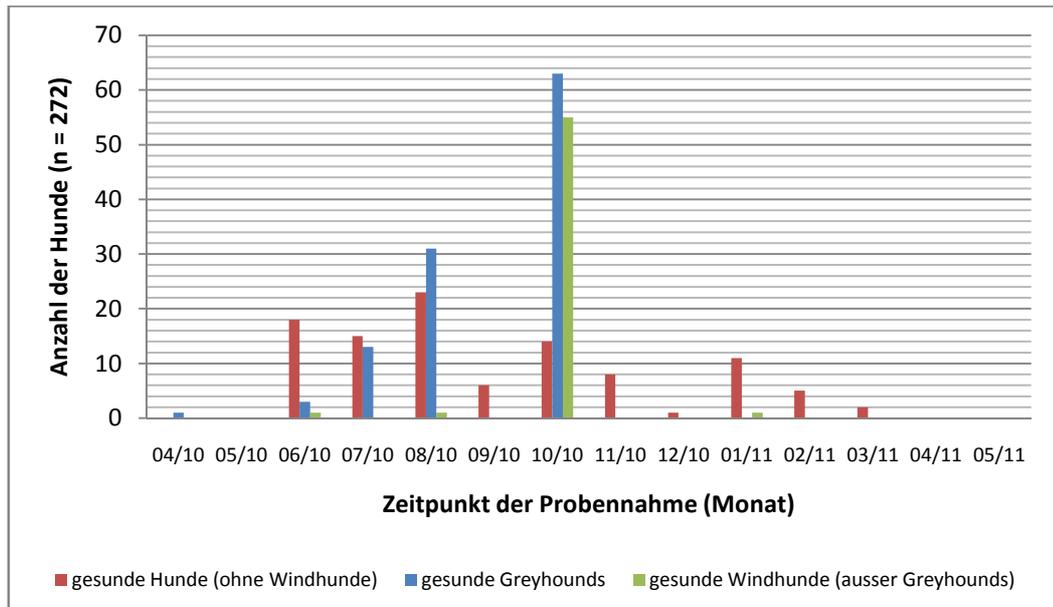


Abbildung 10: Jahreszeitliche Verteilung des Zeitpunktes der Blutprobenentnahme bei klinisch gesunden Hunden

1.4.2. Kranke Hunde

Die Blutproben der kranken Hunde wurden im Zeitraum vom 01.05.2010 bis 31.05.2011 gewonnen. Mit 14/35 (40,0 %) wurden die meisten Blut- sowie Tupferproben innerhalb der Gruppe der aufgrund akuter respiratorischer Symptome vorgestellten Hunde im November 2010 gewonnen. Abbildung 11 zeigt die jahreszeitliche Verteilung der Blut- und Tupferprobenentnahmen für diese Gruppe.

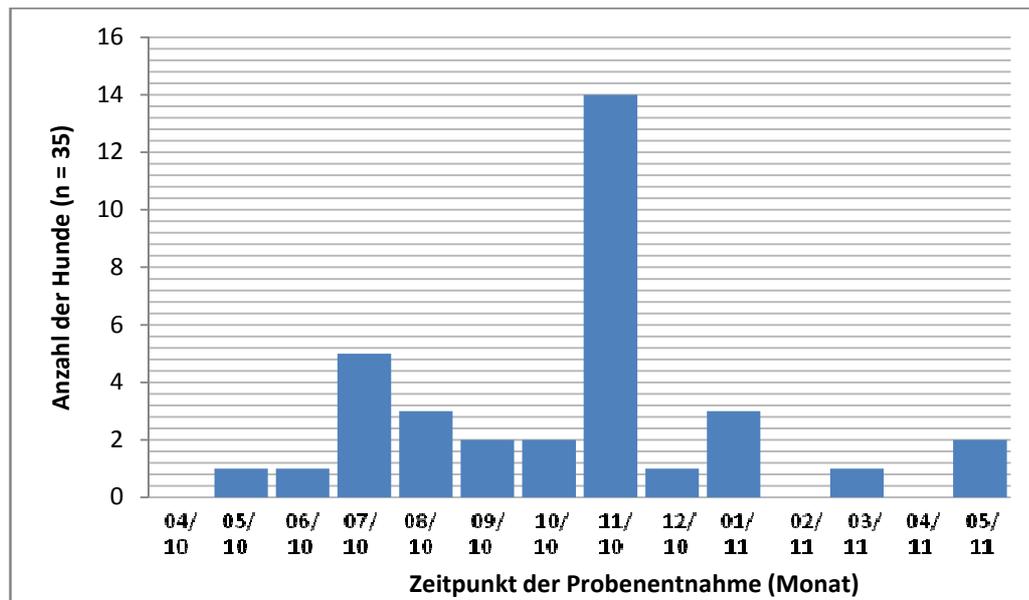


Abbildung 11: Jahreszeitliche Verteilung des Zeitpunktes der Entnahme von Blut- und Tupferproben bei Hunden mit akuten respiratorischen Symptomen

1.5. Wohnort der Besitzer

Der Wohnort der Besitzer wurde zu jedem Studienpatienten notiert. Einschlusskriterium für alle Studienteilnehmer war eine Herkunft aus Deutschland. Die Studienteilnehmer stammten mit Ausnahme von sieben Hunden, die sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme auf Gut Aiderbichl in Oberösterreich, im Grenzgebiet zu Deutschland befanden, aus dem gesamten deutschen Raum.

1.5.1. Gesunde Hunde

Ein Großteil der gesunden Hunde stammte mit 58/272, darunter 42 Nicht-Windhunde, aus München. Abbildung 12 zeigt die Verteilung der Wohnorte der Besitzer der klinisch gesunden Hunde.

1.5.2. Kranke Hunde

Mit 21/35 (60,0 %) stammten die meisten Hunde mit akut aufgetretenen respiratorischen Symptomen aus dem Raum München. Abbildung 13 zeigt die Verteilung der kranken Hunde in Deutschland.

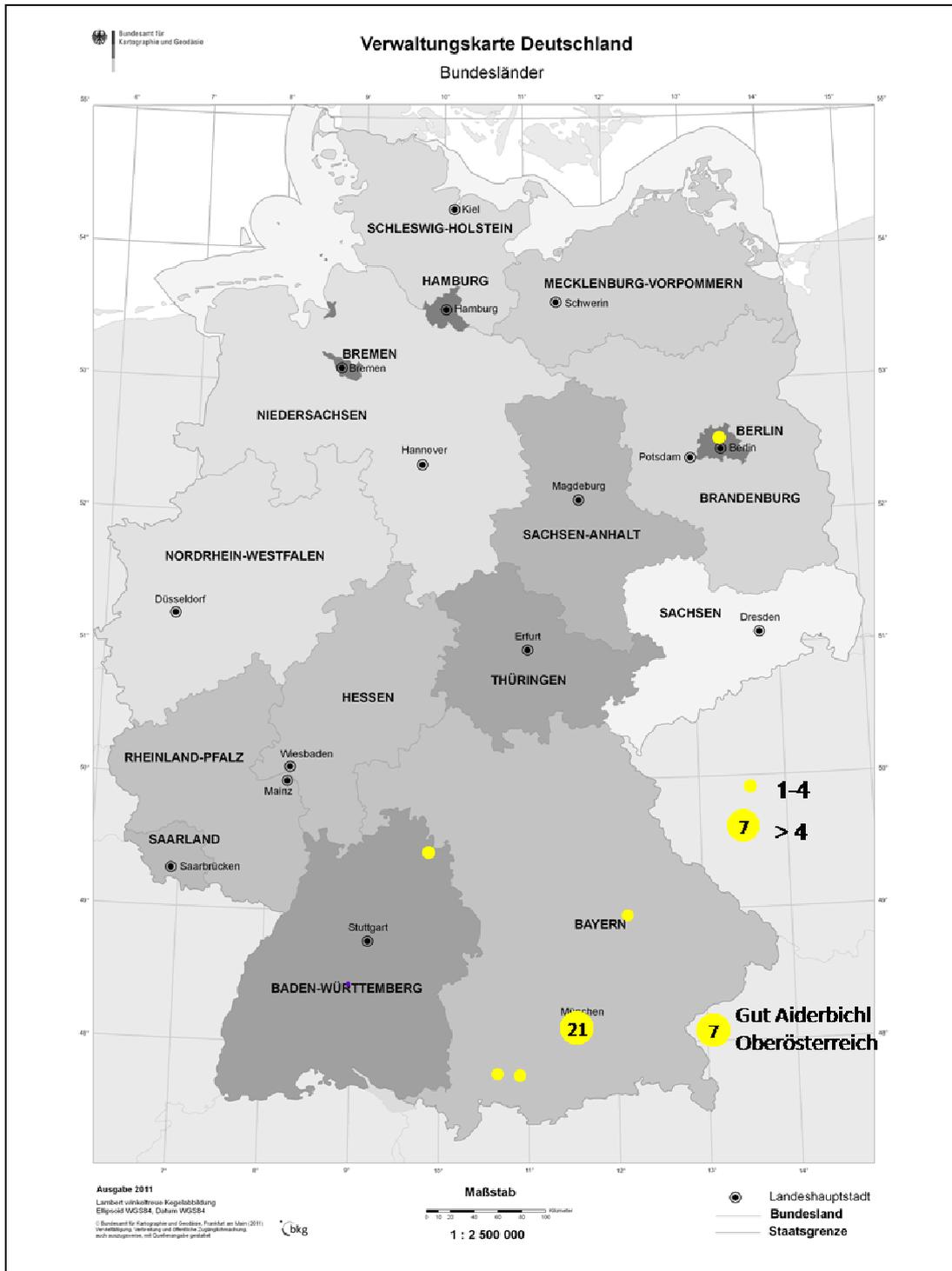


Abbildung 13: Überblick über die Verteilung der Wohnorte der akut respiratorisch erkrankten Studienteiere in Deutschland (modifiziert nach <http://www.bkg.bund.de>, aufgerufen am 19.09.2011)

1.6. Anamnese

Zu jedem Patienten wurde eine genaue Anamnese nach einem standardisierten Besitzerfragebogen erhoben, der sich für die jeweilige Gruppe im Anhang befindet. Die folgenden Punkte wurden anamnestisch erfasst.

1.6.1. Anzahl der Hunde pro Haushalt

Es wurde tabellarisch notiert, ob der jeweilige Studienteilnehmer aus einem Ein- oder Mehrhundehaushalt stammte, da die Hundedichte pro Haushalt im Fall einer Infektionskrankheit von Bedeutung ist.

1.6.1.1. Gesunde Hunde

Bei zwei Greyhounds lagen keine Informationen zu den Haltungsbedingungen vor. Die folgende Tabelle 10 veranschaulicht die Haltungsbedingungen der 270 gesunden Hunde, bei denen Informationen zu diesem Punkt vorlagen. Die Mehrzahl der Studienteilnehmer stammte aus Mehrhundehaltungen.

Tabelle 10: Überblick über die Haltungsform der 270 gesunden Hunde, bei denen Informationen vorlagen, ob sie aus Einzel- oder Mehrhundehaushalten stammten

Haltungsform	Gruppe	Anzahl	Anteil an der Gesamtheit der jeweiligen Gruppe (%)
Einzelhaltung	gesunde Hunde gesamt	53/270	19,6
	Greyhounds	0/109	0,0
	Windhunde (ausser Greyhounds)	1/58	1,7
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	51/103	49,5
Mehrhundehaushalt	gesunde Hunde gesamt	217/270	80,4
	Greyhounds	109/109	100,0
	Windhunde (ausser Greyhounds)	57/58	98,3
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	52/103	50,5

1.6.1.2. Kranke Hunde

Als Einzelhunde wurden 14/34 (41,2 %) der an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunde gehalten. Aus Mehrhundehaushalten stammten 20/34 (58,8 %) Vertretern dieser Gruppe, bei denen Informationen zum Vorhandensein anderer Hunde im gleichen Haushalt vorlagen. Bei einem der Studienteilnehmer dieser Gruppe lag hierzu keine Angabe vor. Von den 35 Hunden stammten sieben (20,0 %) aus einer Tierschutzeinrichtung und waren alle zum Zeitpunkt der Probenentnahme an Husten, Niesen sowie Nasenausfluss erkrankt.

1.6.2. Kontakt zu anderen Hunden

Auch die Häufigkeit des Kontaktes der jeweiligen Studienteilnehmer zu fremden Hunden wurde erfragt. Hierbei gab es als Antwortmöglichkeit „gelegentlich“, „regelmäßig“ oder „ständig“. Als „gelegentlich“ wurde etwa einmal pro Monat, als „regelmäßig“ etwa ein- bis zweimal pro Woche und als „ständig“ mehrmals täglich oder permanent gewertet. Hunde von Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik München oder solche, die sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in einer Tierschutzeinrichtung befanden, hatten beispielsweise ständig Kontakt zu anderen Hunden, wohingegen Studienpatienten in Zwinger- oder Kettenhaltung gelegentlich Kontakt zu anderen Hunden hatten und Hundekontakt im Rahmen des Besuchs einer Hundeschule einmal pro Woche als „regelmäßig“ gewertet wurde.

