

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Untersuchungen zur Diagnose und Therapie der caninen
Parvovirose

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

von Anna-Lena Proksch

aus Nürnberg

München 2015

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Für meine geliebten Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT..... | 2 |
| 1. | Canine Parvovirose | 2 |
| 1.1. | Pathogenese | 2 |
| 1.1.1. | Infektion mit caninen Parvoviren | 2 |
| 1.1.1.1. | Oronasale Infektion | 2 |
| 1.1.1.2. | Virämie und Verteilung des Virus im Körper | 3 |
| 1.1.2. | Symptome..... | 4 |
| 1.1.2.1. | Klinische und histopathologische Befunde | 4 |
| 1.1.2.1.1. | CPV-Enteritis | 4 |
| 1.1.2.1.2. | CPV-Myokarditis | 6 |
| 1.1.2.2. | Laborveränderungen..... | 7 |
| 1.1.2.2.1. | Neutropenie | 7 |
| 1.1.2.2.2. | Lymphopenie..... | 8 |
| 1.1.2.2.3. | Thrombozytopenie | 9 |
| 1.1.2.2.4. | Anämie | 9 |
| 1.1.2.2.5. | Hypoproteinämie..... | 10 |
| 1.2. | Diagnostische Verfahren | 10 |
| 1.2.1. | Direkter Erregernachweis..... | 10 |
| 1.2.1.1. | Virusisolierung..... | 11 |
| 1.2.1.2. | Haemagglutinationstest | 11 |
| 1.2.1.3. | Elektronenmikroskopie | 13 |
| 1.2.1.4. | Enzyme-linked Immunosorbent Assay | 13 |
| 1.2.1.5. | Polymerase-Kettenreaktion | 15 |
| 1.2.2. | Indirekter Erregernachweis | 16 |
| 2. | Paramunisierung | 17 |
| 2.1. | Definition der Paramunität | 18 |
| 2.2. | Paramunitätsinducer | 18 |
| 2.2.1. | PIND-ORF als Paramunitätsinducer | 19 |
| 2.2.2. | Einsatz von PIND-ORF beim Hund..... | 21 |
| III. | EFFICACY OF THE PARAMUNITY INDUCER PIND-ORF IN THE TREATMENT OF CANINE PARVOVIROSIS..... | 23 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| IV. | INFLUENCE OF CLINICAL AND LABORATORY VARIABLES ON FECAL ANTIGEN ELISA RESULTS IN DOGS WITH PARVOVIROSIS | 32 |
| V. | DISKUSSION | 38 |
| VI. | ZUSAMMENFASSUNG | 52 |
| VII. | SUMMARY | 54 |
| VIII. | LITERATURVERZEICHNIS | 56 |
| IX. | DANKSAGUNG | 72 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------|--|
| AT | Antithrombin; Antithrombin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CPV | Canine parvovirus; Canines Parvovirus |
| DIC | Disseminate Intravascular Coagulopathy; disseminierte intravasale Koagulopathie/Verbrauchskoagulopathie |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Enzym- gekoppelter Immunadsorptionstest |
| EM | Electron Microscopy; Elektronenmikroskopie |
| HA | Haemagglutination Assay; Haemagglutinationstest |
| HI | Haemagglutination Inhibition; Haemagglutinations- Hemmtest |
| IFN | Interferon; Interferon |
| IL | Interleukin; Interleukin |
| MDA | Maternally Derived Antibodies; Maternale Antikörper |
| MGB | Minor Groove Binder |
| MHC | Major Histokompatibly Complex; Major- Histokompatibilitäts-Komplex |
| PCR | Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion |
| rfIFN- ω | Recombinant Feline Interferon omega; rekombinates felines Interferon omega |
| VI | Virus Isolation; Virusisolierung |

I. EINLEITUNG

Die weltweit verbreitete Parvovirose des Hundes wird durch das canine Parvovirus (CPV) 2a, 2b und 2c verursacht (PARRISH et al., 1988; PARRISH et al., 1991; PEREIRA et al., 2000; TRUYEN, 2006). Sie ist die häufigste Viruserkrankung bei Welpen (MARULAPPA und KAPIL, 2009). In der Abwehr von Infektionserregern hat das unspezifische Immunsystem eine wichtige Funktion (POLLOCK und CARMICHAEL, 1982; TOMAN et al., 2002; DAY, 2007; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Paramunitätsinducer werden seit Jahrzehnten eingesetzt, um das unspezifische Immunsystem zu stimulieren (MAYR und BUTTNER, 1984; MAYR und MAYR, 1999). Es gibt jedoch nur wenige Placebo-kontrollierte Studien, die deren Wirksamkeit evaluierten (KLIMENTOWSKI et al., 1992; BLOCK et al., 1997; ZIEBELL et al., 1997b; KYRIAKIS et al., 1998). Besonders beim Hund gibt es nur sehr wenige Daten über den Einsatz von Paramunitätsinducern. Ziel der ersten Studie war, herauszufinden, ob der therapeutische Einsatz des Paramunitätsinducers PINDORF bei an Parvovirose erkrankten Hunden einen positiven Effekt auf die Schwere der Symptome, den Verlauf der Krankheit und die Mortalitätsrate hat.

Eine frühzeitige und schnelle Diagnosestellung der Parvovirose ist essentiell. Kranke Welpen sollen schnellstmöglich erkannt werden, um sie zeitnah einer intensiven, lebensrettenden Therapie zu unterziehen und um ein striktes Hygienemanagement zu gewährleisten, damit die Verbreitung des Virus und die Ansteckung von anderen empfänglichen Hunden und Katzen bestmöglich vermieden werden kann (DESARIO et al., 2005; LITSTER et al., 2012a; LITSTER et al., 2012b). Praxistaugliche Schnelltests auf Antigen-ELISA-Basis, wie der SNAP[®] Parvo Test, Idexx laboratories GmbH, sind weltweit im Einsatz (SCHMITZ et al., 2009; DECARO et al., 2010; MARKOVICH et al., 2012). Falsch-negative Testergebnisse sind jedoch häufig und stellen sowohl für das individuelle Tier, als auch die gesamte Hundepopulation ein Risiko dar. Ziel der zweiten Studie war daher, herauszufinden, ob Tiere mit falsch-negativem ELISA-Ergebnis mildere klinische Symptome und Laborveränderungen und einen milderen klinischen Verlauf zeigen sowie eine geringere Viruslast im Darm und höhere Mengen von Antikörpern in Kot und Serum aufweisen oder mit anderen Virusstämmen infiziert sind.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Canine Parvovirose

Aufgrund ihrer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate ist die weltweit auftretende canine Parvovirose noch immer die häufigste und wichtigste Infektionskrankheit von Welpen (GODDARD und LEISEWITZ, 2010).

1.1. Pathogenese

Canine Parvoviren (CPV) wurden erstmals Ende der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts beschrieben. Sie entstanden durch Mutation entweder direkt aus dem feline Parvovirus oder aus einem gemeinsamen Verwandten und wurden sehr schnell zu einem wichtigen Pathogen in Hundepopulationen weltweit (APPEL et al., 1979; BURTONBOY et al., 1979). Die erste Variante, CPV 2 wurde bereits Mitte der 80er Jahre vollständig durch zwei weitere Varianten, CPV 2a und CPV 2b, ersetzt (PARRISH et al., 1988; PARRISH et al., 1991; PEREIRA et al., 2000; TRUYEN, 2006). BUONAVOGLIA und Mitarbeiter (2001) beschrieben in Italien erstmals das Auftreten einer weiteren Mutante, CPV 2c, welche durch eine einzelne Mutation aus CPV 2b entstand (BUONAVOGLIA et al., 2001). Alle drei Varianten existieren mittlerweile weltweit (DECARO et al., 2007a; KAPIL et al., 2007; TOUIHRI et al., 2009; NANDI et al., 2010).

1.1.1. Infektion mit caninen Parvoviren

Die Infektion mit CPV erfolgt meist horizontal durch Kontakt zu infizierten Tieren oder virushaltigem Kot (TERAMOTO et al., 1984). Eine intrauterine Übertragung ist jedoch ebenfalls möglich (HOSKINS, 1997).

1.1.1.1. Oronasale Infektion

Die Ausscheidung von Parvoviren erfolgt hauptsächlich über den Kot infizierter Tiere (TERAMOTO et al., 1984). Parvoviren werden aber auch mit allen anderen Se- und Exkreten ausgeschieden. Die Virusübertragung erfolgt hauptsächlich

durch Belecken, Beschnüffeln oder Aufnahme von virushaltigem Kot. Eine Infektion kann allerdings auch durch Belecken und Beschnüffeln von anderen Tieren erfolgen, deren Fell mit virushaltigem Kot oder anderen Sekreten kontaminiert ist. Auch Nager oder Insekten können als Überträger des Virus fungieren, indem sie Viruspartikel an ihrem Körper tragen und verbreiten (HOSKINS, 1997; CRAWFORD und SELTON, 2010; GODDARD und LEISEWITZ, 2010; STERN, 2010).

1.1.1.2. Virämie und Verteilung des Virus im Körper

Nach oronasaler Aufnahme vermehrt sich CPV zuerst in den lymphatischen Geweben nahe der Viruseintrittspforte, in den Tonsillen und retropharyngealen Lymphknoten. Erst etwa am dritten Tag nach Infektion tritt das Virus in das Blut über; es kommt zur Virämie. Ausmaß und Dauer der Virämie sind bei Hunden mit klinisch manifester Parvovirose stärker bzw. länger ausgeprägt als bei infizierten, jedoch klinisch asymptomatischen Tieren. Mit dem Auftreten von Antikörpern im Blut wird die Virämie beendet (MEUNIER et al., 1985b).

Das Auftreten der Virämie kann erstmals zwischen dem dritten und vierten Tag nach oraler Infektion beobachtet werden und ist etwa am sechsten Tag beendet (MEUNIER et al., 1985a). Ab dem fünften Tag nach oraler Infektion kann CPV in nahezu allen Organen des Körpers nachgewiesen werden. Die Infektion des Darmepithels erfolgt am vierten oder fünften Tag nach Infektion. Eine Infektion des Darmepithels tritt nur nach Virämie ein, nicht durch direktes Eindringen von Virus aus dem Darm. CPV kann nicht nur im Darmepithel, sondern auch in Lunge, Milz, Leber, Nebennieren, Pankreas und anderen Organen nachgewiesen werden (MEUNIER et al., 1985a). Die Virusausscheidung über den Kot erfolgt etwa ab dem vierten bis sechsten Tag nach Infektion. Symptomatische Hunde scheiden signifikant höhere Mengen an CPV aus als asymptomatische Tiere (MEUNIER et al., 1985b). Die Dauer der Virusausscheidung variiert; in der Regel liegt sie bei zwei bis sechs Wochen (DECARO et al., 2005b).

1.1.2. Symptome

Parvoviren sind einzelsträngige DNA-Viren, die für ihre Replikation Zellen mit hoher Mitoserate benötigen. Die Viren sind auf die späte DNA-Synthesephase im Zyklus der Wirtszelle angewiesen (LENGHAUS und STUDDERT, 1984). Sie replizieren daher bevorzugt in sich schnell teilenden Zellen, wie in Zellen des lymphatischen Gewebes, des Darmes und des Knochenmarks (TRUYEN und PARRISH, 1992). Bei Neonaten weisen die Myokardzellen ebenfalls noch eine sehr hohe Mitoserate auf, so dass bei Feten und Neonaten häufig auch eine Virusreplikation im Herzmuskel stattfindet (PARRISH, 1995). Das Krankheitsbild der Parvovirose ist variabel. Hunde können sich auch mit CPV infizieren, ohne Symptome auszubilden oder einen nur milden Krankheitsverlauf zeigen (THOMSON und GAGNON, 1978; MEUNIER et al., 1985b; DECARO et al., 2005a; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

1.1.2.1. Klinische und histopathologische Befunde

Die Parvovirose kann sich in zwei unterschiedlichen klinischen Formen präsentieren. Während die CPV-Enteritis bei Hunden jeden Alters auftreten kann, ist die CPV-Myokarditis bei Feten und Neonaten mittlerweile nur noch selten zu beobachten (GODDARD und LEISEWITZ, 2010).