1.6.2.1. Gesunde Hunde

Bei zwei Greyhounds lagen keine Informationen zur Häufigkeit des Kontaktes mit anderen Hunden vor. Tabelle 11 zeigt die Häufigkeit des Kontaktes zu anderen Hunden für die 270 Studienteilnehmer, bei denen Informationen hierzu vorlagen. In der Gruppe der klinisch gesunden Greyhounds hatte, im Gegensatz zu den gesunden Nicht-Windhunden, die Mehrheit regelmäßig Kontakt zu anderen Hunden. Gleiches galt für die gesunden Windhunde anderer Rassen.

Tabelle 11: Übersicht über die Häufigkeit des Kontaktes zu anderen Hunden bei den einzelnen Studienteilnehmern der verschiedenen Gruppen

Häufigkeit des Hundekontakts	Gruppe	Anzahl	Anteil an der Gesamtheit der jeweiligen Gruppe (%)
„gelegentlich“	gesunde Hunde gesamt	15/270	5,6
	Greyhounds	8/109	7,3
	Windhunde (ausser Greyhounds)	1/58	1,7
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	6/103	5,8
„regelmäßig“	gesunde Hunde gesamt	135/270	50,0
	Greyhounds	62/109	56,9
	Windhunde (ausser Greyhounds)	30/58	51,7
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	43/103	41,7
„ständig“	gesunde Hunde gesamt	120/270	44,4
	Greyhounds	39/109	35,8
	Windhunde (ausser Greyhounds)	27/58	46,6
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	54/103	52,4

1.6.2.2. Kranke Hunde

Bei drei (8,6 %) der akut respiratorisch erkrankten Hunde lagen keine Informationen zu der Häufigkeit des Kontaktes zu anderen Hunden vor. Von den übrigen 32 Hunden hatten acht (25,0 %) laut ihrer Besitzer gelegentlich Kontakt zu anderen Hunden, 6/32 (18,8 %) regelmäßig und 18 Hunde (56,3 %) aus dieser Population hatten ständig Kontakt zu fremden Hunden.

1.6.3. Kontakt zu Pferden

Neben dem Kontakt zu Artgenossen wurde auch Pferdekontakt evaluiert. Schon gegenseitiges Beschnupern von Pferd und Hund wurde als Pferdekontakt gewertet.

1.6.3.1. Gesunde Hunde

Bei drei Greyhounds lag keine Information zu Pferdekontakt vor. Die 269 gesunden Hunde, bei denen zu diesem Punkt Angaben vorlagen, sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Übersicht über Pferdekontakt bei den 269 Studienteilnehmern

Pferdekontakt	Gruppe	Anzahl	Anteil an der Gesamtheit der jeweiligen Gruppe (%)
bestehend	gesunde Hunde gesamt	106/269	39,4
	Greyhounds	16/108	14,8
	Windhunde (ausser Greyhounds)	32/58	55,2
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	58/103	56,3
nicht bestehend	gesunde Hunde gesamt	163/269	60,6
	Greyhounds	92/108	85,2
	Windhunde (ausser Greyhounds)	26/58	44,8
	gesunde Hunde (ausser Windhunde)	45/103	43,7

1.6.3.2. Kranke Hunde

Von den 35 Hunden mit Atemwegserkrankungen lagen bei vier (11,4 %) keine Informationen zu Pferdekontakt in der Vergangenheit vor. Zehn der 31 (32,3 %) Vertreter dieser Gruppe, bei denen Informationen bezüglich Pferdekontakt vorlagen, hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme Kontakt zu Pferden gehabt, 21 (67,7 %) hingegen nicht.

1.6.4. Respiratorische Vorerkrankungen

Die Besitzer der einzelnen Studienpatienten wurden befragt, ob ihr Hund in der Vergangenheit bereits respiratorische Symptome in Form von Husten, Niesen oder Nasenausfluss gezeigt hatte.

1.6.4.1. Gesunde Hunde

Bei vier der 272 klinisch gesunden Hunde lagen keine Angaben zu respiratorischen Vorerkrankungen vor. Von 268 Hunden hatten 71 (26,5 %) bereits in der Vergangenheit eine Erkrankung des Respirationstraktes mit Symptomen wie Husten, Niesen oder Nasenausfluss gezeigt. Hierbei waren 23/107 (21,5 %) klinisch gesunden Greyhounds, 21/58 (36,2 %) Windhunden anderer Rassen sowie 27/103 (26,2 %) klinisch gesunden Nicht-Windhunden betroffen. Somit hatte die Mehrheit der klinisch gesunden Studienteilnehmer keine Atemwegserkrankungen in der Vergangenheit gezeigt.

1.6.4.2. Kranke Hunde

Sieben der 33 (21,2 %) wegen einer Erkrankung des Respirationstraktes vorstelligen Hunde, bei denen Informationen bezüglich respiratorischer Vorerkrankungen vorlagen, hatten bereits in der Vergangenheit Symptome, wie Husten, Niesen oder Nasenausfluss gezeigt. Bei zwei Hunden (5,7 %) lagen zu dieser Frage keine Angaben vor. Erstmals Symptome einer Atemwegserkrankung zeigten 26/33 (78,8 %) Hunden zum Zeitpunkt der Vorstellung.

1.6.5. Auslandsaufenthalt

Die Besitzer wurden bezüglich eines Auslandsaufenthalts ihres Hundes in der Vergangenheit befragt. Es wurden auch Patienten in die Studie aufgenommen, die von einer Tierschutzorganisation nach Deutschland verbracht und dort weiter vermittelt worden waren. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Auslandsaufenthalte der 304 Studienteilnehmer, bei denen Informationen diesbezüglich vorlagen.

1.6.5.1. Gesunde Hunde

Von den insgesamt 272 klinisch gesunden Hunden lagen bei zwei Hunden keine Informationen zu diesem Punkt vor. Von 270 klinisch gesunden Hunden waren 176 (65,2 %) bereits im Ausland gewesen. Informationen zu Auslandsaufenthalten lagen bei 109 Greyhounds, bei allen (58) Windhunden anderer Rassen und allen (103) Nicht-Windhunden vor. Bei 69 der 109 (63,3 %) Greyhounds, 44 von 58 (75,9 %) Windhunden anderer Rassen und 65 der 103 (63,1 %) klinisch gesunden Nicht-Windhunde lag ein Auslandsvorbericht vor.

1.6.5.2. Kranke Hunde

Bei einem (2,9 %) Studienteilnehmer aus der Gruppe der an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunde waren keine Informationen über eventuelle Auslandsaufenthalte in der Vergangenheit vorhanden. Von den 34 übrigen kranken Hunden waren 18 (52,9 %) zum Zeitpunkt der Vorstellung

bereits im Ausland gewesen. Unter diesen 18 befanden sich auch die sieben Hunde, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme auf Gut Aiderbichl in Oberösterreich lebten.

Tabelle 13: Dokumentierte Auslandsaufenthalte der 304 Studienteilnehmer (% = Prozent)

Ausland	Greyhounds	gesunde Windhunde (ausser Greyhounds)	gesunde Nicht-Windhunde	krankte Hunde
Belgien	10/69 (14,5 %)	24/44 (54,5 %)	2/65 (3,1 %)	0/18 (0,0 %)
England	3/69 (4,3 %)	0/44 (0,0 %)	1/65 (1,5 %)	0/18 (0,0 %)
Frankreich	19/69 (27,5 %)	22/44 (50,0 %)	10/65 (15,4 %)	1/18 (5,6 %)
Griechenland	0/69 (0,0 %)	0/44 (0,0 %)	1/65 (1,5 %)	1/18 (5,6 %)
Indien	1/69 (1,4 %)	0/44 (0,0 %)	0/65 (0,0 %)	0/18 (0,0 %)
Irland	8/69 (11,6 %)	0/44 (0,0 %)	0/65 (0,0 %)	0/18 (0,0 %)
Italien	8/69 (11,6 %)	9/44 (20,5 %)	16/65 (24,6 %)	0/18 (0,0 %)
Kanada	0/69 (0,0 %)	1/44 (2,3 %)	1/65 (1,5 %)	1/18 (5,6 %)
Kroatien	0/69 (0,0 %)	0/44 (0,0 %)	3/65 (4,6 %)	2/18 (11,1 %)
Luxemburg	9/69 (13,0 %)	0/44 (0,0 %)	1/65 (1,5 %)	0/18 (0,0 %)
Niederlande	37/69 (53,6 %)	27/44 (61,4 %)	8/65 (12,3 %)	0/18 (0,0 %)
Österreich	7/69 (10,1 %)	7/44 (15,9 %)	26/65 (40,0 %)	9/18 (50,0 %)
Schweden	9/69 (13,0 %)	2/44 (4,5 %)	0/65 (0,0 %)	0/18 (0,0 %)
Schweiz	7/69 (10,1 %)	21/44 (47,7 %)	9/65 (13,8 %)	0/18 (0,0 %)
Spanien	0/69 (0,0 %)	1/44 (2,3 %)	9/65 (13,8 %)	3/18 (16,7 %)
Ungarn	21/69 (30,4 %)	16/44 (36,4 %)	7/65 (10,8 %)	1/18 (5,6 %)
USA	0/69 (0,0 %)	0/44 (0,0 %)	1/65 (1,5 %)	0/18 (0,0 %)

1.6.6. Rennteilnahme

Bei den Gruppen der klinisch gesunden Greyhounds und der Windhunde anderer Rassen wurde zudem deren aktive Teilnahme am Hunderennsport zum Zeitpunkt der Probennahme erfasst. Nicht nur Hunde, die an offiziellen Hunderennen teilnahmen, wurden berücksichtigt, sondern auch die Teilnahme an regelmäßigen Trainingsläufen wurde als aktive Teilnahme am Hunderennsport gewertet. Bei drei der 111 Greyhounds lag keine Information zu deren Teilnahme am Hunderennsport vor. Von 108 Greyhounds, bei denen Informationen zu diesem Punkt vorlagen, nahmen zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme 56 (51,9 %) aktiv an Rennen teil. Hierbei handelte es sich um 55 Vertreter der Renn- und einen Vertreter der Showlinie. Von den 58 Hunden anderer Windhunderassen waren 46 (79,3 %) zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme aktiv am Windhunderennsport beteiligt.

1.6.7. Dauer der respiratorischen Symptome

Für die Gruppe der akut an respiratorischen Symptomen erkrankten Hunde wurde die Dauer der Erkrankung vom ersten Auftreten der klinischen Symptome bis zum Zeitpunkt der Vorstellung berücksichtigt. Die Dauer der respiratorischen Symptome der kranken Hunde zum Zeitpunkt der Vorstellung lag im Mittel bei 4,5 Tagen mit einem Median von fünf Tagen. Die Spanne betrug ein bis 14 Tage. Mit 14/35 Hunden wurden 40,0 % der an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Studienteilnehmer an oder nach Tag 7 nach Auftreten erster klinischer Symptome, 18/35 (51,4 %) nach Tag 4, vorstellig.

1.6.8. Verlauf

Die Besitzer der kranken Hunde wurden zwei, vier, sechs und erforderlichenfalls acht Wochen nach Vorstellung erneut telefonisch kontaktiert, um die Gesamtdauer der respiratorischen Symptome vom Beginn der Erkrankung bis zur vollständigen Genesung erfassen zu können. Der Mittelwert der Dauer der klinischen Symptome lag bei 14,3 Tagen und der Median bei zehn Tagen. Das Minimum der Dauer der klinischen Symptome lag bei fünf Tagen, das Maximum bei einem Patienten bei 60 Tagen. Zwei Studienteilnehmer (5,7 %) mussten während ihres klinischen Aufenthaltes euthanasiert werden. Der eine Hund wurde aufgrund einer Sepsis in Folge einer zusätzlich bestehenden Erkrankung an *Pemphigus foliaceus* mit bakterieller Sekundärinfektion euthanasiert. Die Besitzer des anderen Hundes entschieden sich aufgrund der schlechten Prognose wegen eines Lebertumors zur Euthanasie.

1.7. Klinische Untersuchung

Bei jedem der Studienpatienten wurde eine klinische Untersuchung nach einem standardisierten Protokoll (siehe Anhang) durchgeführt. Die einzelnen Parameter wurden nur bei den kranken Hunden tabellarisch erfasst und ausgewertet, da Einschlusskriterium für die Gruppe der klinisch gesunden Hunde eine unauffällige klinische Untersuchung war. Tiere mit orthopädischen oder dermatologischen

Problemen wurden als „klinisch gesund“ gewertet. Tabelle 14 veranschaulicht die einzelnen Punkte, die in der klinischen Untersuchung erfasst wurden.

Der Hauptvorstellungsgrund bei der Gruppe der akut respiratorisch erkrankten Hunde war Husten. Bei 28 der 35 (80,0 %) Hunde war im Rahmen der klinischen Untersuchung Husten auslösbar. Zu diesem Zeitpunkt hatten zwölf (34,3 %) Hunde keinen Nasenausfluss, elf (31,4 %) serösen, neun (25,7 %) mukösen und drei (8,6 %) der Hunde wiesen blutigen Nasenausfluss auf.

Tabelle 14: Einzelne Parameter, die bei der klinischen Untersuchung erfasst wurden (°C = Grad Celsius; ggr. = geringgradig; hgr. = hochgradig; KFZ = Kapilläre Füllungszeit; mgr. = mittelgradig; Sek. = Sekunden)

Parameter	physiologisch	Abweichungen
Husten	nicht auslösbar	auslösbar
Nasenausfluss	nicht vorhanden	serös, mukös, blutig
Atemzüge/Minute	≤ 50/Minute	> 50/Minute
Lungenauskultation	ohne Befund	ggr., mgr., hgr. verschärft
Körpertemperatur	< 39,5 °C	≥ 39,5 °C
Schleimhautfarbe	rosa	blass, gerötet, zyanotisch
KFZ	≤ 2 Sek.	> 2 Sek.
Anorexie	nicht vorhanden	vorhanden
Apathie	nicht vorhanden	vorhanden
Lymphknoten	von normaler Größe	vergrößert

Eine erhöhte Atemfrequenz von über 50 Atemzügen pro Minute wiesen 5/35 (14,3 %) akut respiratorisch erkrankten Hunde auf, die restlichen 30 (85,7 %) Hunde hatten mit weniger als 50 Atemzügen pro Minute eine normale Atemfrequenz. Bei neun (25,7 %) Hunden verlief die Lungenauskultation ohne besonderen Befund, 13 (37,1 %) zeigten geringgradig, zwölf (34,3 %) mittelgradig und einer (2,9 %) hochgradig verschärfte Atemgeräusche. Bei einem Hund war eine Temperaturmessung aufgrund aggressiven Verhaltens nicht möglich. Fünf der übrigen 34 (14,7 %) Hunde wiesen in der klinischen Untersuchung eine deutlich erhöhte Körpertemperatur von über 39,4 °C auf. Zwölf der 35 (34,3 %) Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Vorstellung vergrößerte Mandibularlymphknoten auf. Sieben (20,0 %) Hunde hatten zum Zeitpunkt der Vorstellung blasse, 25 (71,4 %) hatten physiologisch rosa, zwei (5,7 %) gerötete und einer (2,9 %) zyanotische Maulschleimhäute. Die kapilläre

Füllungszeit (KFZ) war bei einem (2,9 %) Patienten mit mehr als zwei Sekunden verzögert. Alle anderen 34 (97,1 %) hatten eine physiologische KFZ von weniger als zwei Sekunden. Neun (25,7 %) Vertreter dieser Gruppe waren zum Zeitpunkt der Vorstellung apathisch. In ihrem Allgemeinbefinden weitgehend ungestört hingegen waren 26 (74,3 %). Neun von 35 (25,7 %) Hunden verweigerten zum Zeitpunkt der Vorstellung die Futteraufnahme. Von den 35 kranken Studienteilnehmern litten 26 (74,3%) nicht unter Anorexie.

1.8. Labordiagnostische Untersuchung

Bei einigen der kranken Studienteilnehmer wurden in Abhängigkeit des Schweregrads der klinischen Symptome labordiagnostische Untersuchungen durchgeführt, um im Fall von CIV-positiven Hunden die Daten der Laboruntersuchungen mit dem Infektionsstatus korrelieren zu können.

1.8.1. Blutbild mit Differentialblutbild

Bei 22 Hunden (62,9 %), die aufgrund akut aufgetretener respiratorischer Symptome vorgestellt wurden, wurde ein Blutbild mit Differentialblutbild angefertigt. Sieben (20,0 %) der 22 Hunde hatten eine Linksverschiebung, d. h. eine Erhöhung der stabkernigen neutrophilen Granulozyten. Bei vier (57,1 %) der sieben Patienten mit Linksverschiebung lag keine Leukozytose (Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl) vor. Tabelle 15 sind die Referenzwerte für das Blutbild sowie die Abweichungen der einzelnen Studienteilnehmer zu entnehmen.

Tabelle 15: Ergebnisse des Blutbildes mit Differentialblutbild der 22 an akuter respiratorischer Symptomatik erkrankten Hunde, bei denen ein Blutbild mit Differentialblutbild angefertigt wurde (RBC = rote Blutkörperchen; WBC = Leukozyten; l = Liter; mmol/l = Millimol pro Liter; l/l = Liter pro Liter; fl = Femtoliter; fmol/l = Femtomol pro Liter; Min. = Minimum; Max. = Maximum)

Parameter	Referenzbereich	Einheit	Hunde mit Werten unterhalb des Referenzbereichs	Hunde mit Werten oberhalb des Referenzbereichs	Mittelwert	Median	Min.	Max.
RBC	5,5 - 9,3	x 10 ¹² /l	3 (13,6 %)	0 (0,0 %)	6,6	6,5	4,9	8,8
Hämoglobin	7,45 - 12,5	mmol/l	4 (18,2 %)	2 (9,1 %)	9,3	9,4	4,7	13,1
Hämatokrit	0,35 - 0,58	l/l	3 (13,6 %)	0 (0,0 %)	0,43	0,43	0,33	0,56
Thrombozyten	150 - 500	x 10 ⁹ /l	1 (4,5 %)	0 (0,0 %)	285	283	137	489
WBC	5,0 - 16,0	x 10 ⁹ /l	1 (4,5 %)	3 (13,6 %)	11,6	11,2	2,96	21,9
Monozyten	0,04 – 0,5	x 10 ⁹ /l	0 (0,0 %)	8 (36,4 %)	0,58	0,34	0,13	2,1
Lymphozyten	1,0 – 3,6	x 10 ⁹ /l	3 (13,6 %)	3 (13,6 %)	2,15	2,11	0,09	6,64
Stabkernige Neutrophile	0,0 – 0,5	x 10 ⁹ /l	0 (0,0%)	7 (31,8 %)	0,58	0,11	0,0	2,62
Segmentkernige Neutrophile	3,0 – 9,0	x 10 ⁹ /l	2 (9,1 %)	6 (27,3 %)	8,02	7,43	1,65	17,3
Eosinophile Granulozyten	0,04 – 0,6	x 10 ⁹ /l	3 (13,6 %)	3 (13,6 %)	0,27	0,12	0,0	1,31
Basophile Granulozyten	0,0 – 0,04	x 10 ⁹ /l	0 (0,0 %)	4 (18,2 %)	0,018	0,00	0,0	0,11

1.8.2. Serumchemie

Serumparameter wurden bei zehn der 35 (28,6 %) kranken Hunde bestimmt. Bei fünf von zehn (50,0 %) Studienteilnehmern wies das Serumorganprofil Auffälligkeiten auf. Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Serumparameter zu entnehmen.

Tabelle 16: Serumparameter der zehn an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunde, bei denen diese bestimmt wurden (ALT = Alanin-Amino-Transferase; AP = Alkalische Phosphatase; U/l = Einheit pro Liter; mmol/l = Millimol pro Liter; μ mol/l = Mikromol pro Liter; g/l = Gramm pro Liter; Min. = Minimum; Max. = Maximum)

Parameter	Referenzbereich	Einheit	Hunde mit Werten unterhalb des Referenzbereichs	Hunde mit Werten oberhalb des Referenzbereichs	Mittelwert	Median	Min.	Max.
ALT	16 - 91	U/l	0 (0,0 %)	3 (30,0 %)	199	42	22	1151
AP	11 - 225	U/l	0 (0,0 %)	1 (10,0 %)	309	131	45	1732
Harnstoff	3,3 – 8,3	mmol/l	1 (10,0 %)	2 (20,0 %)	6,7	5,0	3,3	13,4
Kreatinin	31,8 – 117,0	μ mol/l	1 (10,0 %)	0 (0,0 %)	59,4	58,5	26,0	101,0
Eiweiß	48,0 - 76,0	g/l	1 (10,0 %)	0 (0,0 %)	63,3	62,0	43,5	96,3
Albumin	25,0 – 44,0	g/l	1 (10,0 %)	0 (0,0 %)	33,9	34,1	15,8	54,3

1.8.3. Bronchoalveoläre Lavage

Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde bei zwei der 35 (5,7 %) Studienteilnehmer durchgeführt.

1.8.3.1. Bakteriologische Untersuchung

Bei der bakteriologischen Untersuchung der Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit (BALF) eines Studienteilnehmers konnten *Mycoplasma* spp. sowie *Streptococcus* spp. und Corynebakterien nachgewiesen werden.

1.8.3.2. Zytologische Untersuchung

In der zytologischen Untersuchung der BALF desselben Hundes konnten, neben Mikroorganismen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Makrophagen nachgewiesen werden. Die BALF des anderen Hundes enthielt ausschließlich neutrophile Granulozyten und Makrophagen.

1.9. Bildgebende Verfahren

Bildgebende Verfahren wurden im Rahmen der weiterführenden Diagnostik bei 16 der 35 (45,7 %) Studienteilnehmer durchgeführt. Bei diesen 16 Patienten wurde ein Röntgenbild des Thorax angefertigt und bei zwei der 16 (12,5 %) erfolgte eine Endoskopie der unteren Atemwege.

1.9.1. Röntgen Thorax

Das Röntgenbild vom Thorax, das bei 16 der 35 (45,7 %) Studienpatienten angefertigt wurde, wies bei sechs (37,5 %) ein bronchiales und bei drei (18,8 %) ein alveoläres Muster auf. Bei einem Hund (6,3 %) war die Lunge röntgenologisch interstitiell gezeichnet und bei sechs (37,5 %) Tieren war das Röntgenbild unauffällig.

1.9.2. Endoskopie

Bei zwei der 35 (5,7 %) Studienteilnehmer wurde eine Bronchoskopie durchgeführt. Bei beiden lag eine Rötung im Bereich des Pharynx, Larynx, der Tracheal- und der Bronchialschleimhaut vor, und das Septum war verbreitert.

2. Methoden

Zur Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen das CIV in der deutschen Hundepopulation wurden prospektiv 272 Blutproben von klinisch gesunden Hunden sowie 34 Blutproben von Hunden mit akuten respiratorischen Symptomen gewonnen. Von den kranken Hunden wurde zusätzlich je ein Nasen- und Rachentupfer entnommen und eine PCR zum Nachweis von CIV durchgeführt. Vor der Probenentnahme wurde zunächst bei jedem der Studienteilnehmer eine klinische Untersuchung nach einem standardisierten Protokoll (siehe Anhang) durchgeführt und ein ausführlicher Vorbericht erhoben. Anschließend erfolgte die Probenentnahme. Die Besitzer füllten einen standardisierten Fragebogen (siehe Anhang) aus. Die im Fragebogen erhobenen Daten der Studienteilnehmer wurden erfasst und ausgewertet. Bei 22/35 (62,9 %) Hunden mit akuten respiratorischen Symptomen wurde zudem ein Blutbild mit Differentialblutbild angefertigt. Serumparameter wurden bei zehn der 35 (28,6 %) kranken Hunde bestimmt. Erforderlichenfalls wurden die Patienten bildgebender Diagnostik im Rahmen einer Röntgenuntersuchung oder Bronchoskopie unterzogen.

2.1. Erfassung der Patientendaten

Die Daten jedes Studienteilnehmers wurden mit Hilfe eines Besitzerfragebogens und aus den Angaben der digitalen Patientenkartei (Vetera[®]Net, GP Software, Eltville, Deutschland) der Medizinischen Kleintierklinik erhoben und in eine Tabelle der Software Excel[®] 2007 (Microsoft[®], Redmond, USA) eingegeben. Nicht bei allen Patienten konnten alle Daten vollständig erfasst werden. Der Fragebogen zu jeder der einzelnen Gruppen befindet sich im Anhang.

2.2. Probensammlung

Bei jedem der gesunden Studienteilnehmer erfolgte eine Blutprobenentnahme, bei den an akuter respiratorischer Symptomatik erkrankten Studienpatienten wurde neben einer Blutprobe auch je ein Tupfer aus Nase und Rachen entnommen.

2.2.1. Blutprobenentnahme

Die Blutprobenentnahme erfolgte aus der *Vena cephalica antebrachii* oder der *Vena saphena lateralis* nach vorheriger Desinfektion der Haut, wonach die Proben mit einer sterilen Einmalkanüle (BD MicrolanceTM3[®], Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in Serumröhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) eingefüllt wurden. Es wurden pro Hund etwa 4,5 ml Blut entnommen. Innerhalb von 24 Stunden nach Probengewinnung wurden die Blutproben bei 4000 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten in einer Universal 32R[®] Hettich-Zentrifuge (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland) abzentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bis zum Zeitpunkt der Probenanalyse bei -20 °C in 2 ml fassenden Serumröhrchen der Fa. Sarstedt tiefgefroren.

2.2.2. Tupferprobenentnahme

Die Entnahme der Tupferproben bei den akut respiratorisch erkrankten Hunden erfolgte mittels trockener Baumwolltupfer ohne Transportmedium (Fa. Sarstedt, AG & Co., Nümbrecht, Deutschland). Wurde bei dem jeweiligen Patienten weiterführende Diagnostik (Bronchoskopie) in Narkose durchgeführt, so erfolgte die Probenentnahme in Narkose, andernfalls am wachen Patienten. Die Nasentupfer wurden ca. 2 bis 3 cm tief in eines der Nares eingeführt. Die Gewinnung der Rachentupfer erfolgte durch Rollen des Baumwolltupfers am *Palatum molle*. Anschließend wurden die trockenen Baumwolltupfer bei -80 °C eingefroren und so bis zum Zeitpunkt der Durchführung des Virusnachweises asserviert.