1.1.2.1.1. CPV-Enteritis

Bei der CPV-Enteritis handelt es sich um die häufigste klinische Manifestation der Parvovirose. Betroffen sind vor allem Welpen im Alter von bis zu sechs Monaten (GODDARD und LEISEWITZ, 2010).

Parvoviren benötigen für ihre Replikation Zellen mit hoher Mitoserate (LENGHAUS und STUDDERT, 1984). Sie replizieren daher unter anderem bevorzugt im Keimepithel der intestinalen Kryptenzellen, wodurch der Nachschub von Epithelzellen gestört ist. Das Darmepithel wird zerstört. Nachfolgend führt dies zum Kollaps der Krypten und zu Durchfall (ROBINSON et al., 1980; MEUNIER et al., 1985a; STERN, 2010).

Die CPV-Enteritis kann sehr unterschiedlich verlaufen. Neben milden klinischen Symptomen kann es bei manchen Hunden auch zu schweren klinischen

Symptomen mit tödlichem Verlauf kommen (THOMSON und GAGNON, 1978; MEUNIER et al., 1985b; DECARO et al., 2005a; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). Meist genesen die Hunde innerhalb einer Woche, der Heilungsprozess kann jedoch bei schwerem Krankheitsverlauf verzögert sein (IRIS et al., 2010; GREENE und DECARO, 2012). Typischerweise leiden Welpen mit CPV-Infektion an Fieber, Anorexie und Apathie. Starker, teils wässriger Durchfall und Erbrechen, die beide auch blutig sein können, entstehen durch die Kryptenzerstörung aufgrund der Virusreplikation. Der blutige Durchfall entsteht vermutlich nicht allein durch die Kryptenschädigung des Darms, sondern kann auch eine Folge von bakteriellen Toxinen und Zytokinproduktion im Rahmen einer Sepsis sein (GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Sonographisch lassen sich häufig korrugierte oder atonische, flüssigkeitsgefüllte Dünn- und Dickdarmschlingen darstellen. Die Tiere zeigen oft ein schmerzhaftes Abdomen. Die Schmerzhaftigkeit kann durch die Enteritis selbst ausgelöst sein, jedoch auch als Folge einer Invagination aufgrund hypo- und hypermotiler Darmschlingen auftreten (GODDARD und LEISEWITZ, 2010).

Als Folge des Durchfalls kommt es durch den massiven Flüssigkeitsverlust über den Darm zur Dehydratation. Da Welpen einen besonders fragilen Wasserhaushalt haben, kann es durch den schweren Flüssigkeitsverlust auch zum hypovolämischen Schock kommen (GODDARD und LEISEWITZ, 2010).

Durch die Virusvermehrung in den Darmzellen wird die Darmschranke geschädigt. Als Folge davon können Bakterien aus dem Darm in das Blut übertreten und eine Septikämie verursachen. Dies kann zu einem septischen Schock führen (OTTO et al., 1997). Je nach Schwere der Symptome und abhängig von Komplikationen, wie hypovolämischem Schock, Sepsis und Invagination, kann die Krankheit tödlich enden (THOMSON und GAGNON, 1978; MEUNIER et al., 1985b; DECARO et al., 2005a; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

In der pathologischen Untersuchung erscheint das Kryptenepithel des gesamten Darmes degeneriert, nekrotisch und hyperplastisch, wobei Duodenum und Jejunum am stärksten betroffen sind. Die Villi sind atrophiert, abgestumpft und verschmolzen, die Darmkrypten sind dilatiert und enthalten Zelldebris. Die Peyer'schen Platten sind eingesunken und weisen einen Verlust an Lymphozyten auf. Meist wird eine akute, diffuse, nekrotisierende Enteritis nachgewiesen (ROBINSON et al., 1980; MEUNIER et al., 1985a; STERN, 2010).

1.1.2.1.2. CPV-Myokarditis

Die CPV-Myokarditis wird heutzutage kaum noch beobachtet, da die adulten Hündinnen in der Regel geimpft sind oder Antikörper durch natürliche Exposition und Infektion mit CPV gebildet haben. Die CPV-Myokarditis tritt nur bei Nachkommen von Hündinnen ohne Immunität auf, wenn deren Feten oder Welpen im Alter von bis zu acht Wochen infiziert werden (HOSKINS, 1997; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Welpen werden in den ersten Lebenswochen generell durch die Aufnahme von maternalen Antikörpern (maternally derived antibodies, MDA) aus der Muttermilch geschützt (POLLOCK und CARMICHAEL, 1982; O'BRIEN, 1994; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Betroffen von der CPV-Myokarditis sind daher nur Welpen, die durch Fehlen von Antikörpern der Mutter und damit auch in der Milch nicht geschützt sind (STUDDERT et al., 1983; IRIS et al., 2010). Außerdem sind auch die Welpen gefährdet, die in den ersten Lebensstunden kein oder nicht ausreichend Kolostrum aufnehmen (CHAPPUIS, 1998; ELIA et al., 2005; GREENE und LEVY, 2012).

Bei Feten und Neonaten weisen die Myokardzellen im Gegensatz zu älteren Tieren noch eine hohe Mitoserate auf. Somit ist auch das Myokard dieser sehr jungen Welpen ein bevorzugtes Zielgewebe für die Replikation von Parvoviren (LENGHAUS und STUDDERT, 1984). Bei dieser akuten Myokarditis sterben die Welpen meist einen plötzlichen Herztod, ohne vorher Symptome zu zeigen (HAYES et al., 1979; LENGHAUS et al., 1980; BASTIANELLO, 1981). Der Tod tritt in der Regel infolge schwerer ventrikulärer Arrhythmien ein (ROBINSON et al., 1980). Nur selten sind Dyspnoe und nachfolgender Kollaps zu beobachten (LENGHAUS et al., 1980; MULVEY et al., 1980). Bei Welpen mit chronischer CPV-Myokarditis kommt es aufgrund der Myokarditis-bedingten anatomischen Veränderungen am Herzen zur Klappeninsuffizienz, Störung der elektrischen Überleitung und Sauerstoffunterversorgung der Myozyten. Wochen oder wenige Monate später kommt es dann zum Tod infolge von Herzversagen (LENGHAUS und STUDDERT, 1984).

Bei der Autopsie von an akuter CPV-Myokarditis verstorbener Welpen ist das Herz meist dilatiert; an der Oberfläche befinden sich irregulär verteilt fokale, blasse Läsionen. Bei der chronischen Form weist das Herz gewöhnlich großflächige interstitielle Fibrosierungen auf. Diese narbigen Einziehungen führen

zu einer irregulären Oberflächenform des Epikards (LENGHAUS und STUDDERT, 1984).

Histopathologisch handelt es sich bei der akuten CPV-Myokarditis um eine nicht-eitrige, lymphozytäre, interstitielle Myokarditis mit intranukleären, basophilen Einschlusskörperchen in den Myozyten. In einigen Fällen können auch nekrotische Muskelfasern zwischen entzündlichen Infiltraten aus neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten gefunden werden (MEUNIER et al., 1984; AGUNGPRIYONO et al., 1999). Besteht die CPV-Myokarditis über mehrere Wochen, kommt es durch Degeneration und Nekrose von Myozyten und durch extensive Entzündungsinfiltrate zur interstitiellen Fibrosierung (MEUNIER et al., 1984). Bei der chronischen CPV-Myokarditis dominiert eine multifokale, extensive interstitielle Fibrose mit Lymphozyten- und Plasmazellinfiltraten (LENGHAUS und STUDDERT, 1984).

1.1.2.2. Laborveränderungen

Die Infektion mit CPV führt meist zu deutlichen Veränderungen im weißen Blutbild, die je nach Schwere der Krankheit unterschiedlich ausgeprägt sein können (MACARTNEY et al., 1984; GODDARD et al., 2008). Häufig korreliert die Schwere der Laborveränderungen (Neutropenie) mit dem Schweregrad der klinischen Symptome (POTGIETER et al., 1981; MEUNIER et al., 1985b).

1.1.2.2.1. Neutropenie

Veränderungen im weißen Blutbild, die bei CPV-Infektion beobachtet werden können, können unterschiedlich stark ausgeprägt sein und auch innerhalb eines CPV-infizierten Wurfes stark variieren. Obwohl die Leukopenie bei CPV-Infektion typisch ist, können auch normale Leukozytenwerte oder eine Leukozytose auftreten. Die für die Krankheit als typisch beschriebene Leukopenie entsteht vorwiegend durch eine Neutropenie ohne Linksverschiebung (APPEL et al., 1979; CARMICHAEL et al., 1983; MACARTNEY et al., 1984; MEUNIER et al., 1985a; MEUNIER et al., 1985b). Eine Neutropenie kann in der Regel um Tag fünf nach Infektion beobachtet werden (MACARTNEY et al., 1984; MEUNIER et al., 1985a), sie kann jedoch auch erst bis zu 11 Tagen nach Infektion auftreten

(MEUNIER et al., 1985b). In einer Studie über CPV 2c trat eine Leukopenie bei gleichzeitig transientser Lymphopenie sogar erst zwischen Tag neun und 13 nach Inokulation des Virus auf (DECARO et al., 2005a).

Mehrere Ursachen tragen zur Neutropenie bei. Die wichtigste Ursache besteht darin, dass CPV in den Granulozytenvorläufern im Knochenmark repliziert und diese dabei zerstört. Dadurch werden vorübergehend kaum oder keine neutrophilen Granulozyten mehr gebildet, weshalb in der Regel eine Neutropenie ohne Linksverschiebung, also ohne die vermehrte Nachbildung von stabkernigen neutrophilen Granulozyten, zu sehen ist (MACARTNEY et al., 1984; REWERTS et al., 1998; COHN et al., 1999; DUFFY et al., 2010). Außerdem kommt es aufgrund der schweren Enteritis zu einem erhöhten Bedarf an neutrophilen Granulozyten, so dass diese schneller aus dem Gefäßsystem austreten und an den Entzündungsherd wandern. Aufgrund des hohen Bedarfs ist der Pool an neutrophilen Granulozyten rasch erschöpft (MACARTNEY et al., 1984; REWERTS et al., 1998; COHN et al., 1999; DUFFY et al., 2010). Nach überstandener Neutropenie kann vorübergehend während der Regenerationsphase, besonders bei vorherigen starken Laborveränderungen, eine hochgradige regenerative Leukozytose durch Neutrophilie, meist auch mit Linksverschiebung, beobachtet werden (POTGIETER et al., 1981).

1.1.2.2.2. Lymphopenie

In vielen Studien wird eine Lymphopenie als häufigste Laborveränderung bei caniner Parvovirose angegeben. Sie kann auch ohne Veränderungen in der Gesamtleukozytenzahl auftreten (APPEL et al., 1979; CARMICHAEL et al., 1983; MEUNIER et al., 1985a; MEUNIER et al., 1985b). Die Lymphopenie kann meist zwei bis fünf Tage nach Infektion beobachtet werden (MEUNIER et al., 1985b). In einer Studie wurde eine Lymphopenie jedoch auch erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt, zwischen Tag neun und Tag 13, beschrieben (DECARO et al., 2005a). Die Lymphopenie lässt sich, wie die Neutropenie, auf eine CPV-induzierte Bildungsstörung zurückführen. Durch extensive Nekrose von Lymphgewebe werden nicht genügend Lymphozyten nachgebildet. Um den vierten Tag nach Infektion kann es zur Lymphozytolyse in Thymus-Cortex und Keimzentren von Lymphknoten kommen (MACARTNEY et al., 1984). Nach

überstandender Infektion kann zwischen Tag 11 und 14 eine Lymphozytose auftreten, allerdings seltener als die reaktive Neutrophilie (POTGIETER et al., 1981).

1.1.2.2.3. Thrombozytopenie

Eine Thrombozytopenie kann bei CPV-Infektion entweder durch verminderte Produktion von Thrombozyten oder durch eine, meist sekundär immunmedierte, Zerstörung (WILSON et al., 1982; GODDARD und LEISEWITZ, 2010) sowie durch eine disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) entstehen. Die DIC wird auf einen Endotoxin- oder Zytokin-mediierten prokoagulatorischen Effekt auf Endothelzellen zurückgeführt. Verlust von Antithrombin III (AT III) über den Darm aufgrund der zerstörten Darmschranke sowie sein Verbrauch aufgrund Endotoxin-mediiertes Aktivierung der Gerinnungskaskade tragen zur Hyperkoagulopathie mit anschließender Verbrauchskoagulopathie bei (OTTO et al., 2000).

1.1.2.2.4. Anämie

Das Auftreten einer Anämie bei Parvovirose ist besonders in der späten Phase einer schweren klinischen Manifestation nicht selten. Im Gegensatz zu einer Virus-bedingten Zerstörung von Vorläuferzellen der Leukozyten ist die Anämie bei Parvovirose weniger auf eine Zerstörung von Erythrozytenvorläufern zurück zu führen, da die Überlebenszeit von Erythrozyten im Blut in der Regel länger ist, als die Auswirkungen einer Parvovirose andauern. Die Ursache der Anämie besteht daher bei den meisten Patienten aus einer Kombination aus Verlusten von Erythrozyten durch intestinale Blutungen aufgrund der Kryptenzerstörung und aus Verdünnung des Blutes durch massive Rehydratation der bei Einlieferung meist stark dehydrierten Patienten (HOSKINS, 1997; GODDARD und LEISEWITZ, 2010).

1.1.2.2.5. Hypoproteinämie

Die Virusreplikation in den Kryptenzellen führt zur extensiven Epithelnekrose mit Schwellung und Atrophie der Darmvilli. Es kommt zum Kollaps und vollständigen Strukturverlust der Kriptenstruktur (MACARTNEY et al., 1984). Hypoproteinämie entsteht als Folge einer Protein-Verlust-Enteropathie aufgrund der Zerstörung der Darmkrypten und den damit einhergehenden Verlust der Fähigkeit zur Absorption. Die Hunde verlieren hierbei nicht nur Albumin, sondern auch Globuline. In den meisten Fällen kommt es daher zu einer Panhypoproteinämie (MACARTNEY et al., 1984; KEMPF et al., 2010). Zusätzlich wird der Proteinverlust durch Blutungen in den Darm aufgrund der Darmwandzellschädigung verstärkt (VAN DEN BROEK, 1990).

1.2. Diagnostische Verfahren

Es gibt zwei Möglichkeiten, eine Infektionskrankheit zu diagnostizieren. Die Diagnose kann einerseits über einen direkten Erregernachweis erfolgen, andererseits ist durch Bestimmung von Antikörpern auch ein indirekter Erregernachweis möglich (LAPPIN, 2010).

1.2.1. Direkter Erregernachweis

Der Nachweis des gesamten Erregers oder von Bestandteilen des Erregers wird direkter Erregernachweis genannt (LAPPIN, 2010). Beim direkten Erregernachweis ist immer nur ein positives Testergebnis beweisend, während ein negatives Testergebnis eine Infektion nicht ausschließt (LAPPIN, 2010). Der direkte Nachweis von CPV kann über viele verschiedene Verfahren erfolgen (DESARIO et al., 2005; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). Praxistaugliche Schnelltests finden weltweit Anwendung (MARULAPPA und KAPIL, 2009; SCHMITZ et al., 2009; DECARO et al., 2010). Testverfahren, die in kommerziellen Labors durchgeführt werden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), sind jedoch hinsichtlich der Sensitivität überlegen (SCHUNCK et al., 1995; DESARIO et al., 2005; SCHMITZ et al., 2009).

1.2.1.1. Virusisolierung

Bei der Virusisolierung (VI) handelt es sich um die älteste Methode, Virus aus einer Untersuchungsprobe nachzuweisen (BÜTTNER, 2002). Die VI ist ein zeitintensives, komplexes Verfahren (MOCHIZUKI et al., 1993; DESARIO et al., 2005). Sie besteht aus zwei Arbeitsschritten. Nach Anzucht des Virus in Zellkulturen muss anschließend eine Identifizierung des Virus erfolgen. Zuerst wird die zu untersuchende Kotprobe mit Kochsalz vermengt, filtriert, zentrifugiert und mit Antibiotika zur Hemmung einer bakteriellen Überwucherung behandelt. Danach wird der aus der Suspension gewonnene Überstand in einer Zellkultur angesetzt. Die Inkubationszeit hierfür beträgt einige Tage. Der Virusnachweis erfolgt dann über die Darstellung von intranukleären Einschlusskörperchen (MOCHIZUKI et al., 1993; DESARIO et al., 2005). In diesem Schritt wird jedoch lediglich das Vorhandensein von Virus nachgewiesen. Zur Identifizierung von CPV ist nachfolgend dann eine weitere, CPV-spezifische Untersuchung, beispielsweise mittels Haemagglutinationstest (HA) notwendig (DESARIO et al., 2005). Die Nachteile der VI bestehen darin, dass sie nur in Speziallabors durchgeführt werden kann und extrem arbeits- und zeitaufwendig ist. Der größte Nachteil gegenüber anderen Untersuchungstechniken liegt jedoch darin, dass sie im Vergleich zu anderen Methoden, wie der PCR, eine nur geringe Sensitivität aufweist (DESARIO et al., 2005; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). In einer Studie lag die Sensitivität der VI im Vergleich zur real-time PCR bei 74 % (DESARIO et al., 2005). Positive Ergebnisse der VI sind nur in den ersten Tagen nach Infektion zu erwarten (DESARIO et al., 2005; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). Die Spezifität der VI ist ähnlich der Spezifität der Elektronenmikroskopie (EM) angegeben (DRANE et al., 1994).

1.2.1.2. Haemagglutinationstest

Eine besondere Eigenschaft von CPV ist seine Haemagglutinationsaktivität, auf der die HA basiert. Das bedeutet, dass CPV die Fähigkeit besitzt, Erythrozyten von einigen Säugetieren, wie Schweinen, Hunden oder Schafen, zu agglutinieren (SENDA et al., 1988). Diese Eigenschaft kann zum Nachweis von CPV, wie auch zur Charakterisierung von CPV-Stämmen genutzt werden (PARRISH et al., 1985; SENDA et al., 1988). CPV wird aus der Kotprobe isoliert und in Crandell feline kidney cells kultiviert. Die Virussuspension wird anschließend mit einer

Pufferlösung, Schweineerythrozyten und virus-adjusting diluent angesetzt, inkubiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen untersucht. Der HA-Titer entspricht dem reziproken Wert der höchsten Verdünnungsstufe mit vollständiger Haemagglutination, das heißt, dem Kehrwert der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch eine Haemagglutination nachgewiesen werden kann (TERAMOTO et al., 1984; SENDA et al., 1986; BÜTTNER, 2002). Der HA war in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts der am häufigsten verwendete Test zum Nachweis von CPV aus Kot (CARMICHAEL et al., 1980; MATHYS et al., 1983; TERAMOTO et al., 1984).

Der größte Nachteil des HA besteht in der nur geringen Sensitivität von 69 % im Vergleich zur real-time PCR (DESARIO et al., 2005). Die geringe Sensitivität ist vermutlich durch Interferenz mit anti-CPV Antikörpern aus dem Kot zu erklären (DESARIO et al., 2005). Ebenso problematisch ist die Tatsache, dass der HA oft nur innerhalb der ersten Tage nach Infektion ein positives Testergebnis anzeigt. Nach wenigen Tagen wird der HA oft falsch-negativ, obwohl in den Proben bei Nachuntersuchung mit PCR häufig noch große Mengen von CPV-DNA gefunden werden (DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). Ein weiterer Nachteil des HA besteht darin, dass dieser Test nur in Speziallabors durchgeführt werden kann. Außerdem ist die Herstellung von Schweineerythrozyten schwierig, da die Haltung der Schweine aufwendig ist. Stress oder Krankheiten der Spenderschweine können den HA verfälschen (DESARIO et al., 2005; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass manchen CPV-Stämmen die Eigenschaft der Haemagglutinationsaktivität fehlt. Dies führt ebenfalls zu falsch-negativen Testergebnissen (DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

Auch die Spezifität des HA ist relativ gering und wird in einer Studie von DRANE und Mitarbeitern (1994) gegenüber der EM mit 63 % angegeben. Verschiedene Faktoren können die Spezifität des HA beeinträchtigen (CARMICHAEL et al., 1980; MATHYS et al., 1983; TERAMOTO et al., 1984), so können beispielsweise andere Mikroorganismen aus der untersuchten Probe ebenfalls haemagglutinierende Eigenschaften aufweisen und mit dem HA interferieren (DRANE et al., 1994)

1.2.1.3. Elektronenmikroskopie

Bei der EM werden Kotproben in Kochsalzlösung homogenisiert und nachfolgend zentrifugiert. Der Überstand wird gefärbt, ausgestrichen und anschließend unter dem Elektronenmikroskop untersucht (TERAMOTO et al., 1984; DRANE et al., 1994). Die EM galt lange als Standardmethode zum Nachweis von CPV (KUFFER et al., 1995; SCHUNCK et al., 1995), obwohl STUDDERT und Mitarbeiter (1983) der EM bereits frühzeitig eine geringere Sensitivität gegenüber dem HA bescheinigten (STUDDERT et al., 1983). Die geringe Sensitivität wird vermutlich dadurch verursacht, dass zum Virusnachweis mittels EM sehr hohe Viruskonzentrationen in der zu untersuchenden Probe notwendig sind (ESFANDIARI und KLINGEBORN, 2000; SCHMITZ et al., 2009). Die konventionelle PCR gilt als zeh- bis hundertmal sensitiver als die EM (SCHUNCK et al., 1995).

Durch Immunelektronmikroskopie kann die Identifikation von CPV erleichtert und die Sensitivität des Testverfahrens verbessert werden. Hierbei werden die Kotproben mit einem Antiserum, also anti-CPV-Antikörpern, inkubiert. Durch die Zugabe des passenden Antiserums werden die Viruspartikel zu Gruppen aggregiert. Nach Inkubation werden die Proben dann elektronenmikroskopisch untersucht. Besonders bei kleinen Viren, wie CPV, wird das Erkennen der Viruspartikel somit durch Bildung von Virus-Antikörper-Aggregaten erleichtert und die Sensitivität des Testverfahrens erhöht (HAMMOND und TIMONEY, 1983; BÜTTNER, 2002; SCHMITZ et al., 2009). Durch den Einsatz von Goldpartikel-markierten Antikörpern zur Darstellung von Viren kann die Spezifität der EM ebenfalls deutlich erhöht werden (BÜTTNER, 2002).

1.2.1.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Beim enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (TERAMOTO et al., 1984; RIMMELZWAAN et al., 1991). Hierbei werden gereinigte monoklonale anti-CPV-Antikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden, die das dazugegebene CPV aus der Probe binden. Ein zweiter, Enzym-gebundener anti-CPV-Antikörper dient als Signalantikörper. Das Enzym bewirkt eine enzymatische Reaktion, die zu einem Farbumschlag des Substrats in der Mikrotiterplatte und somit zur

Identifikation von CPV führt (TERAMOTO et al., 1984; RIMMELZWAAN et al., 1991).

Im Vergleich zur EM wurde die Sensitivität in früheren Studien mit 90 % (KUFFER et al., 1995), im Vergleich zur PCR mit 88 % angegeben (KUMAR et al., 2010). Die Spezifität wird durchweg als sehr gut und meist mit 100 % angegeben (RIMMELZWAAN et al., 1990; KUFFER et al., 1995; KUMAR et al., 2010). Die Korrelation zwischen ELISA und HA liegt bei 94 % (TERAMOTO et al., 1984); die Angaben der Korrelation zwischen ELISA und EM schwanken und liegen bei 61 % (TERAMOTO et al., 1984) und 92 % (KUFFER et al., 1995).