2.2.3. Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit

Eine BAL wurde im Rahmen einer endoskopischen Untersuchung bei einigen der kranken Studienteilnehmer durchgeführt. Nach Spülen von Bronchialabschnitten mit steriler Kochsalzlösung wurde auch BALF gewonnen und sowohl zytologisch als auch bakteriologisch untersucht.

2.3. Probenuntersuchung

Die einzelnen Methoden zur Untersuchung der Blut- und Tupferproben sind im Folgenden beschrieben.

2.3.1. Blutbild mit Differentialblutbild

Ein Blutbild mit Differentialblutbild wurde mit dem Blutanalysegerät XT-2000iV (Fa. SYSMEX GmbH, Norderstedt, Deutschland) bei einigen der an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Studienpatienten angefertigt. Da mit diesem Gerät keine Zählung der stabkernigen neutrophilen Granulozyten möglich ist, wurde diese Fraktion der Leukozyten manuell mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt.

2.3.2. Serumchemie

Serumparameter wurden bei einigen der wegen akuten respiratorischen Symptomen vorstelligen Hunde mit Hilfe des Serumanalysegerätes Hitachi Automatic Analyzer 912 (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) durchgeführt.

2.3.3. Nachweis von Antikörpern gegen das kanine Influenzavirus

Für den Nachweis von Antikörpern gegen CIV wurden verschiedene Testmethoden herangezogen, die im Folgenden beschrieben werden.

2.3.3.1. Hämagglutinationshemmtest

Zunächst wurde durch das Labor des College of Veterinary Medicine der University of Florida ein HHT bei allen 306 Serumproben durchgeführt. Hierfür wurde je 1 ml Serum mit 3 ml Receptor Destroying Enzyme (RDE) vermischt und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 56 °C über 30 Minuten. Als Positivkontrolle wurde das Serum eines Hundes, der

nachweislich mit H3N8 infiziert war, verwendet. Als Negativkontrolle dienten die Blutproben eines spezifisch pathogen-freien Hundes sowie eines in VNT und HHT nachweislich Antikörper-negativen Hundes. Der HHT erfolgte unter Verwendung von 0,5 % *turkey red blood cells*, verdünnt in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Als Virus wurde das Isolat A/canine/Florida/43/04 verwendet. Dieses wurde auf vier hämagglutinierende Einheiten (HAU)/25 µl titriert. Anschließend wurden die Serumproben einzeln, von einer 1:8-Verdünnung ausgehend, getestet. Der HHT-Titer wurde als die letzte Verdünnungsstufe definiert, die die Hämagglutination verhinderte. Als positiv wurden Serumproben mit einem HHT-Titer von über 1:32 erachtet. Proben, bei denen keine Hemmung der Hämagglutination erfolgte, wurden mit einem HHT-Titer von 1:4 gewertet (CRAWFORD et al., 2005).

2.3.3.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Zusätzlich zum HHT wurde bei allen 306 Serumproben ein ELISA durch das oben genannte Labor zur Untersuchung auf Antikörper gegen das Influenzavirus-Nukleoprotein durchgeführt. Die Proben sowie die Kontrollsera wurden hierfür zunächst 1:10 verdünnt und einzeln untersucht. Positive Proben wurden zweifach nachgetestet. Als Kontrollsera dienten auch bei dieser Antikörper-Bestimmung das Serum eines in VNT sowie im HHT positiven Hundes sowie eines spezifisch pathogen-freien Hundes als Negativkontrolle. Es wurde hierfür ein kommerzielles Testkit (FlockCheck*: AI MultiS-Screen Ab Testkit) der Firma IDEXX verwendet. Mit diesem werden Antikörper gegen das NP aviärer Influenzaviren nachgewiesen. Die Vertiefungen der Testplatten waren mit Antigen aviärer Influenzaviren präpariert. Es bildete sich im positiven Fall ein Antigen-Antikörper-Komplex mit der Probe. Anschließend wurde ein Enzym-Konjugat hinzugefügt, das nur binden kann, wenn sich keine Antikörper in ausreichend hoher Menge im Serum befinden. Nach Abwaschen des Enzym-Konjugats und Aufbringen eines Substrats war der Grad der Farbveränderung umgekehrt proportional zur Menge der im Serum enthaltenen Antikörper. Die Messung der Farbintensität erfolgte im Spektralphotometer. Daraus wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio (S/N)) berechnet. Proben mit einem S/N-Verhältnis von weniger als 0,647 wurden als positiv gewertet.

2.3.3.3. Spezifischer Hämagglutinationshemmtest

Da es im ELISA zu falsch-positiven Resultaten kommen kann, erfolgte zusätzlich ein spezifischer HHT gegen die unterschiedlichen Hämagglutinine einzelner Influenzavirussubtypen bei den im ELISA positiv getesteten Proben im Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Venedig, Italien). Zunächst wurden die beiden, im ELISA positiv getesteten Blutproben, sowie vier, durch das Labor des College of Veterinary Medicine der University of Florida im HHT negativ getestete Proben, mittels ELISA untersucht. Bei diesen vier Blutproben war genug Material für einen weiteren Test vorhanden. Dabei wurde in diesem Fall der kommerziell erhältliche cELISA ID Screen[®] Influenza A Antibody Competition Assay (Fa. ID Vet, Montpellier, Frankreich) verwendet. Der Test wurde nach Herstellerangaben mit 1:10 verdünnten Serumproben durchgeführt. Sera, bei denen das Ergebnis positiv oder nicht eindeutig ausfiel, wurden vierfach nachgetestet.

Für den ausschließenden HHT in Italien wurden fünf Influenzavirus-Antigene verwendet; zwei verschiedene H1N1-Subtypen (A/Italy/2810/2009 und A/Italy/3009/2009) sowie H3N2 (A/Italy/3100/2009 und A/Canine/Korea/LBM412/8) und H3N8 (A/Canine/Florida/2004). Die ersten Subtypen wurden gewählt, da sie zur Zeit der Probensammlung in der humanen Population zirkulierten und somit ein potentiell Ansteckungsrisiko für die Hundepopulation darstellten (DUNDON et al., 2010). Jedes der Testviren war in zehn Tage alten embryonierten Hühnereiern angezüchtet worden und mit 0,0005 % β -Propiolacton (Fa. Ferak, Berlin, Deutschland) inaktiviert, anschließend lyophilisiert und bei -20 °C asserviert worden. Vor Testbeginn wurde je ein Teil der Testsera mit je einem Teil Kontrollserum mit Hilfe von drei Teilen Receptor Destroying Enzyme (RDE, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzedenaturierung über 30 Minuten bei 56 °C. Für den HHT wurden 4 hämagglutinierende Einheiten/25 μ l Virus, 8 log²-Verdünnungen der Serumproben in PBS, beginnend bei einer Verdünnung von 1:8, sowie eine 0,5 % Hühnererythrozyten-Suspension in PBS verwendet. Der HHT wurde nach den OIE-Standards für Influenzaviren bei Säugetieren angefertigt. Die HHT-Titer wurden nach 45 Minuten Inkubationszeit mit 0,5 % Erythrozyten bei

Raumtemperatur ermittelt. Der endgültige HHT-Titer wurde als der reziproke Wert der höchsten Verdünnungsstufe des Serums festgelegt, die zu einer Hämagglutinationshemmung führte. Als Antikörper-positiv wurde ein Titer von 1:32 oder mehr bestimmt, basierend auf den Testergebnissen spezifisch pathogenfreier und experimentell infizierter Hunde (CRAWFORD et al., 2005).

2.3.3.4. Immunfluoreszenztest

Zur weiteren Untersuchung der ELISA-positiven Serumproben wurde im Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Venedig, Italien) ein von De Benedictis und Mitarbeitern (2010) etablierter Immunfluoreszenztest unter Verwendung des H1N1-Influenzavirussubtyps A/duck/Italy/1447/2005 durchgeführt. Beginnend bei einer 1:8-Verdünnung wurden 10 log²-Verdünnungsstufen der Hundesera in PBS getestet. Von jeder Verdünnungsstufe wurden hierfür 50 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorgelegt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten Sera von nachweislich Antikörper-positiven bzw. -negativen Hunden. Spezifische anti-Influenza-A-Antikörper wurden mit Hilfe eines mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiertem Kaninchen-anti-Hund-Antikörper enthaltendem, 1:5000 in Evan's Blue Solution verdünnten Testserum identifiziert. Je 50 µl dieses Konjugats wurden in jede der Vertiefungen pipettiert, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops wurden Serumproben, die grüne Foci in Zellmembran und Zytoplasma auf braun-rottem Hintergrund aufwiesen, als positiv beurteilt. Der endgültige IFT-Titer wurde als der reziproke Wert der letzten Verdünnungsstufe mit fluoreszierenden Foci angesehen.

2.3.4. Influenzavirus-Polymerase-Ketten-Reaktion

Der Nachweis von Influenzavirus-RNA in Nasen- und Rachentupfern von mit akuten respiratorischen Symptomen vorgestellten Tieren erfolgte durch *real time* RT-PCR im Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München. Als

Target diente dabei eine bei allen Influenza-A-Viren hochkonservierte Sequenz des Matrix-Proteins.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde ein *one-step*-RT-PCR-Protokoll verwendet (QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Zudem wurden die Arbeitsschritte der RNA-Freisetzung, der RNA-Isolierung, der Herstellung des Mastermix und das Ansetzen der PCR-Reaktion räumlich und arbeitstechnisch getrennt durchgeführt. Die *real time* RT-PCR wurde mit einem Mx3005P™ QPCR System (Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

Zunächst wurde je ein Tupferprobenpaar in 600 µl PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Vortex aufgeschüttelt. Anschließend wurden je 100 µl des aus den Baumwolltupfern gewonnenen Probenmaterials von je zwei verschiedenen Hunden miteinander vermischt. Dadurch entstanden 18 Pools (17 Pools bestehend aus dem Probenmaterial aus Nasen- und Rachentupfer von je 2 Patienten und ein Pool aus dem Tupferprobenmaterial von einem Patienten) zu je 200 µl Probenmaterial. Zur Isolierung der viralen RNA wurde das High Pure Viral RNA Kit (Fa. Roche, Penzberg, Deutschland) verwendet. Die Anwendung der Isolierungs-Kits erfolgte jeweils entsprechend den Gebrauchsanweisungen des Herstellers.

Es wurde ein modifizierter TaqMan Assay nach Spackman und Mitarbeitern (2002) durchgeführt. Primer und Sonde wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Fa. Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) bezogen. Als Basis der *real time* RT-PCR diente das QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Jeder Reaktionsansatz (25 µl) setzte sich aus 12,5 µl RT-PCR Master Mix, 5,25 µl RNase-free water, 0,25 µl RT Mix, 2 µl Primer-Sonden Mix und 5 µl RNA-Template zusammen. Dem ursprünglichen Primersatz der PCR nach Spackman wurde ein zweiter Reverse-Primer (IVA M1 reverse 2) zugesetzt, um die Sensitivität für das Virus der neuartigen Schweinegrippe „swine flu H1N1“ zu erhöhen. Diese Modifikation beruhte auf einer Nachricht des Friedrich Löffler Instituts vom 18.6.2009 an die öffentlichen veterinärmedizinischen Untersuchungsämter Deutschlands. Die verwendeten Sequenzen der Primer und der Sonde sind aus Tabelle 17 ersichtlich.

Tabelle 17: Für die PCR der Tupferproben verwendete Primersequenzen (IVA = influenza virus A (Influenza A Virus); IVA M1 = Primer; IVA MP = Sonde; M = Matrixgen; A = Adenin; BHQ = Black Hole Quencher; C = Cytosin; FAM = Farbstoff Carboxyfluorescein; G = Guanin; T = Thymin; Y = Pyrimidin C oder T)

Primersequenzen und Sondensequenz:

IVA M1 forward: 5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'

IVA M1 reverse 1: 5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TYT CTG-3'

IVA M1 reverse 2: 5'-TGC AAA GAC ACT TTC CAG TCT CTG-3'

IVA MP (Sonde): 5'-FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1-3'

Jeweils 20 µl Mastermix wurden in ein *Optical Tube* (Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande) vorgelegt. Im Anschluss wurden je Probe 5 µl Eluat in die Tubes pipettiert, diese mit *Optical Caps* (Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verschlossen und in das *real time* Gerät eingesetzt. Die Endkonzentrationen von Primer und Sonde im Reaktionsansatz betragen: Primer IVA M1 forward 0,8 Mikromolar (µM), Primer IVA M1 reverse 1 und 2 je 0,6 µM und für die Sonde IVA MP 0,1 µM.

Folgendes Temperaturprofil wurde durchgeführt: reverse Transkription (30 Min. bei 50 °C), Aktivierung der Polymerase (15 Min. bei 94 °C) und anschließend 42 Zyklen mit Denaturierung (30 Sek. bei 94 °C), Annealing (30 Sek. bei 57 °C) und Extension (30 Sek. bei 68 °C). Die Messung der Reporter-Fluoreszenz erfolgte in der Annealingphase.

Es wurde eine Positivkontrolle (*swine flu* H1N1) sowie eine *non template control* im Experiment mitgeführt. Die Auswertung der *real time* PCR erfolgte mittels Mx Pro™ QPCR Software (Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Der *threshold* wurde manuell auf 0,015 festgelegt.