Ein wichtiger Vorteil des ELISA besteht darin, dass diese Methode nicht nur in kommerziellen Labors durchgeführt werden kann, sondern im Rahmen von ELISA-basierten Schnelltests auch für eine schnelle Durchführung in der Praxis zur Verfügung steht (DRANE et al., 1994; SCHMITZ et al., 2009; DECARO et al., 2010). Einer der am weitesten verbreiteten und meist genutzten Schnelltests ist der SNAP[®] Parvo Test der Idexx laboratories GmbH (SCHMITZ et al., 2009; DECARO et al., 2010; MARKOVICH et al., 2012). Dieser Schnelltest erkennt sowohl alle CPV-Stämme, inklusive CPV 2c (DECARO et al., 2010), als auch das feline Parvovirus (NEUERER et al., 2008). Während ihm eine exzellente Spezifität bescheinigt wird (SCHMITZ et al., 2009; MARKOVICH et al., 2012), schwanken die Angaben bezüglich seiner Sensitivität gravierend zwischen 18 % (SCHMITZ et al., 2009) und 82 % (MARKOVICH et al., 2012).

Über einen anderen Schnelltest, den CPV ELISA detection kit (CSL Limited, Melbourne, Australien) wird nur sehr wenig berichtet. Sensitivität und Spezifität werden in einer Vergleichsstudie mit dem HA mit 87 % und 100 % angegeben (DRANE et al., 1994). Als weitere ELISA-basierende Schnelltests sind der Canine Parvo Virus Antigen ELISA kit von creative diagnostics, Großbritannien, und der Abaxis VetScan Canine Parvovirus Rapid Test von Abaxis Veterinary Reference Laboratories, USA, zu erwähnen. Bei letzterem gibt der Hersteller selbst eine Sensitivität und Spezifität von je 97 % an. Über die Sensitivität und Spezifität des Canine Parvo Virus Antigen ELISA kit von creative diagnostics sind Daten zur Sensitivität und Spezifität bekannt.

1.2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der PCR werden mithilfe eines Enzyms, der DNA-Polymerase, bestimmte DNA-Sequenzen exponentiell vervielfältigt. Die zu untersuchende DNA-Probe wird verdünnt und gepuffert; Primer und Substrate zum Aufbau der neuen DNA-Stränge werden hinzugefügt. Nach Inkubation wird die DNA-Polymerase zur Probe zugefügt. Hierdurch wird die DNA dann über mehrere Zyklen amplifiziert. Schlussendlich erfolgt das Auftragen der DNA auf eine Gelelektrophoreseplatte. Durch Anfärben können die amplifizierten DNA-Stränge sichtbar gemacht werden (MOCHIZUKI et al., 1993; SCHUNCK et al., 1995).

Seit den 90er Jahren wird die PCR zur Identifikation von CPV eingesetzt (MOCHIZUKI et al., 1993; SCHUNCK et al., 1995). Speziell bei der Extraktion von CPV-DNA aus Kotproben gab es in den ersten Jahren Probleme (SCHUNCK et al., 1995), jedoch wurde die PCR-Technik über die folgenden Jahre kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert. Sie wird heute routinemäßig eingesetzt (DECARO et al., 2005b; DECARO et al., 2006c; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012; STRECK et al., 2013). Die PCR hat im Vergleich zu allen anderen diagnostischen Nachweisverfahren von CPV aus Kot die höchste Sensitivität und gilt als hochspezifisch (SCHUNCK et al., 1995; DESARIO et al., 2005; SCHMITZ et al., 2009; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

Bei der real-time-PCR handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR. Sie ermöglicht nicht nur eine schnellere DNA-Amplifikation als die konventionelle PCR-Methode, sondern auch die Quantifizierung von CPV-DNA. Die real-time-PCR ist zudem hoch spezifisch und deutlich sensitiver als konventionelle PCR. Das Risiko falsch-positiver Testergebnisse durch Kontamination ist geringer als bei der konventionellen PCR (DECARO et al., 2005b; DESARIO et al., 2005; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). Auf SYBR Green basierende real-time-PCR bietet eine Alternative zur TaqMan-real-time-PCR; beide weisen eine ähnliche Sensitivität auf (KUMAR und NANDI, 2010; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

Die Charakterisierung von Virusstämmen war früher nur mithilfe monoklonaler Antikörper möglich. Mittlerweile ist eine Differenzierung durch den Einsatz bestimmter Primer auch im Rahmen der PCR möglich (DESARIO et al., 2005; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). Die Unterscheidung zwischen Impf- und Feldstamm kann mittels minor groove binder (MGB)-Technik im Rahmen der

PCR erfolgen. Bei der MGB-Technik werden verschiedene, CPV-Typ-spezifische PCR-Sonden genutzt. Diese sind mit verschiedenen Fluorophoren, fluoreszierenden chemischen Komponenten, markiert und binden dann an die einzelnen spezifischen CPV-Stämme. Hierdurch können diese voneinander und vom Impfstamm unterschieden werden (DECARO et al., 2006b). Die MGB-Technik gilt als leicht reproduzierbar, sensitiv und spezifisch; sie kann sowohl die herkömmlichen, auf CPV 2-basierenden, als auch die neueren, auf CPV 2b-basierenden Impfstoffe von Feldstämmen unterscheiden (DECARO et al., 2006a; DECARO et al., 2006c). Die Differenzierung zwischen Feld- und Impfstamm ist besonders bei kürzlich geimpften Welpen mit Symptomen einer Parvovirose hilfreich (DECARO et al., 2006a; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

1.2.2. Indirekter Erregernachweis

Beim indirekten Erregernachweis werden Antikörper gegenüber einem Infektionserreger nachgewiesen (LAPPIN, 2010). Anti-CPV-Antikörper können bereits wenige Tage nach Infektion nachweisbar sein (CARMAN und POVEY, 1985). Ihre Bestimmung ist über verschiedene Methoden, wie Immunfluoreszenz, ELISA und Haemagglutinations-Hemmtest (Haemagglutination-Inhibition, HI), möglich (CARMICHAEL et al., 1983; LUFF et al., 1987; RIMMELZWAAN et al., 1990; TIZARD und NI, 1998; TWARK und DODDS, 2000; LITSTER et al., 2012b). Während die Sensitivität von Immunfluoreszenz und ELISA etwa gleich zu sein scheint, wird dem ELISA eine deutlich höhere Spezifität beschieden (GRAY et al., 2012). Mittlerweile stehen zur Untersuchung auf anti-CPV-Antikörper auch Schnelltests zur Verfügung (WANER et al., 2003; LITSTER et al., 2012b).

Die Bestimmung von Antikörpern eignet sich nicht für die Diagnose einer Parvovirose (SCHMITZ et al., 2009; GREENE und DECARO, 2012), da Hunde Antikörper nach natürlicher Exposition (CARMAN und POVEY, 1985), durch Aufnahme aus der Muttermilch (POLLOCK und CARMICHAEL, 1982) und nach Impfung (CARMICHAEL et al., 1983; TRUYEN, 2006) aufweisen. Der Nachweis von anti-CPV-Antikörpern ist nur dann sinnvoll, wenn anti-CPV-Antikörper in einer Kontrolluntersuchung von ungeimpften Welpen, die vorher einen negativen anti-CPV-Antikörper-Titer hatten, nachweisbar sind. Dafür ist ein

Zeitabstand von 10 bis 14 Tagen zwischen beiden Serumvergleichsproben notwendig (GREENE und DECARO, 2012). Aufgrund der Diskrepanz zwischen relativ kurzem Krankheitsverlauf und relativ langer Zeitspanne bis zur Antikörperbildung ist ein Antikörpernachweis zur Diagnose der Parvovirose daher nicht geeignet (SCHMITZ et al., 2009).

Sinnvoll dagegen ist die Bestimmung von anti-CPV-Antikörpern zur Einschätzung des individuellen Schutzes eines Tieres gegenüber CPV (GRAY et al., 2012; LITSTER et al., 2012a; LITSTER et al., 2012b). Außerdem kann durch Bestimmung von MDA der ideale Impfzeitpunkt bestimmt und ein optimales Impfkonzepkt für den einzelnen Welpen ermittelt werden (WANER et al., 1996; OH et al., 2006). Beim erwachsenen Tier stellt die Bestimmung von anti-CPV-Antikörpern eine Alternative zu regelmäßigen Booster-Impfungen dar (GRAY et al., 2012).

2. Paramunisierung

Unter Paramunisierung versteht man die durch Paramunitätsinducer induzierten Reaktionen, die das unspezifische Immunsystem stärken, funktionelle Defizite und Dysregulationen ausgleichen, Abwehrschwächen beseitigen und einem Individuum einen schnellen, unspezifischen Schutz gegenüber einer Vielzahl ganz unterschiedlicher Noxen und Erreger vermitteln. Die Paramunisierung als Stimulation des unspezifischen Immunsystems steht damit der Immunisierung, der Stimulation des spezifischen Immunsystems, gegenüber (MAYR und BUTTNER, 1984). Paramunität imitiert die natürlichen Reaktionen des unspezifischen Immunsystems. Die für die Paramunisierung verwendeten Paramunitätsinducer sind mit Vakzinen vergleichbare Produkte, die zwar paraspezifische Effekte erzielen, jedoch nicht immunisierend im Sinne einer Antigen-spezifischen Immunität wirken und in ihrer Anwendung eine hohe Sicherheit aufweisen (MAYR und MAYR, 1999).

2.1. Definition der Paramunität

Paramunität bezeichnet den erworbenen Zustand eines Erreger- und Antigen-unspezifischen Schutzes eines Individuums gegenüber einer Vielzahl unterschiedlichster Infektionserreger und Antigene. Sie erfolgt durch Paramunisierung, die alle Maßnahmen zur Erzeugung einer iatrogenen Paramunität umfasst (MAYR, 1982) und auf der endogenen Mobilisierung, Regulierung und Reparatur körpereigener Abwehrmechanismen beruht. Durch Interaktion mit dem Hormon-, Gefäß- und Nervensystem bewirkt sie die Behebung von Dysfunktionen und die Reparatur von Schädigungen des Organismus (MAYR, 2001).

Das Immunsystem wird untergliedert in das Antigen-spezifische und das Antigen-unspezifische Immunsystem. Beide sind eng miteinander vernetzt. Während ersteres für den Aufbau der Antigen-spezifischen Immunität verantwortlich ist (MAYR, 1982), ist das unspezifische, angeborene Immunsystem für den Aufbau der Paramunität verantwortlich (MAYR und MAYR, 1999). Das unspezifische Immunsystem ermöglicht dem Körper durch Bindung, Inaktivierung, Abbau und durch das Verhindern einer Ausbreitung von Pathogenen im Körper die unmittelbare Abwehr gegen verschiedenste Noxen, bis Mechanismen der spezifischen Immunabwehr, wie Antikörper, zur Verfügung stehen (MAYR und MAYR, 1999). Paramunität kann sowohl systemisch als auch lokal über die Schleimhäute von Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt erreicht werden (MAYR, 1982). Der erworbene Zustand der Paramunität ist zeitlich begrenzt und nur von kurzer Dauer. In dieser Zeit ist das unspezifische Immunsystem jedoch sehr gut reguliert und funktioniert optimal. Während des Zustands der Paramunität soll eine erhöhte Tätigkeit von Phagozyten und natürlichen Killerzellen sowie die Freisetzung bestimmter Zytokine erfolgen (MAYR und MAYR, 1999).

2.2. Paramunitätsinducer

Paramunitätsinducer sind dazu bestimmt, bei Mensch und Tier körpereigene Abwehr- und Schutzstoffe sowie Abwehrmechanismen im Sinne einer Paramunisierung zu erzeugen (MAYR, 1982). Paramunitätsinducer müssen einen genau bestimmbaren, aktiven Wirkstoff enthalten und dürfen nicht Antigen-

spezifisch immunisierend wirken. Sie müssen Pyrogen-frei sein und dürfen weder toxisch, noch teratogen sein. Paramunitätsinducer dürfen ihre Wirkung nur durch Mobilisierung von körpereigenen Biosystemen entfalten und dürfen unter *in vitro*-Bedingungen ohne das Vorhandensein von Zellen keine Wirkung entfalten. Sie müssen standardisierbar sein und dürfen keine Rückstände hinterlassen. Sie können mit anderen Arzneimitteln oder Vakzinen kombiniert werden (MAYR und MAYR, 1999).