2.3.5. Bildgebende Verfahren

Bei einigen der wegen akuter respiratorischer Symptome vorstelligen Studienpatienten wurden zusätzlich zu klinischen und labordiagnostischen Untersuchungen bildgebende Verfahren angewandt. Die endoskopische Untersuchung der unteren Atemwege erfolgte mit einem flexiblen Broncho-Fiberskop (Fa. Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen Deutschland). Für mittelgroße und große Hunde wurde das Modell 60001 VL1 mit einer Gesamtlänge von 113 cm, einer Nutzlänge von 85 cm, einem Aussendurchmesser von 5,2 mm bei einem Arbeitskanal von 2,3 mm Durchmesser und einem Öffnungswinkel von 110 Grad verwendet. Bei kleinen Hunden hingegen wurde die Endoskopie mit dem Fabrikat 60002 VB1 mit einer Gesamtlänge von 82 cm, einer Nutzlänge von 54 cm, einem Aussendurchmesser von 3,7 mm bei einem Arbeitskanal von 1,5 mm Durchmesser und einem Öffnungswinkel von 90 Grad durchgeführt. Für die Gewinnung der BALF wurden 0,5 bis 1,0 ml sterile Kochsalzlösung pro kg Körpergewicht in die Lunge gespült und mit Hilfe eines Tracheal-Saugsets (Fa. Seidel GmbH, Buchendorf, Deutschland) rückgewonnen. Röntgenaufnahmen des Thorax wurden mit dem digitalen Röntgengerät Astab X (Fa. Comet Holding AG, Wünnewil-Flamatt, Schweiz) angefertigt.

2.4. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden in eine Tabelle von Excel[®] 2007 (Microsoft[®], Redmond, USA) eingegeben. Zur statistischen Auswertung von Signalement, Hunde- und Pferdekontakt sowie respiratorischen Symptomen in der Vergangenheit und dem Vorhandensein anderer Hunde im Haushalt wurden die Software-Programme PASW 18 (Fa. SPSS Inc, Chicago, IL, USA) und GraphPad Prism 4 (Fa. GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet. Für den Altersvergleich der Vertreter der einzelnen Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag für alle Tests bei $p < 0,050$. Anhand der Ergebnisse der Blut- sowie der Tupferprobenanalyse wurde die Prävalenz mit einem Konfidenzintervall (KI) von 95,0 % bestimmt.

IV. Ergebnisse

1. Gesunde Hunde

Zur Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen CIV lagen Blutproben von 272 klinisch gesunden Hunden vor. Von diesen Blutproben stammten 111 von klinisch gesunden Greyhounds, 58 von klinisch gesunden Windhunden anderer Rassen und 103 von klinisch gesunden Nicht-Windhunden. Von den klinisch gesunden Greyhounds und den klinisch gesunden Windhunden anderer Rassen war weder im HHT noch im ELISA ein Studienteilnehmer positiv. Unter den 103 gesunden Nicht-Windhunden befand sich im ELISA ein fraglich positiver Reagent, der HHT als Bestätigungstest war jedoch bei allen 103 klinisch gesunden Hunden negativ. Der positive Reagent wurde mittels nochmalig durchgeführtem ELISA und zusätzlich IFT und HHT auf andere Hämagglutinine ausser H3 getestet. Je homologer, d. h. je enger genetisch identisch das im HHT verwendete Test-Antigen mit dem zirkulierenden Virus ist, umso höher sind auch Sensitivität und Spezifität des HHT (DE BENEDICTIS et al., 2010). Diese weiteren Testverfahren konnten den fraglich positiven Reagenten mittels ELISA bestätigen, der Influenzavirussubtyp konnte jedoch mittels HHT nicht ermittelt werden. Zudem verlief der Immunfluoreszenztest ebenfalls negativ. Es ist folglich davon auszugehen, dass es sich bei dem ELISA-positiven Hund mit großer Wahrscheinlichkeit um einen falsch-positiven Reagenten handelte. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, dass ein anderer Influenzavirussubtyp vorlag, da mit dem HHT nur gegen drei verschiedene Hämagglutinine negativ getestet wurde.

Tabelle 18 gibt einen Überblick über die verschiedenen, bei den einzelnen Studienteilnehmern durchgeführten, Testverfahren. Tabelle 19 ist das Ergebnis der mittels HHT ermittelten Prävalenz von Antikörpern gegen H3N8 zu entnehmen.

2. Kranke Hunde

Von den 35 an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunden lagen je 35 Nasen- und Rachentupfer sowie 34 Blutproben zur Analyse vor.

2.1. Antikörper-Prävalenz kanines Influenzavirus

Alle 34 getesteten Hunde, die aufgrund von Atemwegserkrankungen vorstellig wurden, waren im HHT negativ. Es wurde ein Nukleoprotein-Antikörper-ELISA bei allen Proben durchgeführt. Einer der akut respiratorisch erkrankten Hunde reagierte bei dreifachem Testen positiv. Daher wurde mittels HHT auf Antikörper gegen die einzelnen Influenzavirussubtypen untersucht, um zu ermitteln, ob es sich tatsächlich um einen Antikörper-positiven Hund oder einen falsch-positiven Reagenten handelte. Laut De Benedictis und Mitarbeitern (2010) ist der Hämagglutinationshemmtest umso genauer, je homologer das Test-Antigen mit dem zirkulierenden Virus ist. Für den ausschließenden HHT in Italien wurden fünf Influenzavirus-Antigene verwendet; zwei verschiedene H1N1-Subtypen (A/Italy/2810/2009 und A/Italy/3009/2009) sowie H3N2 (A/Italy/3100/2009 und A/Canine/Korea/LBM412/8) und H3N8 (A/Canine/Florida/2004). Die ersten Subtypen wurden gewählt, da sie zur Zeit der Probensammlung in der humanen Population zirkulierten und somit ein potentielles Ansteckungsrisiko für die Hundepopulation darstellten (DUNDON et al., 2010). Der positive ELISA konnte auch bei diesem Hund bestätigt werden. Im HHT gegen andere Hämagglutinine waren alle Proben negativ. Der Immunfluoreszenztest bei dem im ELISA positiven Reagenten verlief negativ. Somit ist auch in diesem Fall von einem falsch-positiven ELISA-Ergebnis auszugehen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich im Fall des positiv getesteten kranken Hundes um einen anderen Influenzavirussubtyp handelte, der nicht mittels HHT erfasst wurde, da nur drei verschiedene Hämagglutinine getestet wurden.

Tabelle 18 veranschaulicht, welche Testverfahren bei den Studienpatienten durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Untersuchung der Antikörper-Prävalenz gegen CIV sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 18: Anzahl der mit den verschiedenen Testverfahren untersuchten Proben (HHT = Hämagglutinationshemmtest; H = Hämagglutinin; N = Neuraminidase; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

	Anzahl der mit den verschiedenen Testverfahren untersuchten Proben			
Testgruppe	HHT (H3N8)	HHT (H1N1)	HHT (H3N2)	Nukleoprotein-ELISA
Greyhounds	111	0	0	111
Windhunde (ausser Greyhounds)	58	0	0	58
gesunde Hunde (ausser Windhunde)	103	5	5	103
krankte Hunde	34	1	1	34
Studienteilnehmer gesamt	306	6	6	306

Tabelle 19: Ergebnisse Prävalenz von Antikörpern gegen H3N8 bei allen 306 Studienteilnehmern, bei denen Blutproben zur Untersuchung vorlagen (KI = Konfidenzintervall)

Gruppen	Anzahl der Blutproben	Anzahl positiver Proben	Prävalenz (%)	Minimale Prävalenz (KI = 95 %)	Maximale Prävalenz (KI = 95 %)
Greyhounds	111	0	0,0	0,0	3,35
Windhunde (ausser Greyhounds)	58	0	0,0	0,0	6,21
Windhunde gesamt	169	0	0,0	0,0	2,2
gesunde Hunde (ausser Windhunde)	103	0	0,0	0,0	3,60
gesunde Hunde gesamt	272	0	0,0	0,0	1,39
kranke Hunde	34	0	0,0	0,0	10,15
Studienteilnehmer gesamt	306	0	0,0	0,0	1,24

2.2. Influenzavirus-Polymerase-Ketten-Reaktion

Alle 35 an akuten respiratorischen Symptomen erkrankten Hunde waren in der PCR auf Influenzavirus-Ribonukleinsäure negativ, was einer Prävalenz von 0,0 % bis 9,89 % bei einem Konfidenzintervall von 95,0 % entspricht (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnis der PCR auf Influenzavirus-Ribonukleinsäure aus Nasen- und Rachentupfern bei den 35 an akuter respiratorischer Symptomatik erkrankten Studienteilnehmern (KI = Konfidenzintervall)

Anzahl der kranken Hunde	Anzahl positiver Proben	Prävalenz (%)	Minimale Prävalenz KI = 95 %	Maximale Prävalenz KI = 95 %
35	0	0,0	0,0	9,89

V. Diskussion

Influenzavirusinfektionen haben in den letzten Jahren weltweit an Bedeutung gewonnen. Seit dem ersten Ausbruch kaniner Influenzavirusinfektionen bei Greyhounds auf einer Hunderennbahn in Florida im Jahr 2004 (CRAWFORD et al., 2005) wurde von weiteren Ausbrüchen in zahlreichen Bundesstaaten der USA sowie weltweit berichtet. So wird das CIV mittlerweile in den Bundesstaaten New York und Florida als enzootisch angesehen (CRAWFORD et al., 2005). Die geografische Verbreitung sowie das Auftreten von Krankheitsfällen ausserhalb der Greyhoundpopulation belegen, dass es nach der erstmaligen Übertragung vom Pferd auf den Hund zu einer Etablierung des CIV in der Hundepopulation gekommen ist (CRAWFORD et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008; PAYUNGORN et al., 2008). Nachdem es in Großbritannien (DALY et al., 2008) sowie Australien (KIRKLAND et al., 2010) ebenfalls zu H3N8-Infektionen bei Hunden gekommen war, wurden weltweit Prävalenzstudien durchgeführt, um den Antikörper-Status der Hundepopulationen einzelner Länder zu ermitteln.

Möglicherweise wurden in der Vergangenheit aufgrund der Ähnlichkeit der Symptome sowie des Fehlens eines für die Influenzavirusinfektion pathognomonischen Krankheitsbildes oftmals Influenzavirusinfektionen als „Zwingerhusten“ fehlinterpretiert (CRAWFORD et al., 2005; YOON et al., 2005; BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007; DALY et al., 2010; JIRJIS et al., 2010). Eine kanine Influenzavirusinfektion wird wahrscheinlich in Gebieten, in denen das Virus nicht endemisch ist, selten differentialdiagnostisch in Betracht gezogen (LEVY et al., 2011). Aus diesem Grund sollten praktische Tierärzte, die häufig mit akut auftretender respiratorischer Symptomatik konfrontiert werden, über die Epidemiologie des Influenzavirus in der Hundepopulation informiert sein, um die betroffenen Patienten adäquat diagnostizieren und behandeln zu können.

Da zu der Bedeutung des CIV in Deutschland bisher keine Studien existieren, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Prävalenz von Antikörpern gegen das CIV in der deutschen Hundepopulation sowohl bei gesunden als auch kranken Hunden zu ermitteln.

Da das Influenzavirus erstmals 2004 bei Greyhounds nachgewiesen wurde und für diese Rasse eine besondere Prädisposition diskutiert wurde (CRAWFORD et al., 2005), sollte die Studienpopulation klinisch gesunde Greyhounds einschließen. Des Weiteren wurden klinisch gesunde Nicht-Windhunde und Windhunde anderer Rassen herangezogen. Ein weiteres Ziel der Studie bestand in der Gewinnung von Blut- sowie Tupferproben bei akut an respiratorischer Symptomatik erkrankten Hunden zum Nachweis einer CIV-Infektion mittels PCR und der klinischen und labordiagnostischen Untersuchung potentiell infizierter Hunde.

Keiner der Studienteilnehmer wies zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme Antikörper gegen H3N8 auf. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Untersuchung von insgesamt 306 Blutproben mittels HHT eine Antikörper-Prävalenz gegen H3N8 von 0,0 % bis 1,24 % ermittelt. Mittels ELISA wurden jedoch zwei der 306 Studienteilnehmer positiv auf Antikörper gegen das NP von Influenzaviren getestet. Es handelt sich bei beiden ELISA-positiven Probanden mit großer Wahrscheinlichkeit um falsch-positive Reagenten, da das betreffende HA mittels HHT gegen drei verschiedene Hämagglutinine nicht identifiziert werden konnte, und auch ein IFT negativ verlief. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden im ELISA positiv getesteten Studientiere Antikörper gegen ein HA aufwiesen, gegen das nicht explizit mittels der hier eingesetzten HHT getestet wurde, da jeder HHT nur ein bestimmtes HA nachweisen kann. Der Immunfluoreszenztest gilt laut De Benedictis und Mitarbeitern (2010) als hochsensitive und spezifische Methode. Nachteile bestehen jedoch in den hohen Anforderungen, die der Test an das Labor stellt (DE BENEDICTIS et al., 2010). Aus der Untersuchung der 35 Tupferprobenpaare mittels PCR ergab sich bei einem Konfidenzintervall von 95,0 % eine Prävalenz von Influenzavirus von 0,0 % bis 9,89 %. Auch De Benedictis und Mitarbeiter (2010) beobachteten in ihrer Studie eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von ELISA und HHT. So konnten in der betreffenden Studie über die Prävalenz von Antikörpern gegen kanines Influenzavirus von 82 im ELISA positiv getesteten Hunden nur zwei mittels HHT bestätigt werden (DE BENEDICTIS et al., 2010). Auch Lee und Mitarbeiter (2009) konnten in Japan große Diskrepanzen zwischen ELISA und HHT feststellen. So waren 11 % der in Moran Market getesteten und 100 % der in der Provinz Cheonbuk getesteten Hunde im ELISA

positiv (LEE et al., 2009). Es konnte jedoch keiner der positiven Reagenten in Moran Market und nur 35 % der positiv getesteten Hunde aus der Provinz Cheonbuk mittels HHT bestätigt werden (LEE et al., 2009). Mittels ELISA können zwar laut Lee und Mitarbeitern (2009) bereits zwei Tage früher Antikörper gegen Influenzaviren detektiert werden als mit dem HHT, es kommt jedoch häufiger zu einem falsch-positiven Ergebnis. Zu einem falschen Testergebnis kann es durch natürlich im Serum enthaltene, unspezifische Inhibitoren der Hämagglutination kommen (LU et al., 1982). De Benedictis und Mitarbeiter (2010) konnten für den ELISA eine Sensitivität von 94,0 % bei einer Spezifität von 98,7 % ermitteln. Als Goldstandard für die Antikörper-Diagnostik von Influenza-A-Viren bei Säugetieren gilt international der HHT (SKIBBE et al., 2004; DE BENEDICTIS et al., 2010). Mit Hilfe dieses Tests kann, im Gegensatz zu ELISA und IFT, der genaue Subtyp ermittelt werden. Der HHT ist somit nicht als Screeningtest geeignet, um eine Population auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Influenzaviren zu untersuchen, sondern zur genauen Differenzierung der Subtypen (DE BENEDICTIS et al., 2010). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein ELISA eingesetzt, um auf die Präsenz von Antikörpern gegen Nukleoprotein zu testen, welches alle Influenzaviren in ihrer Morphologie aufweisen. Die Aussagekraft des HHT hängt stark von Faktoren wie der Rezeptor-Affinität des jeweiligen Virus (α 2,3-Gal- oder α 2,6-Gal-Rezeptoren) sowie Qualität, Konzentration und Herkunft der Erythrozytensuspension ab (DE BENEDICTIS et al., 2010).

De Benedictis und Mitarbeiter (2010) empfehlen, sowohl einen ELISA als auch einen HHT für die Untersuchung einer Hundepopulation auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Influenzaviren durchzuführen. Dies gilt insbesondere dann, wenn man die Vorgeschichte der Hunde bezüglich Expositionsmöglichkeiten nicht kennt (DE BENEDICTIS et al., 2010). Mit Hilfe des ELISA wird das Vorhandensein von Antikörpern gegen verschiedene Influenzavirussubtypen getestet. Mittels HHT werden hingegen nur bestimmte Influenzavirussubtypen anhand deren Hämagglutinine erfasst. Testet man nicht gegen alle möglichen 16 Hämagglutinine, so kann man eine Infektion mit einem der ungetesteten Influenzavirussubtypen nicht ausschließen. Je homologer, d. h. je enger genetisch verwandt das im HHT verwendete Test-Antigen mit dem zirkulierenden Virus ist,

umso höher sind somit auch Sensitivität und Spezifität des HHT (DE BENEDICTIS et al., 2010). Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Studie Test-Antigene gegen drei verschiedene Hämagglutinine verwendet. Die Subtypen wurden gewählt, da sie zur Zeit der Probensammlung in der humanen Population zirkulierten und somit ein potentielles Ansteckungsrisiko für die Hundepopulation darstellten (DUNDON et al., 2010).

Der IFT gilt als ein spezifischer Test zur Bestätigung eines Influenzavirus-Antikörper-Titers (DE BENEDICTIS et al., 2010). In der Studie von De Benedictis und Mitarbeitern (2010) wurden als Referenzsera 97 Proben von nachweislich mit A/canine/FL/04 (H3N8) infizierten Greyhounds verwendet. Davon waren 92 (95 %) im ELISA und 95 (98 %) im IFT positiv. Von den Referenzsera spezifisch pathogen-freier Hunde wurden alle mittels ELISA und IFT als negativ erkannt. Somit lag die Sensitivität für den ELISA in dieser Studie bei 95 %, für den IFT sogar bei 98 %. Alle Negativkontrollen waren im Vorfeld mittels HHT negativ auf das Vorliegen von Antikörpern gegen H3 getestet worden. Auch in dieser Studie wurde der IFT als Bestätigungstest eingesetzt. Ziel künftiger Studien sollte darin bestehen, die Aussagekraft der verschiedenen Testmethoden und somit deren positiven und negativen prädiktiven Wert genauer zu evaluieren.

Dem praktischen Tierarzt kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie und der Empfehlungen aus der Literatur geraten werden, im Verdachtsfall einer Influenzavirusinfektion beim Hund nicht nur einen einzelnen Test als Nachweismethode anzuwenden, sondern eine Kombination aus verschiedenen Testverfahren. Zunächst sollte ein ELISA als Screening-Test durchgeführt und dann zur Bestätigung oder Widerlegung von positiven Testergebnissen die positiven Reagenten mittels HHT und IFT getestet werden.

Einige Punkte könnten möglicherweise die in dieser Studie ermittelte geringe Prävalenz beeinflusst haben. Man muss bedenken, dass bei einmaliger Probenentnahme, wie diese im Rahmen der Studie erfolgte, positive Reagenten unterrepräsentiert sein könnten, da eine Antikörper-Bildung erst ab dem siebten oder achten Tag nach Exposition erfolgt (CRAWFORD et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008; HOLT et al., 2010). Von insgesamt 35 aufgrund akuter respiratorischer Symptome vorgestellten Patienten wurden 14 (40,0 %) an oder

nach Tag 7 nach Auftreten erster klinischer Symptome vorstellig. Für künftige Studien wäre es somit ratsam, bei bekannter Exposition mehrere Blutproben während der präklinischen Phase, der Phase der Erkrankung sowie der Genesung zu entnehmen. Zudem wurden eventuell nicht ausreichend hohe Virusmengen im Tupfer gewonnen. Aus der Gruppe der akut respiratorisch erkrankten Hunde wurden 18 Patienten (51,4 %) zudem nach Tag 4 nach Auftreten klinischer Symptome vorgestellt. Laut Dubovi und Mitarbeitern (2008) ist jedoch bereits ab dem dritten Tag nach Auftreten klinischer Symptome nicht mehr mit einem positiven Virusnachweis aus Nase und Rachen zu rechnen. Die höchste Virusausscheidung findet laut Deshpande und Mitarbeitern (2009) zwischen Tag 2 und 4 statt. Einen besonders kritischen Punkt im Nachweis einer Influenzavirusinfektion stellt somit die frühzeitige Probenentnahme dar (RIVAILLER et al., 2010).

Da man im Jahr 2004 zunächst davon ausging, dass ausschließlich Greyhounds für das CIV empfänglich wären, jedoch im Jahr 2005 zahlreiche Hunde jeglicher Rasse und jeglichen Alters, vor allem in Tierheimen, Tierpensionen sowie Tierkliniken, nachweislich an Influenzavirusinfektionen erkrankten, wurde die Population der Studienteilnehmer zum einen aus klinisch gesunden Greyhounds, zum anderen aber auch aus klinisch gesunden Nicht-Windhunden ausgewählt. Um zu untersuchen, ob die Nähe zur Hunderennbahn einen prädisponierenden Faktor darstellt, wurden zusätzlich 58 gesunde Windhunde der Rassen Barsoi, Afghane, Saluki, Whippet, Magyar Agar, Deerhound sowie Galgo Español im Rahmen von Hunderennveranstaltungen beprobt. Aufgrund des Stresses, dem die Hunde sowohl während des Rennens als auch des Trainings ausgesetzt sind und der damit verbundenen Immunsuppression wäre ein erhöhtes Risiko für eine Infektionskrankheit durchaus denkbar. Mit Hilfe der vorliegenden Studie konnte jedoch auch für die Gruppe der Windhunde, die mit 111 Greyhounds sowie 58 Windhunden anderer Rassen insgesamt 169 Tiere umfasst, nur eine Prävalenz von 0,0 % bis 2,22 % ermittelt werden. Nachgewiesenermaßen stellt das hohe Hundeaufkommen im Rahmen von Hunderennveranstaltungen und Zuchtausstellungen, wie auch der Aufenthalt in Tierheimen oder Tierpensionen, ein erhöhtes Risiko der Ausbreitung von Infektionskrankheiten dar. In den USA ist zudem die Tatsache, dass Hunde auf Pferderennbahnen laufen,

epidemiologisch von großer Bedeutung, da der erste Ausbruch im Jahr 2004 auf eine direkte Übertragung des Virus vom Pferd auf den Hund zurückzuführen war (CRAWFORD et al., 2005). Da jedoch in Deutschland Windhunderennen auf separaten Rennbahnen veranstaltet werden, spielt das Pferd als Infektionsquelle eine untergeordnete Rolle. Das Pferd als mögliche Quelle der Virusübertragung wurde jedoch insofern in der vorliegenden Studie berücksichtigt, als die Besitzer über bisher stattgefundenen Kontakt zwischen ihrem Hund und Pferden befragt wurden. Aber auch bei den Hunden mit nachweislichem Pferdekontakt traten keine Influenzavirusinfektionen auf. Informationen zu bestehenden Influenzavirusinfektionen bei den jeweiligen Kontaktpferden lagen nicht vor. In Deutschland sind weder der Jagdsport, bei dem es zu einem besonders engen Kontakt zwischen Hund und Pferd kommt, noch der Hunderennsport besonders populär.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, klinische und labordiagnostische Befunde sowie Befunde von bildgebenden Verfahren von CIV-infizierten Hunden auszuwerten. Da bei keinem der Studienteilnehmer eine Influenzavirusinfektion nachgewiesen wurde, konnte dieser Teil der Studie nicht verwirklicht werden.

Im Idealfall sollten im Rahmen einer Prävalenzstudie Stichproben zufällig zu einem bestimmten Zeitpunkt aus der jeweiligen Zielpopulation gewählt werden. Nachteilig ist somit bei der vorliegenden Prävalenzstudie der lange Untersuchungszeitraum von zwei Jahren. Zusätzlich stammte ein Großteil der kranken Hunde aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik München und somit aus dem Stadtgebiet München und verteilte sich nicht wie bei einer zufälligen Stichprobenauswahl gleichmäßig über den gesamten Raum Deutschlands.

Die vorliegende Studie soll aktuelle Informationen über die momentane Relevanz von CIV bei Hunden in Deutschland liefern, denn dies ist die erste Studie, bei der in Deutschland anhand einer größeren Population die Prävalenz von H3N8 bei dieser Spezies ermittelt wurde. Auch wenn die Wahrscheinlichkeit einer CIV-Infektion bei Hunden in Deutschland momentan gering zu sein scheint, sollte eine Infektion mit dem CIV differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. Insbesondere gilt dies, wenn beispielsweise vorberichtlich Pferdekontakt bestand. Die Wahrscheinlichkeit ist auch höher, wenn das Tier zuvor einen

Auslandsaufenthalt in einem bekannten endemischen Gebiet verbracht hat. Dies zeigt z. B. die Prävalenzstudie von Kruth und Mitarbeitern (2008) in Ontario, Kanada. In dieser Studie war lediglich einer von 225 getesteten Hunden Antikörper-positiv (KRUTH et al., 2008). Bei diesem positiven Reagenten handelte es sich um einen Greyhound, der aus Florida stammte. Auch in der Studie von De Benedictis und Mitarbeitern (2010), in der 6858 Hunde in ganz Italien auf das Vorliegen von Antikörpern gegen H3N8 untersucht wurden, waren nur zwei Hunde positiv. Einer der beiden positiven Reagenten war ebenfalls aus Florida importiert worden, der andere hatte während eines Ausbruchs equiner Influenza in Italien engen Kontakt zu Pferden gehabt (DE BENEDICTIS et al., 2010).

Die hier vorliegende Arbeit zeigt somit, dass das momentane Risiko einer CIV-Infektion bei Hunden mit verdächtigen Symptomen sowie bei klinisch gesunden Tieren in Deutschland als gering einzustufen ist. Durch Importe von Greyhounds aus endemischen Gebieten der USA sowie das Verbringen adoptierter Greyhounds, die nicht mehr für den Rennsport geeignet sind und von Hunden anderer Rassen aus Endemiegebieten, könnte die Prävalenz jedoch in Zukunft auch in Deutschland ansteigen.