Aus Pockenviren gefertigte Paramunitätsinducer enthalten nicht-immunisierende, antigene Bestandteile attenuierter und inaktivierter Pockenvirenstämme, die sowohl zur Prophylaxe als auch therapeutisch eingesetzt werden können (MAYR und MAYR, 1999). Auf Pockenviren basierende Paramunitätsinducer werden seit vielen Jahren bei verschiedenen Spezies und für verschiedene Indikationen eingesetzt. Ihre prophylaktische Indikation umfasst unter anderem den Einsatz zum Schutz von Neugeborenen, den Einsatz bei bevorstehenden Stresssituationen, Transporten oder vor einem Klinikaufenthalt, Schutz bei erhöhtem Infektionsdruck und zur Vorbeuge von Impfkomplicationen. Von therapeutischem Nutzen sind Paramunitätsinducer zur Unterstützung einer Immunschwäche, als Begleittherapie zur Behandlung von Infektionskrankheiten (MAYR und MAYR, 1999), Faktorenkrankheiten und Mischinfektionen (MAYR und BUTTNER, 1984) oder Tumorkrankheiten. Sie werden zur Unterstützung der Rekonvaleszenz und bei sekundären Immunkrankheiten eingesetzt ((MAYR und BUTTNER, 1984; MAYR und MAYR, 1999)

2.2.1. PIND-ORF als Paramunitätsinducer

Seit ihrer Entwicklung in den 80er Jahren werden Paramunitätsinducer in der Tiermedizin eingesetzt. Die Herstellung des Paramunitätsinducers PIND-ORF erfolgt durch Reinigung und Inaktivierung (Gammastrahlung, Hitzeinaktivierung im Wasserbad und chemische Inaktivierung durch Propiolakton) des Impfstamms ORF-D 1701, Genus Parapoxvirus (Mayer 1989).

Parapoxvirus ovis verursacht Orf (Ecthyma Contagiosum oder ansteckende Dermatitis pustularis) und tritt hauptsächlich bei kleinen Wiederkäuern auf. Bei ihnen führt es zur Bildung von Bläschen und Pusteln, hauptsächlich an Lippen und Maulregion, aber auch an Gliedmaßen und Genitalregion. Nachfolgend

kommt es bei den Hautläsionen zur Ulzeration, Nekrose und Verschorfung (BEARE, 1956). Die Infektion mit Parapoxvirus ovis führt in der Haut kleiner Wiederkäuer zwar zu einer heftigen Entzündung und Immunantwort unter Beteiligung von T-Helferzellen, Zytokinen und Antikörperbildung (HAIG und MERCER, 1998), eine bestehende Infektion verhindert aber nicht die Wiederansteckung (MCKEEVER et al., 1988). Betroffen sind vor allem Schafe und Ziegen, seltener erkranken auch Gämsen (KITCHEN et al., 2014) und Rentiere (TRYLAND et al., 2013).

Bei der Infektion mit Parapoxvirus ovis handelt es sich um eine Zoonose. Menschen stecken sich durch Kontakt mit infizierten Schafen und Ziegen an (TURAN et al., 2013; KITCHEN et al., 2014). Symptome sind hauptsächlich an Händen und Unterarmen zu sehen. Kommt Parapoxvirus ovis mit verletzter Haut in Kontakt, bilden sich nach einer Inkubationszeit von etwa einer Woche solitäre Hautläsionen. Die Hautläsionen sind in der Regel wenige Zentimeter groß und schmerzhaft; meist werden knotige, teilweise auch ulzerierende Läsionen beschrieben. Nur selten werden beim Menschen auch multiple Läsionen berichtet (TURAN et al., 2013). Normalerweise tritt Orf beim Menschen nach Kontakt zu infizierten kleinen Wiederkäuern auf (SARMA et al., 2010; TURAN et al., 2013; KITCHEN et al., 2014), jedoch scheint auch die Übertragung durch Katzen möglich. In einem Fallbericht wurde von einer Übertragung von Orf durch den Kratzer einer klinisch gesunden Katze auf den Menschen berichtet. Die Rolle der Katze als Überträger von Orf ist aber noch weitgehend ungeklärt (FRANDSEN et al., 2011). Kaninchen und Mäuse bilden dem Menschen ähnliche Symptome wie Erythema-Bildung, Papeln und Pusteln aus (CARGNELUTTI et al., 2011). Orf ist selbstlimitierend, eine Behandlung des Menschen ist nicht erforderlich (SARMA et al., 2010; TURAN et al., 2013; KITCHEN et al., 2014).

Parapoxpräparate wie PIND-ORF sind seit über 20 Jahren für die Tiermedizin in vielen Ländern zugelassen, sie enthalten gereinigtes, inaktiviertes und attenuiertes Virus und dazugehörige Stabilisatoren. PIND-ORF, so der Laborname von inaktiviertem Parapoxvirus ovis, wurde erstmals als Baypamun[®] von der Firma Bayer vertrieben (MAYR und MAYR, 1999; MAYR, 2001). Später wurde die Zulassung dann von Zoetis (ehemals Pfizer Animal Health, Pfizer GmbH) erworben; Baypamun[®] wurde zu Zylexis[®]. Zylexis[®] enthält neben inaktiviertem Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701, Polygeline (Stabilisator) und

Wasser.

2.2.2. Einsatz von PIND-ORF beim Hund

Zum derzeitigen Zeitpunkt liegen keine klinischen Studien über einen *in-vivo*-Einsatz von PIND-ORF beim Hund vor. Allerdings werden „klinische Erfahrungen mit Pockeninducern in der Tiermedizin“ angeführt. Beim Hund wurde PIND-ORF demnach bei Krankheiten, wie „Welpensterben“, Herpesinfektionen des Hundes, Zwingerhusten und Mammatumoren eingesetzt (MAYR, 2001).

In *in-vitro*-Studien über PIND-ORF konnte in caninen Leukozyten erstmals die Induktion früher Mechanismen der angeborenen Abwehr (Phagozytose, oxidativer burst) und die Proliferation von CD4⁺- und CD4⁺CD8⁺-Zellen durch Stimulation mit PIND-ORF nachgewiesen werden (SCHUTZE et al., 2009; SCHUTZE et al., 2010). PIND-ORF konnte nicht nur eine Aufregulation von II-Molekülen des Major-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) auf caninen CD14⁺-Monozyten bewirken, sondern induzierte auch die Proliferation von CD4⁺CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen (SCHUTZE et al., 2009). In den Körper eingedrungene, phagozytierte und prozessierte Pathogene werden in Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen. Dort werden sie zu Peptiden abgebaut und binden an Oberflächenmoleküle, an die sogenannten MHC-Moleküle. Bei Bindung zwischen Pathogenen und MHC-Molekülen wird die Zahl der MHC-Moleküle aufreguliert. Naive T-Zellen erkennen diese MHC-Moleküle mit ihren Rezeptoren, werden aktiviert und proliferieren (DROZINA et al., 2005).

Mittels Durchflusszytometrie wurde eine PIND-ORF vermittelte, Dosis-abhängige Erhöhung der Phagozytoserate in caninen Monozyten und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Heparinisiertes Blut gesunder Hunde wurde mit PIND-ORF, Placebo (Polygeline) und einer Pufferlösung versetzt und mit Cytochalasin D inkubiert. Cytochalasin D ist ein spezifischer Phagozytose-Hemmer. Nachdem die Proben zur Phagozytoseanregung mit *Listeria monocytogenes* versetzt wurden, wurden die Zellen lysiert und mit Durchflusszytometrie untersucht. Nach Stimulation mit PIND-ORF zeigten Monozyten und neutrophile Granulozyten einen Anstieg in der Phagozytoserate. Verdünnungsreihen demonstrierten eine Dosis-abhängige Wirkung von PIND-

ORF (SCHUTZE et al., 2009).

PIND-ORF zeigte *in-vitro* außerdem eine Induktion des oxidativen bursts in caninen Monozyten, nicht aber in anderen polymorphkernigen Zellen. Der PIND-ORF-vermittelte oxidative burst war stärker ausgeprägt als der oxidative burst in nicht PIND-ORF-stimulierten Zellen (SCHUTZE et al., 2009). Als oxidativer burst wird die Produktion von bakteriziden reaktiven Sauerstoffradikalen durch Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten bezeichnet (ROBERTS und CAMACHO, 1967).

Im Serum von Hunden, die mehrfach mit PIND-ORF behandelt worden waren, wurde eine vorübergehende Produktion nicht-neutralisierender anti-PIND-ORF-Antikörper nachgewiesen. Diese Antikörper vermittelten *in-vitro* einen deutlichen Anstieg des oxidativen bursts in caninen Monozyten und polymorphkernigen Zellen. Die Rate des oxidativen bursts korrelierte demnach nicht nur mit dem anti-PIND-ORF-Antikörpertiter, PIND-ORF war auch in der Lage, zumindest vorübergehend die Produktion von Antikörpern zu stimulieren (SCHUTZE et al., 2010).

III. EFFICACY OF THE PARAMUNITY INDUCER PIND-ORF IN THE TREATMENT OF CANINE PARVOVIROSIS

Anna-Lena Proksch¹

Stefan Unterer¹, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA

Uwe Truyen², Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Katrin Hartmann¹, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian-Universitaet, Munich

² Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany

The Veterinary Journal; accepted August 13th, 2014



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Efficacy of the paramunity inducer PIND-ORF in the treatment of canine parvovirus infection

A.L. Proksch^{a,*}, S. Unterer^a, U. Truyen^b, K. Hartmann^a^a Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet, Germany Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany^b Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 13 August 2014

Keywords:

Canine parvovirus

Dog

Parapoxvirus ovis

Clinical trial

Innate immunity

ABSTRACT

Canine parvovirus (CPV) infection is a common and severe disease particularly affecting young dogs. The paramunity inducer PIND-ORF is reported to stimulate the innate immune system and, if used as a supplementary medication, might lead to a more rapid improvement in clinical signs in dogs with CPV infection. The aim of this study was to evaluate the efficacy of PIND-ORF in dogs with CPV infection in a prospective, placebo-controlled, double-blinded trial using 38 dogs randomly assigned to two groups. Inclusion criteria were clinical signs consistent with CPV infection and a positive faecal CPV PCR. Dogs received either PIND-ORF ($n = 20$) or placebo ($n = 18$) and additional symptomatic treatment. Time to recovery and mortality rate were compared between the two groups. Clinical signs, complete blood counts (CBC), and serum protein and albumin concentrations were evaluated daily during hospitalisation and on day 14. Viral shedding and antibody titres were measured by faecal CPV PCR and serum neutralisation assay.

There was no significant difference in time to recovery, clinical signs, blood parameters, duration of virus shedding, and antibody titres between the two groups. The only significant difference was an increase in lymphocyte counts and antibody titres observed in the PIND-ORF group only. Three dogs receiving placebo did not survive, but the mortality rate was not significantly different between groups ($P = 0.097$). No significant effect of PIND-ORF on recovery and outcome could be demonstrated.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Canine parvovirus is caused by canine parvovirus (CPV) strains 2a, 2b, and 2c. CPV can lead to asymptomatic infection, mild clinical signs, or severe and fatal disease (Meunier et al., 1985; Otto et al., 1997; Decaro et al., 2005a). At present, canine parvovirus still has a high mortality rate (Goddard and Leisewitz, 2010), especially in young puppies, and treatment is intensive and costly. Disease outcome depends predominantly on the dogs' immune system, and disease is most severe in dogs that have no specific immunity. Puppies are especially at high risk of developing the disease during the time when maternal antibodies wane and the development of specifically acquired immunity post-vaccination has not been completed (Pollock and Carmichael, 1982; Goddard and Leisewitz, 2010).

Innate immunity is the first line of defence against virus infections and is initiated by recognition of specific viral elements by pattern recognition receptors (PRR) initiating the innate immune response (Janeway and Medzhitov, 2002). The interaction between PRR and the virus activates signalling pathways that lead to the tran-

scription of genes encoding for antiviral cytokines contributing to the establishment of an antiviral state of both the infected and non-infected cells (Janeway and Medzhitov, 2002; Yokota et al., 2010; Raykov et al., 2013).

There are several studies evaluating the influence of CPV on the adaptive immune system (Chappuis, 1998; Toman et al., 2002; Schultz et al., 2010) but the innate immune response to parvovirus infections has received little attention (Paglino et al., 2014). In human peripheral blood mononuclear cells, activation of an antiviral response by production and release of interferon (IFN)- α and IFN- β in rodent parvovirus infection was demonstrated (Raykov et al., 2013), whereas porcine parvovirus did not induce type 1 interferons.

Little is known about the mechanisms by which parvoviruses can evade the innate immune system (Lin et al., 2013), but the initial antiviral immune response of the mammalian host plays an essential role in determining the outcome of viral infections (Robert-Tissot et al., 2011) and a functional innate immune system is critical to host defence (Alper et al., 2008). Therefore, stimulation of the innate immunity by paramunity inducers could be advantageous in dogs infected by CPV that lack specific immunity so reducing the risk of severe illness and accelerating recovery.

Paramunity can be defined as acquired non-pathogen-specific and non-antigen-specific protection of limited duration against a

* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 2650.

E-mail address: L.Proksch@medizinische-kleintierklinik.de (A.L. Proksch).

diversity of noxious influences, such as foreign substances, infectious pathogens, toxins, and malignant cells. Paramunity inducers are drugs that are non-immunizing biological products with a paraspecific effect on the innate immune system (Mayr and Mayr, 1999). Paramunity inducers can enhance the rate of phagocytosis by stimulating monocytes and macrophages, boosting the function of spontaneous cell-mediated cytotoxicity by natural killer (NK) cells, and improving the activity of other lymphoreticular cells. They also can enhance production, release, and interaction of many cytokines, such as IFN- α and IFN- γ , interleukin (IL)-2, tumour necrosis factor (TNF)- α , and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Fachinger et al., 2000).

Paramunity inducers derived from poxviruses (PIND-ORF) contain non-immunizing, intact antigenic structures of attenuated and inactivated strains of *Parapoxvirus ovis* (Mayr and Mayr, 1999). PIND-ORF (Zylexis, Zoetis) is licensed for use in dogs in Germany, the Czech Republic, and Slovakia. In some studies in other animal species, it has been reported to be effective when used metaphylactically or therapeutically (Mayr and Brunner, 1980; Mayr and Büttner, 1984; Strube et al., 1989; Mayr and Sibert, 1990; Mayr et al., 1991; Ziebell et al., 1997a, 1997b; Kyriakis et al., 1998; Castrucci et al., 2000; Ryan et al., 2010). However, several other controlled studies evaluating the therapeutic efficacy of PIND-ORF (e.g. in post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs or in feline leukaemia virus infection) could not demonstrate a beneficial effect (Klimentowski et al., 1992; Block et al., 1997; Kyriakis et al., 2002).

There is a need for drugs that effectively stimulate innate immunity to fight acute viral infections, such as parvovirus, especially in animals that lack acquired immunity like puppies. The aim of the present study was to evaluate the efficacy of PIND-ORF in dogs with CPV infection by investigating whether its use leads to quicker improvement in clinical signs and laboratory values, faster recovery, normalisation of laboratory values, decline in duration of faecal CPV shedding and an increase in antibody titres.

Materials and methods

Study design

The study was performed as a prospective, randomised, placebo-controlled, double-blinded trial. Originally, 40 dogs were prospectively included into the trial. Before the study start, to ensure randomisation, 40 pieces of paper were marked with either 'PIND-ORF' ($n = 20$) or 'placebo' ($n = 20$) and then thoroughly mixed. To ensure blinding, a pharmaceutical assistant not involved in the study drew one paper after another, distributed them to an envelope, mixed envelopes and then marked envelopes from 1 to 40. Neither the clinicians, nor the owner had access to this randomisation schedule that was kept in the hospital pharmacy. When a dog was included in the study, drugs were drawn up in the hospital pharmacy and injected by a veterinarian without knowledge of the medication to ensure that neither owners nor the clinician was aware of the group to which the dog had been assigned. Unblinding occurred after the study was completed and data entered into the computer software for statistical evaluation. In retrospect, two dogs that were allocated to the placebo group had to be excluded. Therefore, in total, 20 dogs receiving PIND-ORF and 18 dogs receiving placebo were included in the final evaluation.

Dogs

Thirty-eight dogs of a wide variety of ages, breeds, and gender presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig-Maximilians-Universität of Munich from May 2009 to September 2011 were included in the study (Table 1). Inclusion criteria were a diagnosis of CPV infection by a positive faecal polymerase chain reaction (PCR) and clinical signs consistent with CPV infection. An exclusion criterion was a history of treatment with either a paramunity inducer or IFNs during the 3 months preceding the trial. To avoid inclusion of dogs with vaccine-induced positive PCR results, animals were excluded if they had received modified live CPV vaccines 3 weeks prior to presentation. Dogs receiving pretreatment with supportive medication (other than paramunity inducers, IFNs, or any other drugs stimulating the immune system, as well as blood transfusions) were admitted to the study, independent of the duration and type of pretreatment. Dogs were hospitalised until recovery and were re-presented for a follow-up visit on day 14 after admission.

Table 1
Signalment of dogs of the PIND-ORF and placebo group.

| Parameter | PIND-ORF group | Placebo group | P |
|-----------------|--|---|-------|
| Gender | Male ($n = 12$) Female ($n = 8$) | Male ($n = 8$) Female ($n = 10$) | 0.516 |
| Breed | Mixed breed ($n = 13$) Purebred ($n = 7$) (different breeds) | Mixed breed ($n = 9$) Purebred ($n = 9$) (different breeds) | 0.512 |
| Age (weeks) | Median 8.5 (range, 5–29) | Median 9.0 (range, 8–32) | 0.203 |
| Bodyweight (kg) | Median 2.15 (range, 0.44–17.4) | Median 2.15 (range, 0.52–20.2) | 0.672 |

Table 2
Medications used in the study.

| Drug | Dosage | Day of treatment |
|--|-------------------------|------------------|
| Amoxicillin-clavulate ^{a,b,c} | 20 mg/kg IV every 12 h | 0–7 |
| Cefotaxime ^d | 50 mg/kg IV every 8 h | 0–7 |
| Ranitidine ^{e,f} | 1 mg/kg IV every 8 h | 0–7 |
| Maropitant ^g | 1 mg/kg SC every 8 h | 0–3 |
| Buprenorphine ^{h,i} | 0.01 mg/kg IV every 6 h | 0–3 |
| Dalteparin-sodium ^j | 75 U/kg SC every 8 h | 0–5 |
| | 38 U/kg SC every 8 h | 6 |
| | 19 U/kg SC every 8 h | 7 |
| Anti-canine parvovirus antibodies ^k | 0.4 mL/kg SC every 24 h | 0, 1, 2 |

^a Augmentan IV 2.2 g, GlaxoSmithKline.

^b AmoxiClav Hikma, Hikma Pharma.

^c AmoxiClav Hexal, Hexal.

^d Claforan, 0.5 g, 1 g, 2 g, Sanofi-Aventis.

^e Sostril Injektionslösung, GlaxoSmithKline.

^f Ranitic inject, Hexal.

^g Cerenia, Zoetis.

^h Temgesic Ampullen 0.3 mg, Reckitt Benckiser Pharmaceuticals.

ⁱ Buprenovet 0.3 mg/mL Injektionslösung für Hunde und Katzen, Bayer Vital.

^j Fragmin D, Pharmacia/Pfizer.

^k Stagloban, IDT Biologica.

Treatment

Dogs in the treatment ($n = 20$) group received 1 mL subcutaneously (SC) of PIND-ORF (Zylexis, Zoetis) containing inactivated *P. ovis* strain D 1701 (with a minimum of 230 IFN units) on days 0, 2, and 4. Dose, frequency, and route of admission were chosen according to the manufacturer's recommendations. Dogs in the placebo group ($n = 18$) received 1 mL of the solvent (polygeline and water for injection) SC on days 0, 2, and 4. In addition, all dogs were treated with a standardised symptomatic treatment protocol (Table 2).

Dogs with severe disease that did not respond to the standardised protocol were treated with additional medication to support intensive care and prevent fatality. The necessity for additional treatment and the types of medication used were defined by specific criteria (Table 3). There was no limitation to the number of additional drugs given to any one dog.

Recovery

Recovery was defined as return to a normal general condition, with normal appetite, no vomiting, normal body temperature (range, 38.0–39.0 °C \pm 0.2 °C), normal hydration status, and neutrophil counts within or above the reference range ($\geq 3.0 \times 10^9/L$). In addition, faecal consistency in recovered dogs had to be equivalent to a score ≤ 5 of the Purina Faecal Scoring System for Dogs.¹

Clinical parameters

In addition to time to recovery, seven clinical parameters were evaluated daily during hospitalisation and on day 14, including faecal consistency determined using the Purina System (parameter graded from 1 to 7), faecal composites (e.g., blood), frequency of defecation, vomiting, general condition, appetite, and dehydration. Based on the severity of clinical signs, each of the latter parameters was graded from 0 to 3 (Table 4).

¹ <http://www.columbusdogconnection.com/Documents/FaecalScoringSystem.pdf> (accessed 14.08.12).

Table 3
Additional medication in cases of severe illness.

| Drug | Dosage | Indication | Number of animals | <i>P</i> PIND-ORF vs. placebo |
|-------------------------------|---|---|-----------------------------|-------------------------------------|
| Metronidazole ^a | 10 mg/kg IV every 12 h | Fever >40.0 °C WBC <0.2 × 10 ⁹ /L | 2 (placebo) | 0.218 |
| Hetastarch ^b | 1 mL/kg IV CRI | BP <100 mmHg and/or albumin <20 g/L | 9 (PIND-ORF) 7 (placebo) | 0.752 |
| Metoclopramide ^{c,d} | 0.03 mg/kg IV CRI | BP <80 mmHg and/or albumin <17 g/L | 3 (PIND-ORF) 3 (placebo) | 1.000 |
| Ondansetron ^e | 0.15 mg/kg IV every 8 h | Vomiting >5/day (despite MCP) | 2 (placebo) | 0.218 |
| Whole blood transfusion | 10 mL/kg IV | HCT <20% and/or platelets <50 × 10 ⁹ /L | 3 (PIND-ORF) 4 (placebo) | 1.000 |
| Fresh frozen plasma | 15 mL/kg IV | Suspected DIC | 4 (PIND-ORF) 1 (placebo) | 0.344 |
| Total parenteral nutrition | 30 × (BW, kg) + 70 × 1.5, (>2.0 kg) or 70 × (BW, kg) ^{0.75} × 1.5, (<2.0 kg) | Anorexia >3 days and/or vomiting >5/day | 3 (PIND-ORF) 6 (placebo) | 0.260 |

BP, blood pressure; BW, bodyweight; CRI, continuous rate infusion; DIC, disseminated intravascular coagulopathy; HCT, haematocrit; MCP, metoclopramide; WBC, white blood cells.

^a Metronidazol, B. Braun Melsungen.

^b Venofundin 6% Infusionslösung, B. Braun Melsungen.

^c MCP, Ratiopharm.

^d Vomend, Eurovet Animal Health.

^e Ondansetron Hexal, Hexal.

Complete blood count (CBC) and serum chemistry

CBC (Cell-Dyn 3500 R, Abbott Diagnostics, and Sysmex XT-2000i, Sysmex Corporation), total protein, and albumin (Hitachi 717 Autoanalyzer, Boehringer) concentrations were evaluated daily during hospitalisation and re-evaluated on day 14. Blood of animals with a bodyweight < 1.5 kg was taken only on every second day. Values for WBC, haematocrit, albumin, and total protein were not included in the comparison of laboratory parameters in dogs that received whole blood transfusions on the days after transfusion (seven dogs).