Eine Impfung ist derzeit in Deutschland nicht verfügbar, könnte jedoch die Höhe der ausgeschiedenen Virusmenge sowie die Schwere der Erkrankung im Falle einer Infektion deutlich reduzieren (CRAWFORD et al., 2005). Ein entscheidender Vorteil ist, dass das HA des CIV viel langsamer zu mutieren scheint als das humaner Isolate (BEAN et al., 1992) und somit eine neu entwickelte Vakzine für den Hund nicht so häufig in ihrer Antigen-Komposition abgeändert werden müsste (WOOD, 2002). EIV hat sich seit dem ersten Auftreten global ausgebreitet, wohingegen bezüglich CIV eine Etablierung und Ausbreitung bisher nur in den USA bekannt ist (DUBOVI & NJAA, 2008; PAYUNGPORN et al., 2008). Das CIV scheint sich im Gegensatz zu anderen viralen Erregern von Atemwegsinfektionen beim Hund somit bisher nicht weltweit ausgebreitet zu haben (RIVAILLER et al., 2010), was vermutlich auf eine geringere Kontagiosität zurückzuführen ist (DUBOVI & NJAA, 2008). Um jedoch das geografische Verteilungsmuster von CIV-Infektionen und somit deren Bedeutung für die Hundepopulation und die Notwendigkeit einer Impfung besser einschätzen zu

können, sind Informationen zur Prävalenz aus groß angelegten Studien nötig, zu denen die vorliegende Arbeit bereits einen Beitrag leisten konnte (RIVAILLER et al., 2010).

Der internationale Transport von Sporthunden und das Verbringen von Hunden durch Tierschutzorganisationen stellt einen wichtigen Faktor in der Epidemiologie von Influenzavirusinfektionen dar. Ein besonderes Risiko scheint in einer Koinfektion von Hunden mit verschiedenen Influenzavirussubtypen zu liegen, da aufgrund der Gefahr des „genetic reassortement“ hiervon auch ein gewisses zoonotisches Potential ausgehen könnte. Deshalb sollte die Verbreitung von CIV künftig gut überwacht werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass, im Gegensatz zur Situation in den USA, Großbritannien oder Australien, momentan in Deutschland mit einer geringen Prävalenz von Influenzavirusinfektionen beim Hund zu rechnen ist. Somit besteht für die deutsche Hundepopulation ein sehr geringes Risiko einer CIV-Infektion. Trotzdem sollten Tierärzte für die Möglichkeit einer Influenzavirusinfektion beim Hund sensibilisiert sein und, vor allem bei Importhunden oder Hunden mit Pferdekontakt, im Fall von Atemwegserkrankungen eine solche differentialdiagnostisch in Erwägung ziehen.

VI. Zusammenfassung

Studien der letzten Jahre beweisen, dass sich das CIV seit dem ersten Ausbruch im Südosten der USA im Jahr 2004 über weite Teile der USA verbreitet hat (CRAWFORD et al., 2005). Auch in England wurden Ausbrüche nachgewiesen (DALY et al., 2008). Ziel der vorliegenden Prävalenzstudie war es herauszufinden, welche Bedeutung das CIV in der deutschen Hundepopulation hat.

Dafür wurden im Zeitraum von April 2010 bis Mai 2011 prospektiv Blutproben von klinisch gesunden Hunden sowie Hunden mit akuten respiratorischen Symptomen gesammelt und auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Influenzavirus mittels ELISA, HHT sowie IFT getestet. Zusätzlich wurde von jedem kranken Hund je ein Nasen- und ein Rachentupfer gewonnen und auf das Vorliegen von Influenzavirus mittels PCR untersucht. Neben der Prävalenzbestimmung bestand ein weiteres Ziel der Arbeit in der Auswertung klinischer, labordiagnostischer und bildgebender Befunde der Influenzavirus-positiv getesteten Studienteilnehmer aus der Gruppe der akut kranken Tiere.

Es wurden Blutproben von 111 klinisch gesunden Greyhounds, 58 klinisch gesunden Hunden anderer Windhunderassen sowie 103 klinisch gesunden Hunden jeglicher Rasse gesammelt. Von den insgesamt 307 Studienteilnehmern wiesen 35 akut respiratorische Symptomatik wie Husten, Niesen oder Nasenausfluss auf.

Jeweils ein Hund der Gruppe der klinisch gesunden Nicht-Windhunde und ein kranker Hund wiesen im ELISA Antikörper gegen das NP von Influenzaviren auf. Da jedoch sowohl HHT und IFT als Bestätigungstests als auch die Influenzavirus-PCR im Fall des kranken Hundes negativ ausfielen, sind die beiden Ergebnisse als falsch-positiv zu werten. Die Prävalenz liegt bei dieser Studie mit einem Konfidenzintervall von 95 % zwischen 0,0 und 1,24 %.

Die in dieser Studie ermittelten Daten zeigen, dass das Risiko einer Infektion mit dem CIV sowohl bei klinisch gesunden Hunden als auch bei Hunden mit verdächtigen Symptomen in Deutschland derzeit als gering einzustufen ist. Da jedoch in den letzten Jahren weltweit immer wieder Influenzavirusinfektionen bei Hunden beschrieben wurden (CRAWFORD et al., 2005; DALY, 2006;

PAYUNGPORN et al., 2008; KIRKLAND et al., 2010), sollten auch praktizierende Tierärzte in Deutschland bei Patienten mit verdächtigen Symptomen eine Influenzavirusinfektion differentialdiagnostisch in Betracht ziehen, vor allem, wenn die Hunde aus endemischen Gebieten importiert wurden oder Kontakt zu Pferden hatten.

VII. Summary

Recent studies show, that the canine influenza virus (CIV) has spread across many parts of the USA, since its original outbreak in the southeast of the USA in 2004 (CRAWFORD et al., 2005). In the meantime, outbreaks in Europe, including Great Britain, have been observed. The aim of this prevalence study was to investigate the relevance of CIV in the German dog population.

Serum samples from clinically healthy dogs as well as from patients presenting with signs of acute respiratory disease were collected between April 2010 and May 2011. The presence of antibodies against CIV was detected by ELISA, Immunofluorescence Assay (IFA) and Hemagglutination Inhibition Assay (HI). In the clinically sick dogs a nasal swab as well as a pharyngeal swab were collected. These swabs were tested for the presence of CIV by PCR. The second aim of the study was to evaluate the results of clinical, laboratory, and imaging diagnostics of the sick patients tested positive for CIV.

Serum samples of 111 clinically healthy greyhounds, 58 clinically healthy non-greyhound racing breeds, and 103 clinically healthy dogs other than racing dogs were collected. Of all 307 pets, that were included in the study, 35 presented with an acute onset of respiratory signs.

One of the clinically healthy dogs other than racing breeds and one of the clinically sick dogs was tested positive for antibodies against influenza virus nucleoprotein by ELISA. These two samples, however, tested negative by HI as well as IFA as affirmation tests. Therefore, the ELISA results were considered false positive. The antibody prevalence against CIV in Germany in this study ranged from 0,0 to 1,24 % with a confidence interval (CI) of 95 %.

This study shows that the risk of an infection with CIV in clinically healthy dogs as well as in dogs with suspicious clinical signs can be considered low in Germany at the moment. However, because in the last few years outbreaks of CIV infections were seen worldwide (CRAWFORD et al., 2005; DALY et al., 2008; PAYUNGPORN et al., 2008; KIRKLAND et al., 2010), practitioners in Germany should always consider an infection with CIV as a possible differential diagnosis in dogs with suspicious clinical signs, especially if the dogs were imported from a

region, where CIV is endemic, or if they had contact with horses.

VIII. Literaturverzeichnis

Bean WJ, Schell M, Katz J, Kawaoka Y, Naeve C, Gorman O, Webster RG. Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. *J Virol* 1992; 66: 1129-38.

Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* 2000; 74: 29-46.

Bundesamt für Kartographie und Geodäsie. Deutschlandkarte. Frankfurt am Main. <http://www.bkg.bund.de>; aufgerufen am 19.09.2011

Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. *Vet Res* 2007; 38: 355-73.

Bush RM, Fitch WM, Bender CA, Cox NJ. Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 1457-65.

Butler D. Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? *Nature* 2006; 439: 773.

Capua I, Marangon S, Cordioli P, Bonfanti L, Santucci U. H7N3 avian influenza in Italy. *Vet Rec* 2002a; 151: 743-4.

Capua I, Mutinelli F, Pozza MD, Donatelli I, Puzelli S, Cancellotti FM. The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications. *Acta Trop* 2002b; 83: 7-11.

Choi YK, Seo SH, Kim JA, Webby RJ, Webster RG. Avian influenza viruses in Korean live poultry markets and their pathogenic potential. *Virology* 2005; 332: 529-37.

Claas EC, de Jong JC, van Beek R, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* 1998; 16: 977-8.

Clark A. Canine influenza virus surfaces. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227: 1377-8.

Cornell University College of Veterinary Medicine. Emerging issues - canine influenza: test summary for canine influenza virus in dogs not affiliated with greyhound racetracks Animal Health Diagnostic Center. Ithaca, New York, <http://diaglab.vet.cornell.edu/pdf/CIV-Status.pdf>, aufgerufen im Juni 2009

Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EP, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Pompey J, Bright RA, Medina MJ, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AI, Katz JM, Donis RO. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science* 2005; 310: 482-5.

Daly JM. Equine influenza in dogs: too late to bolt the stable door? *Vet J* 2006; 171: 7-8.

Daly JM, Blunden AS, Macrae S, Miller J, Bowman SJ, Kolodziejek J, Nowotny N, Smith KC. Transmission of equine influenza virus to English foxhounds. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 461-4.

Daly JM, Macrae S, Newton JR, Wattrang E, Elton DM. Equine influenza: A review of an unpredictable virus. *Vet J* 2010; 189: 7-14

De Benedictis P, Anderson TC, Perez A, Viale E, Veggiato C, Tiozzo Caenazzo S, Crawford PC, Capua I. A diagnostic algorithm for detection of antibodies to influenza A viruses in dogs in Italy (2006-2008). *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 914-20.

Deshpande M, Abdelmagid O, Tubbs A, Jayappa H, Wasmoen T. Experimental reproduction of canine influenza virus H3N8 infection in young puppies. *Vet Ther* 2009; 10: 29-39.

Doerr HW, Gerrlich WH, Orthomyxoviren (Influenzaviren). In: Doerr HW, Gerrlich WH, editor. *Medizinische Virologie; Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*, 2 edn, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009. p. 601.

Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ. RNA virus fitness. *Rev Med Virol* 1997; 7: 87-96.

Dubovi EJ, Njaa BL. Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38: 827-35.

Dubovi EJ. Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 1063-71.

Dundon WG, De Benedictis P, Viale E, Capua I. Serologic evidence of pandemic (H1N1) 2009 infection in dogs, Italy. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 2019-21.

Enserink M. Epidemiology. Horse flu virus jumps to dogs. *Science* 2005; 309: 2147.

Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1356-61.

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza

A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79: 2814-22.

Gaush CR, Smith TF. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol* 1968; 16: 588-94.

Gibbs EP, Anderson TC. Equine and canine influenza: a review of current events. *Anim Health Res Rev* 2010: 1-9.

Giese M, Harder TC, Teifke JP, Klopfleisch R, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW. Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 308-10.

Groen J, Claas EC, Balentien E, Braakman D, Osterhaus AD. High influenza morbidity and mortality in unvaccinated elderly people in Curacao. *J Infect* 1998; 36: 241-2.

Harder TC, Vahlenkamp TW. Influenza virus infections in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 134: 54-60.

Holt DE, Mover MR, Brown DC. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 237: 71-3.

Jirjis FF, Deshpande MS, Tubbs AL, Jayappa H, Lakshmanan N, Wasmoen TL. Transmission of canine influenza virus (H3N8) among susceptible dogs. *Vet Microbiol* 2010; 144 (3-4): 303-9

Jung K, Lee CS, Kang BK, Park BK, Oh JS, Song DS. Pathology in dogs with experimental canine H3N2 influenza virus infection. *Res Vet Sci* 2010; 88: 523-7.

Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theambooniers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus DM, Poovorawan Y. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2189-91.

Kirkland PD, Finlaison DS, Crispe E, Hurt AC. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 699-702.

Klopfleisch R, Wolf PU, Uhl W, Gerst S, Harder T, Starick E, Vahlenkamp TW, Mettenleiter TC, Teifke JP. Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Vet Pathol* 2007; 44: 261-8.

Kogure T, Suzuki T, Takahashi T, Miyamoto D, Hidari KI, Guo CT, Ito T, Kawaoka Y, Suzuki Y. Human trachea primary epithelial cells express both sialyl(alpha2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl(alpha2-6)Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj J* 2006; 23: 101-6.

Kruth SA, Carman S, Weese JS. Seroprevalence of antibodies to canine influenza virus in dogs in Ontario. *Can Vet J* 2008; 49: 800-2.

Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. Host species barriers to influenza virus infections. *Science* 2006; 312: 394-7.

Lee C, Song D, Kang B, Kang D, Yoo J, Jung K, Na G, Lee K, Park B, Oh J. A serological survey of avian origin canine H3N2 influenza virus in dogs in Korea. *Vet Microbiol* 2009; 137: 359-62.

Leschnik M, Weikel J, Mostl K, Revilla-Fernandez S, Wodak E, Bago Z, Vanek E, Benetka V, Hess M, Thalhammer JG. Subclinical infection with avian influenza A (H5N1) virus in cats. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 243-7.

Levy JK, Lappin MR, Glaser AL, Birkenheuer AJ, Anderson TC, Edinboro CH. Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following Hurricane Katrina. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238: 311-7.

Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. Influenza: emergence and control. *J Virol* 2004; 78: 8951-9.

Lu BL, Webster RG, Hinshaw VS. Failure to detect hemagglutination-inhibiting antibodies with intact avian influenza virions. *Infect Immun* 1982; 38: 530-5.

Martella V, Elia G, Decaro N, Di Trani L, Lorusso E, Campolo M, Desario C, Parisi A, Cavaliere N, Buonavoglia C. An outbreak of equine influenza virus in vaccinated horses in Italy is due to an H3N8 strain closely related to recent North American representatives of the Florida sub-lineage. *Vet Microbiol* 2007; 121: 56-63.

Merck Animal Health. Copyright© Intervet Inc. Boxmeer, Niederlande. States with CIV. http://doginfluenza.com/states_with_civ.asp, aufgerufen im August 2011

Mumford JA. The equine influenza surveillance program. *Adv Vet Med* 1999; 41: 379-87.

Muranaka M, Yamanaka T, Katayama Y, Hidari K, Kanazawa H, Suzuki T, Oku K, Oyamada T. Distribution of influenza virus sialoreceptors on upper and lower respiratory tract in horses and dogs. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 125-7.

Murcia PR, Baillie GJ, Daly J, Elton D, Jervis C, Mumford JA, Newton R, Parrish CR, Hoelzer K, Dougan G, Parkhill J, Lennard N, Ormond D, Moule S, Whitwham A, McCauley JW, McKinley TJ, Holmes EC, Grenfell BT, Wood JL. Intra- and interhost evolutionary dynamics of equine influenza virus. *J Virol* 2010; 84: 6943-54.

Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 196-205.

Newton JR, Verheyen K, Wood JL, Yates PJ, Mumford JA. Equine influenza in the United Kingdom in 1998. *Vet Rec* 1999a; 145: 449-52.

Newton JR, Wood JL, Jessett D, Yates PJ, Mumford JA. 'Cross-protection' and 'cross-reaction' with equine influenza vaccines. *Vet Rec* 1999b; 145: 647.

Newton JR, Daly JM, Spencer L, Mumford JA. Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. *Vet Rec* 2006; 158: 185-92.

Newton R, Cooke A, Elton D, Bryant N, Rash A, Bowman S, Blunden T, Miller J, Hammond TA, Camm I, Day M. Canine influenza virus: cross-species transmission from horses. *Vet Rec* 2007; 161: 142-3.

Payungporn S, Crawford PC, Kouo TS, Chen LM, Pompey J, Castleman WL, Dubovi EJ, Katz JM, Donis RO. Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 902-8.

Piccirillo A, Pasotto D, Martin AM, Cordioli P. Serological survey for influenza type a viruses in domestic dogs (*canis lupus familiaris*) and cats (*felis catus*) in north-eastern Italy. *Zoonoses Public Health* 2010; 57: 239-43.

Plotkin JB, Dushoff J. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7152-7.

Price PM, Reichelderfer CF, Johansson BE, Kilbourne ED, Acs G. Complementation of recombinant baculoviruses by coinfection with wild-type

virus facilitates production in insect larvae of antigenic proteins of hepatitis B virus and influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 1453-6.

Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 2008; 453: 615-9.

Rivailler P, Perry IA, Jang Y, Davis CT, Chen LM, Dubovi EJ, Donis RO. Evolution of canine and equine influenza (H3N8) viruses co-circulating between 2005 and 2008. *Virology* 2010; 408: 71-9.

Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson IA, Wiley DC. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* 1983; 304: 76-8.

Rolle M, Mayr A, Infektionen und Erkrankungen durch Orthomyxoviren. In: Mayr, A., editor. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 8 edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006. p. 290.

Rosas C, Van de Walle GR, Metzger SM, Hoelzer K, Dubovi EJ, Kim SG, Parrish CR, Osterrieder N. Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. *Vaccine* 2008; 26: 2335-43.

Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kelso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier RA, Smith DJ. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science* 2008; 320: 340-6.

Said AW, Usui T, Shinya K, Ono E, Ito T, Hikasa Y, Matsuu A, Takeuch T, Sugiyama A, Nishii N, Yamaguchi T. A Sero-Survey of Subtype H3 Influenza A Virus Infection in Dogs and Cats in Japan. *J Vet Med Sci* 2010;

Sandrock C. Avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 32: 253-4.

Sharp GB, Kawaoka Y, Wright SM, Turner B, Hinshaw V, Webster RG. Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes. *Epidemiol Infect* 1993; 110: 161-76.

Shephard RJ, Shek PN. Cold exposure and immune function. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 828-36.

Skibbe D, Zhou EM, Janke BH. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine influenza virus (H1N1) infection. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 86-9.

Smith KC, Daly JM, Blunden AS, Laurence CJ. Canine influenza virus. *Vet Rec* 2005; 157: 599.

Song D, Kang B, Lee C, Jung K, Ha G, Kang D, Park S, Park B, Oh J. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 741-6.

Song D, Lee C, Kang B, Jung K, Oh T, Kim H, Park B, Oh J. Experimental infection of dogs with avian-origin canine influenza A virus (H3N2). *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 56-8.

Song D, Moon H, Jung K, Yeom M, Kim H, Han S, An D, Oh J, Kim J, Park B, Kang B. Association between nasal shedding and fever that influenza A (H3N2) induces in dogs. *Virol J* 2011; 8: 1.

Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chutinimitkul S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1744-7.

Sovinova O, Tumova B, Pouska F, Nemeč J. Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol* 1958; 2: 52-61.

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3256-60.

Spokes PJ, Marich AJ, Musto JA, Ward KA, Craig AT, McAnulty JM. Investigation of equine influenza transmission in NSW: walk, wind or wing? *N S W Public Health Bull* 2009; 20: 152-6.

Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279: 393-6.

Suzuki T, Takahashi T, Guo CT, Hidari KI, Miyamoto D, Goto H, Kawaoka Y, Suzuki Y. Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J Virol* 2005; 79: 11705-15.

Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Jr., Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 2000; 74: 11825-31.

Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T, Vivatthanavanich V, Lekdumrongsak T, Kesdangakonwut S, Tunhikorn S, Poovorawan Y. Probable tiger-to-tiger transmission of avian

influenza H5N1. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 699-701.

Waddell GH, Teigland MB, Sigel MM. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J Am Vet Med Assoc* 1963; 143: 587-90.

Webby R, Hoffmann E, Webster R. Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens. *Nat Med* 2004; 10: S77-81.

Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 1978; 84: 268-78.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-79.

Webster RG. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet J* 1993; 25: 537-8.

Webster RG. The importance of animal influenza for human disease. *Vaccine* 2002; 20 Suppl 2: S16-20.

Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 2007; 447: 279-83.

Wood JM. Selection of influenza vaccine strains and developing pandemic vaccines. *Vaccine* 2002; 20 Suppl 5: B40-4.

Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y (2007) *Orthomyxoviruses*, 5 edn, Philadelphia

Wright PF NG, Kawaoka Y (2007) *Orthomyxoviruses*, 5 edn, Philadelphia

Yamanaka T, Nemoto M, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T. Interspecies transmission of equine influenza virus (H3N8) to dogs by close contact with experimentally infected horses. *Vet Microbiol* 2009; 139: 351-5.

Yoon KJ, Cooper VL, Schwartz KJ, Harmon KM, Kim WI, Janke BH, Strohbehn J, Butts D, Troutman J. Influenza virus infection in racing greyhounds. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1974-6.

Standardisiertes Untersuchungsprotokoll

<u>Untersuchungsprotokoll</u>	
Datum der Untersuchung: _____	
Patientenname: _____	Patientennummer: _____
<u>Klinische Untersuchung:</u>	
1. Allgemeinbefinden:	__ ungestört __ gestört
2. Innere Körpertemperatur (°C):	_____
3. Maulhöhleninspektion:	_____
4. Schleimhautfarbe:	__ blass __ rosa __ gerötet __ zyanotisch
5. Kapilläre Füllungszeit:	__ ≤ 2 Sek. __ > 2 Sek.
6. Lymphknoten:	__ von normaler Größe __ vergrößert
7. Herzfrequenz (Schläge/Minute):	_____
8. Auskultation Herz:	__ ohne Befund __ Herzgeräusch
9. Pulsqualität:	_____
10. Atemfrequenz (Atemzüge/Minute):	_____
11. Lungenauskultation:	__ ohne Befund __ ggr. __ mgr. __ hgr. verschärft
12. Husten auslösbar?:	__ ja __ nein
13. Nasenausfluss?:	__ ja __ nein
	__ serös __ mukös __ blutig
14. Palpation Abdomen:	_____
15. Sonstiges:	_____

Besitzerfragebogen gesunde Greyhounds

Patientennummer: _____

1. Name des Besitzers: _____ email: _____

Postleitzahl: _____ Telefon: _____ (für Rückfragen)

2. Name des Hundes: _____

3. Alter des Hundes (in Jahren & Monaten): _____

4. Geschlecht: __ männlich __ weiblich __ kastriert

Zutreffendes bitte ankreuzen:

5. Nimmt Ihr Hund an Rennen teil? __ ja __ nein

6. Besitzen Sie weitere Tiere? __ ja __ nein

Welche? _____

7. Wie oft hat Ihr Hund Kontakt zu anderen Hunden?

__ gelegentlich __ regelmäßig __ ständig

8. Hat oder hatte Ihr Hund Kontakt zu Pferden? __ ja __ nein9. Hat Ihr Hund in der Vergangenheit schon einmal Atemwegssymptomatik wie Husten,Nasenausfluss oder Niesen gezeigt? __ ja __ nein10. Auslandsaufenthalte (bereiste Länder): _____Einverständniserklärung:

Ich bin einverstanden, dass meinem Hund zu wissenschaftlichen Zwecken 5 ml Blut entnommen werden, um den Influenza-Antikörpertiter zu bestimmen.

Unterschrift_____
Ort, Datum

Besitzerfragebogen gesunde Windhunde anderer Rassen

Patientennummer: _____

1. Name des Besitzers: _____ email: _____

Postleitzahl: _____ Telefon: _____ (für Rückfragen)

2. Name des Hundes: _____

3. Alter des Hundes (in Jahren & Monaten): _____

4. Geschlecht: __ männlich __ weiblich __ kastriert

Zutreffendes bitte ankreuzen:

5. Nimmt Ihr Hund an Rennen teil? __ ja __ nein

6. Besitzen Sie weitere Tiere? __ ja __ nein

Welche? _____7. Wie oft hat Ihr Hund Kontakt zu anderen Hunden?

__ gelegentlich __ regelmäßig __ ständig

8. Hat oder hatte Ihr Hund Kontakt zu Pferden? __ ja __ nein9. Hat Ihr Hund in der Vergangenheit schon einmal Atemwegssymptomatik wie Husten,Nasenausfluss oder Niesen gezeigt? __ ja __ nein10. Auslandsaufenthalte (bereiste Länder): _____Einverständniserklärung:

Ich bin einverstanden, dass meinem Hund zu wissenschaftlichen Zwecken 5 ml Blut entnommen werden, um den Influenza-Antikörpertiter zu bestimmen.

Unterschrift_____
Ort, Datum

Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zum Traumberuf Tierärztin sowie während meiner Zeit als Doktorandin so tatkräftig und geduldig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, die mir die Anfertigung dieser Arbeit sowie die Mitarbeit in der Medizinischen Kleintierklinik ermöglicht hat. Ich bedanke mich an dieser Stelle für ihre Unterstützung und ihre kreativen Anregungen sowie Korrekturvorschläge während der Verfassung dieser Arbeit.

Bei meiner Betreuerin Dr. Bianka Schulz möchte ich mich hiermit für das interessante Thema, all die Hilfestellungen, die herausragende Betreuung sowie die Korrektur meiner Arbeit ganz herzlich bedanken. Durch ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation hat sie mir die Anfertigung der Arbeit ermöglicht und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Ralf Müller möchte ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktorandenkollegin Teresa Keiditsch, die mir bei der statistischen Auswertung, vor allem im Umgang mit SPSS, eine große Hilfe war. Auch gilt mein besonderer Dank all meinen lieben Doktorandenkolleginnen, die mich stets in meinem Handeln bestärkt und mich motiviert haben. Insbesondere dank ihnen wurde die Doktorandenzeit zu einem ganz besonderen, unvergesslichen Lebensabschnitt, an den ich immer wieder gern zurückdenken werde. Ich habe während dieser Zeit viele neue Freunde gewonnen. Auch möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich bei meiner Probensammlung und –bearbeitung unterstützt haben.

Bei all denjenigen, die mir ihre Hunde zur Blutprobenentnahme zur Verfügung stellten und somit die große Zahl an Studienteilnehmern ermöglichten, möchte ich mich hiermit ganz herzlich bedanken. Insbesondere Frau Astrid Knauber war mir hierbei eine große Unterstützung.

Zudem möchte ich allen Oberärzten sowie Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik für die schöne Zusammenarbeit sowie die gute Anleitung in der Aufarbeitung zum Teil sehr komplizierter internistischer Fälle danken.

Auch möchte ich mich bei Patty Cynthia Crawford von der University of Florida sowie bei Paola De Benedictis vom Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie für die hervorragende Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Probenanalyse bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, bedanken, die sowohl während des Studiums als auch während der Doktorandenzeit immer verständnisvoll hinter mir stand und so manche Launen geduldig ertragen hat und meinen beruflichen Werdegang stets interessiert verfolgte. Mein besonderer Dank gilt auch meinem Freund, der mir insbesondere in den letzten Zügen meiner Doktorandenphase eine riesige Unterstützung war und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.