Canine parvovirus PCR

On days 0, 3, 7, and 14, faecal samples were collected for CPV PCR, immediately frozen at -20 °C, and examined at the end of the study. CPV PCR was performed with primer CPV M1 and CPV M2 using a previously described protocol (Schunck et al., 1995).

Serum antibodies

On days 0, 3, 7, and 14, serum samples were collected for serum neutralisation assay, immediately frozen and stored at -20 °C, and examined at the end of the study. Serum samples from dogs that received either whole blood transfusions or fresh frozen plasma were excluded. In total, 113 serum samples were examined for antibody titres. All sera were heat-treated at 56 °C for 30 min and stored at -20 °C. The sera were diluted in 5-log steps, and 200 TCID₅₀ per 0.1 mL was mixed with an equal volume of diluted sera. After 2 h of incubation at 37 °C, 100 mL of the serum/virus mixtures was added onto CRFK cells seeded in 96-well microtitre plates. Plates were incubated for 5–6 days at 37 °C. After this period, the cells were fixed and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled monoclonal antibodies (Parrish et al., 1982) for the presence of virus antigen. The neutralising antibody titres were calculated using the formula of Kaerber (1931).

Statistical methods

Based on the number of included animals and the calculated standard deviation (SD) of recovery time, the study had a power of 80% to detect a difference of 3 days between both groups with $\alpha = 0.05$.

Comparison of time to recovery and duration of virus shedding was performed by comparing survival curves using a log-rank (Mantel–Cox) test (Prism 4.0, GraphPad). Differences in clinical signs and blood parameters between the treatment and placebo group were analysed by the Kruskal–Wallis test and Dunn's multiple comparison test (Prism 4.0, GraphPad). Comparison of gender, breed, age, bodyweight, viral shedding, and mortality rate was performed using Fisher's exact test (Prism 4.0, GraphPad). $P < 0.05$ was considered significant. When multiple comparisons of the same data were performed, a Bonferroni correction was applied by dividing the P -value by the number of comparisons.

Results

Comparison of dogs at admission and additional medication

On day 0, there was no significant difference between the dogs of the PIND-ORF and placebo groups for gender, breed, age, and bodyweight (Table 1), individual parameters of clinical signs (Table 5), or laboratory parameters (Table 6). The period of time during which dogs showed clinical signs before admission was not significantly different between the two groups (median 1 day, $P = 0.193$). There was no significant difference between groups when comparing the number of dogs receiving additional medication (Table 3).

Table 4
Scoring system for clinical parameters according to severity.

| Parameter | Grade 0 | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 |
|--------------------------|----------------|------------------|--------------------|--------------------|
| Faecal composites | None | Mucus | Blood admixed | Bloody |
| Frequency of defaecation | 1/day | 2–3/day | 4–5/day | >5/day |
| Vomiting | No vomiting | 1/day | 2–3/day | >3/day |
| General condition | Normal | Mildly depressed | Moderate depressed | Severely depressed |
| Appetite | Normal | Mildly decreased | Moderate decreased | Severely decreased |
| Dehydration | No dehydration | <5% | 5–10% | >10% |

Table 5

Clinical parameters evaluated in dogs receiving PIND-ORF and dogs receiving placebo, showing mean values, standard deviations, and *P* values of the changes over time within each group (day 3 vs. 0, day 7 vs. 0, and day 14 vs. 0) and comparing groups on days 0, 3, 7, and 14.

| Variable | Day | Mean ± SD | Mean ± SD | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> |
|--------------------------------------|-----|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| | | PIND-ORF | Placebo | | | |
| Purina Faecal Score (score 1–7) | 0 | 7.0 ± 0.7 | 6.0 ± 1.0 | NS | | |
| | 3 | 6.0 ± 0.9 | 5.0 ± 0.8 | NS | NS | NS |
| | 7 | 5.0 ± 1.1 | 5.0 ± 0.8 | NS | <0.001 | NS |
| | 14 | 4.0 ± 0.7 | 4.0 ± 0.3 | NS | <0.001 | <0.001 |
| Faecal composites (score 0–3) | 0 | 1.4 ± 1.1 | 1.6 ± 0.9 | NS | | |
| | 3 | 1.1 ± 0.8 | 0.9 ± 0.8 | NS | NS | NS |
| | 7 | 0.4 ± 0.6 | 0.4 ± 0.8 | NS | NS | <0.001 |
| | 14 | 0.1 ± 0.3 | 0.1 ± 0.3 | NS | <0.001 | <0.001 |
| Frequency of defaecation (score 0–3) | 0 | 1.7 ± 0.9 | 1.6 ± 0.9 | NS | | |
| | 3 | 1.2 ± 0.6 | 1.2 ± 0.9 | NS | NS | NS |
| | 7 | 1.2 ± 0.8 | 0.8 ± 0.5 | NS | NS | NS |
| | 14 | 1.2 ± 0.6 | 1.3 ± 0.6 | NS | NS | NS |
| Vomiting (score 0–3) | 0 | 1.5 ± 1.4 | 1.4 ± 1.3 | NS | | |
| | 3 | 0.2 ± 0.7 | 0.6 ± 1.1 | NS | NS | NS |
| | 7 | 0.2 ± 0.7 | 0.4 ± 0.9 | NS | <0.001 | <0.050 |
| | 14 | 0.0 ± 0.0 | 0.1 ± 0.3 | NS | <0.001 | <0.001 |
| General condition (score 0–3) | 0 | 2.3 ± 0.8 | 2.0 ± 0.8 | NS | | |
| | 3 | 1.5 ± 0.9 | 1.4 ± 1.0 | NS | NS | NS |
| | 7 | 0.4 ± 0.8 | 0.6 ± 0.9 | NS | <0.001 | <0.010 |
| | 14 | 0.1 ± 0.2 | 0.0 ± 0.0 | NS | <0.001 | <0.001 |
| Appetite (score 0–3) | 0 | 2.7 ± 0.7 | 2.2 ± 1.0 | NS | | |
| | 3 | 1.5 ± 1.2 | 1.5 ± 1.2 | NS | NS | NS |
| | 7 | 0.2 ± 0.7 | 0.6 ± 0.9 | NS | <0.001 | <0.010 |
| | 14 | 0.1 ± 0.2 | 0.1 ± 0.3 | NS | <0.001 | <0.001 |
| Dehydration (score 0–3) | 0 | 1.9 ± 0.4 | 1.4 ± 0.8 | NS | | |
| | 3 | 0.9 ± 0.8 | 0.7 ± 0.7 | NS | NS | NS |
| | 7 | 0.3 ± 0.6 | 0.2 ± 0.4 | NS | <0.001 | <0.001 |
| | 14 | 0.1 ± 0.2 | 0.0 ± 0.0 | NS | <0.001 | <0.001 |

NS, not significant; SD, standard deviation.

Recovery

There was no significant difference ($P = 0.704$) between the two groups when comparing time to recovery. Using the median value, dogs of both groups recovered in a period of 8.0 days (Fig. 1).

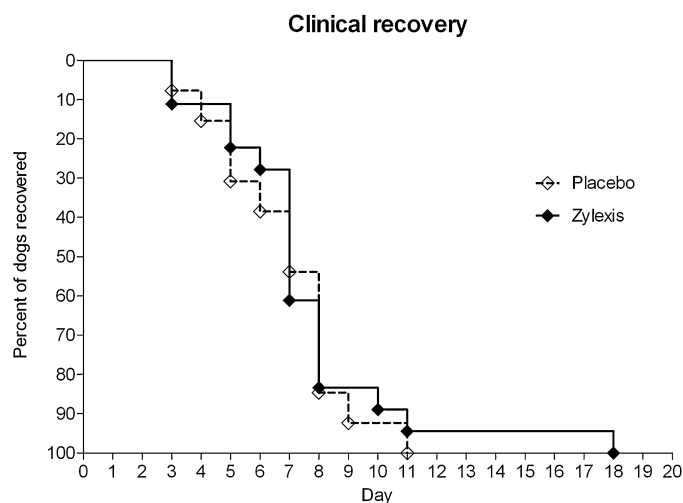


Fig. 1. Time to recovery in the PIND-ORF group ($n = 20$) and the placebo group ($n = 18$). Curves show the percentage of animals that recovered at different points of time. Three dogs that did not survive were excluded from the analysis. Recovery was achieved on (median) day 8 (PIND-ORF and placebo group). There was no significant difference in the times to recovery in both groups ($P = 0.704$).

Clinical and laboratory parameters

There was no significant difference in any clinical parameter between dogs of the PIND-ORF group and dogs of the placebo group on days 3, 7, or 14 (Table 5). However, most clinical parameters were significantly improved when comparing days 7–0 and days 14–0 in both groups (Table 5), while on day 3 improvement was not yet significant. There was also no significant difference in any laboratory parameter between the two groups on days 3, 7, and 14. However, in the PIND-ORF group (but not in the placebo group), there was a significant increase ($P < 0.010$) in lymphocyte count between days 0 and 7.

Mortality

Three female dogs, a Labrador retriever (9 week-old), a mixed breed dog (8 week-old), and a Chihuahua (11 week-old) were euthanased due to severity of disease during the 14-day observation period on days 5, 7 and 8, respectively. These three dogs were in the placebo group and had all received additional treatment: the Chihuahua received two additional antiemetic drugs and plasma transfusions; the two other dogs received a third antibiotic, hetastarch, two further antiemetics, total parenteral nutrition, and blood transfusions. The mortality rate between the PIND-ORF group and the placebo group, however, was not significantly different ($P = 0.097$).

CPV shedding

There was no significant difference in the number of dogs shedding CPV between the two groups at any time point where it was evaluated. On day 3, CPV shedding was detected in 15 dogs in the

Table 6
Laboratory parameters evaluated in dogs receiving PIND-ORF and dogs receiving placebo, showing mean values, standard deviations, and *P* values of the changes over time within each group (day 3 vs. 0, day 7 vs. 0, and day 14 vs. 0) and comparing groups on days 0, 3, 7, and 14.

| Variable | Day | Mean ± SD | Mean ± SD | <i>P</i> | <i>P</i> | <i>P</i> |
|---------------------------------|-----|----------------|----------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | | PIND-ORF | Placebo | PIND ORF vs. placebo | PIND-ORF day 0 vs. 3, 7, 14 | Placebo day 0 vs. 3, 7, 14 |
| WBC ($\times 10^9/L$) | 0 | 8.386 ± 6.013 | 10.022 ± 6.593 | NS | | |
| | 3 | 5.518 ± 4.964 | 10.181 ± 8.059 | NS | NS | NS |
| | 7 | 11.552 ± 5.189 | 13.026 ± 6.125 | NS | NS | NS |
| | 14 | 16.143 ± 6.220 | 12.233 ± 5.775 | NS | NS | NS |
| Neutrophils ($\times 10^9/L$) | 0 | 6.776 ± 4.740 | 8.071 ± 5.633 | NS | | |
| | 3 | 2.549 ± 2.947 | 7.737 ± 6.254 | NS | NS | NS |
| | 7 | 7.075 ± 3.761 | 8.078 ± 5.758 | NS | NS | NS |
| | 14 | 10.656 ± 5.214 | 7.917 ± 3.224 | NS | NS | NS |
| Lymphocytes ($\times 10^9/L$) | 0 | 1.579 ± 0.802 | 2.727 ± 2.775 | NS | | |
| | 3 | 1.828 ± 1.524 | 1.795 ± 1.285 | NS | NS | NS |
| | 7 | 3.755 ± 0.792 | 2.671 ± 1.102 | NS | <0.01 | NS |
| | 14 | 3.793 ± 2.003 | 2.250 ± 1.414 | NS | NS | NS |
| Platelets ($\times 10^9/L$) | 0 | 339.8 ± 162.6 | 442.8 ± 202.5 | NS | | |
| | 3 | 452.4 ± 199.9 | 453.9 ± 208.8 | NS | NS | NS |
| | 7 | 328.7 ± 122.7 | 532.6 ± 216.2 | NS | NS | NS |
| | 14 | 520.3 ± 205.9 | 558.1 ± 290.2 | NS | NS | NS |
| HCT (%) | 0 | 34.1 ± 7.5 | 35.9 ± 10.2 | NS | | |
| | 3 | 28.9 ± 6.7 | 29.1 ± 6.6 | NS | NS | NS |
| | 7 | 29.4 ± 6.7 | 31.8 ± 6.6 | NS | NS | NS |
| | 14 | 32.6 ± 5.3 | 34.6 ± 5.9 | NS | NS | NS |
| Total protein (g/L) | 0 | 46.50 ± 8.00 | 45.31 ± 10.62 | NS | | |
| | 3 | 40.81 ± 6.68 | 41.85 ± 10.11 | NS | NS | NS |
| | 7 | 47.08 ± 8.56 | 51.63 ± 7.28 | NS | NS | NS |
| | 14 | 51.15 ± 3.35 | 50.54 ± 5.54 | NS | NS | NS |
| Albumin (g/L) | 0 | 27.58 ± 4.70 | 25.61 ± 6.58 | NS | | |
| | 3 | 22.54 ± 5.09 | 23.18 ± 7.01 | NS | NS | NS |
| | 7 | 26.35 ± 6.82 | 31.37 ± 4.46 | NS | NS | NS |
| | 14 | 31.82 ± 3.99 | 32.41 ± 4.08 | NS | NS | NS |
| Globulins (g/L) | 0 | 18.94 ± 5.02 | 19.76 ± 4.74 | NS | | |
| | 3 | 18.27 ± 2.80 | 18.76 ± 3.51 | NS | NS | NS |
| | 7 | 20.74 ± 3.06 | 20.12 ± 3.50 | NS | NS | NS |
| | 14 | 20.32 ± 3.25 | 20.62 ± 8.05 | NS | NS | NS |

Canine parvovirus, CPV; HCT, haematocrit; NS, not significant; SD, standard deviation; WBC, white blood cells.

PIND-ORF and 12 dogs in the placebo group ($P = 0.724$); on day 7, CPV shedding was detectable in nine dogs in the PIND-ORF and eight dogs in the placebo group ($P = 1.000$); on day 14, faecal CPV shedding was detected in two dogs in the PIND-ORF and in three dogs in the placebo group ($P = 0.631$).

When comparing the number of dogs shedding virus at the different time points, a significant decrease in CPV shedding occurred between days 14 and day 0 in both groups (PIND-ORF $P < 0.0001$, placebo $P < 0.001$). In addition, the duration of CPV shedding in both groups was assessed (Fig. 2). As examination of CPV shedding was performed on distinct days rather than as a daily observation, CPV shedding was assumed to occur on the day before the PCR showed a negative result for the first time. Dogs of both groups shed virus until day 13 (median value). There was no significant difference between the two groups ($P = 0.797$).

Serum antibodies

There was no significant difference in antibody levels between the two groups on any day when they were measured. In the PIND-ORF group, there was a significant increase in antibody titres between days 7 and 0 ($P < 0.01$) and between days 14 and 0 ($P < 0.001$) in contrast to the placebo group (Tables 7 and 8).

Discussion

The aim of this prospective, placebo-controlled, double-blinded trial was to investigate the efficacy of the paramunity inducer PIND-ORF in the treatment of CPV infection as assessed by improvement in clinical signs, laboratory parameters, virus shedding, serum

antibody titres, and time to recovery. No statistically significant difference was found between the PIND-ORF group and the placebo group for clinical signs, laboratory values, virus shedding, serum antibody titres, time to recovery or mortality rate.

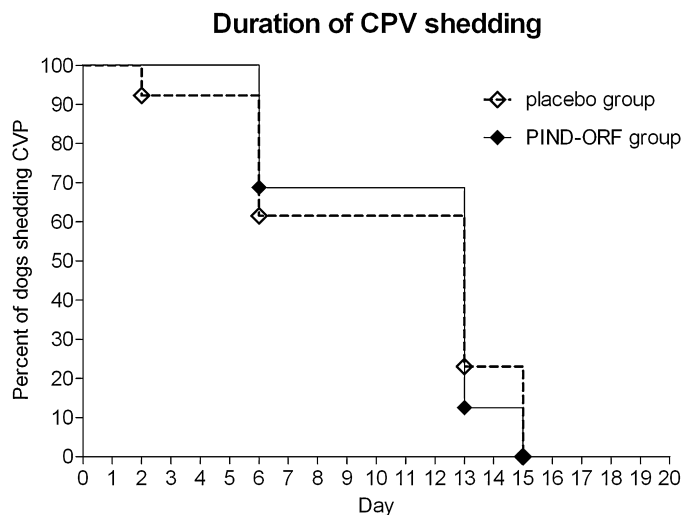


Fig. 2. Faecal virus shedding in dogs in the PIND-ORF ($n = 20$) and the placebo group ($n = 18$). Curves show the percentage of animals that shed virus on the investigated days 0, 3, 7, and 14. Dogs of both groups shed virus until (median) day 13. No significant difference was detected when comparing faecal virus shedding between the two groups ($P = 0.904$).

Table 7

Serum antibody titres evaluated in dogs receiving PIND-ORF and dogs receiving placebo, showing median, range, *P* values of the changes over time within each group (day 3 vs. 0, day 7 vs. 0, and day 14 vs. 0) and comparing groups on days 0, 3, 7, and 14.

| Variable | Day | Median | Range | Median | Range | <i>P</i> | | |
|----------------------------|-----|----------|--------------|---------|--------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | | PIND-ORF | | Placebo | | PIND ORF vs. placebo | PIND-ORF day 0 vs. 3, 7, 14 | Placebo day 0 vs. 3, 7, 14 |
| Serum neutralisation assay | 0 | 1:80 | <1:10–1:280 | 1:320 | <1:10–1:2560 | NS | | |
| | 3 | 1:640 | 1:40–1:1280 | 1:320 | 1:160–1:5120 | NS | NS | NS |
| | 7 | 1:640 | 1:80–1:2560 | 1:640 | 1:320–1:2560 | NS | <0.01 | NS |
| | 14 | 1:960 | 1:320–1:1280 | 1:1280 | 1:640–1:5120 | NS | <0.001 | NS |

NS, not significant.

Paramunity inducers have been used to stimulate the immune system for several decades. In most studies describing a positive influence of the paramunity inducer PIND-ORF on viral diseases, it has been used prophylactically (Mayr and Sibert, 1990; Ziebell et al., 1997a, 1997b; Kyriakis et al., 1998; Ryan et al., 2010). There are only few placebo-controlled studies that showed a positive effect in metaphylactic or therapeutic applications (Mayr and Brunner, 1980; Mayr et al., 1991; Castrucci et al., 2000). In contrast, several studies failed to show any positive effect (Klimentowski et al., 1992; Block et al., 1997). So far, no studies investigating the effect of paramunity inducers in CPV infection have been published.

Young puppies are at high risk of mortality arising from CPV infection, especially during the time after maternal antibodies have waned and before specific post-vaccination antibodies have developed (Pollock and Carmichael, 1982; Goddard and Leisewitz, 2010). The innate immunity is considered to play a critical role in host

defences to fight viral infections (Robert-Tissot et al., 2011), and a drug stimulating the innate immune system could be helpful in reducing the severity of illness and accelerating recovery. In the present study, no influence of PIND-ORF on the clinical course of CPV infection could be detected.

There was a significant improvement in clinical and laboratory parameters, but this improvement was demonstrated in both groups. Time to recovery (median, 8 days) was not different between the two groups. Time to recovery was comparable to what is generally expected for recovery in CPV infections, but depending on the severity of disease, time to recovery can be longer in individual animals (Iris et al., 2010; Greene and Decaro, 2012). Since there were no significant differences in the severity of the disease between the two groups at the beginning of the study, disease severity did not affect outcome. Recovery was most likely due to intensive supportive care and monitoring of patients.

With one exception, evaluation of laboratory parameters revealed no significant differences between the two groups. A significant increase in lymphocytes was observed in the PIND-ORF group only. This increase could have been caused by a non-specific stimulation of the immune system. In one in vitro study, PIND-ORF stimulated the proliferation of CD4+ and CD4-/CD8+ T cells (Schütze et al., 2009). In addition, a significant increase in antibody titres comparing days 7 and 14 to day 0 was detected in dogs of the PIND-ORF group only. PIND-ORF is considered to be a stimulator of innate immunity, but a transient production of PIND-ORF-specific antibodies has been demonstrated in vitro (Schütze et al., 2010) and it is possible that PIND-ORF induced faster antibody development. However, neither the increase in lymphocyte counts nor that in serum antibody titres affected the clinical outcome in any of the dogs receiving PIND-ORF.

It is possible that a potential beneficial effect of PIND-ORF occurs too late to be helpful in what is an acute disease. PIND-ORF is reported to induce an early innate immune response (Schütze et al., 2009) inducing a 2- to 10-fold secretion of IFNs by T-helper cells after 5 days (Fachinger et al., 2000). Such a late effect would potentially be more pronounced and animals with CPV infection might therefore benefit from an earlier application of PIND-ORF.

The number of animals shedding CPV decreased significantly in both groups over the observation period. The reduction in CPV shedding is expected over a period of 2–6 weeks (Decaro et al., 2005b) but the present study was conducted over a period of only 2 weeks. A positive influence of PIND-ORF on virus shedding may therefore have been overlooked, since the study ended before faecal CPV shedding had finished in all puppies. However, as 80% of dogs in the placebo group and 90% of dogs of the PIND-ORF group stopped virus shedding within 2 weeks, and no significant differences in virus shedding could be detected within this time frame, a later significant difference is very unlikely.

Only three dogs did not survive, although CPV is reported to cause high mortality (Goddard and Leisewitz, 2010). All dogs that were euthanased were in the placebo group, but this did not lead to a significant difference in mortality rate between the two groups. It

Table 8

Titres of serum neutralisation assay in individual dogs, showing the specific antibody titres of individual dogs receiving PIND-ORF and dogs receiving placebo on days 0, 3, 7, and 14. Sera of dogs receiving fresh frozen plasma or whole blood transfusions were excluded.

| Antibody titres against CPV | Day 0 | Day 3 | Day 7 | Day 14 | |
|-----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| PIND-ORF group | 1 | 1:160 | 1:640 | 1:1280 | 1:1280 |
| | 2 | 1:40 | 1:160 | 1:1280 | 1:640 |
| | 3 | 1:160 | 1:160 | | |
| | 4 | 1:80 | 1:640 | 1:640 | 1:640 |
| | 5 | 1:160 | | 1:160 | 1:640 |
| | 6 | <1:10 | 1:320 | 1:640 | 1:640 |
| | 7 | 1:20 | 1:640 | 1:1280 | 1:1280 |
| | 8 | 1:80 | | 1:160 | 1:640 |
| | 9 | 1:320 | | | |
| | 10 | 1:1280 | 1:1280 | 1:2560 | 1:1280 |
| | 11 | 1:640 | 1:1280 | 1:640 | 1:640 |
| | 12 | | 1:1280 | 1:640 | |
| | 13 | <1:10 | 1:80 | 1:1280 | 1:1280 |
| | 14 | <1:10 | 1:40 | 1:80 | 1:320 |
| | 15 | <1:10 | 1:160 | 1:640 | 1:1280 |
| | 16 | <1:10 | 1:640 | 1:1280 | 1:1280 |
| | 17 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:1280 |
| Placebo group | 1 | 1:160 | | 1:640 | |
| | 2 | 1:160 | 1:160 | 1:640 | |
| | 3 | 1:320 | 1:320 | 1:640 | 1:640 |
| | 4 | 1:640 | 1:320 | 1:640 | 1:640 |
| | 5 | 1:320 | 1:320 | 1:320 | 1:640 |
| | 6 | 1:640 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 |
| | 7 | 1:640 | 1:320 | | 1:640 |
| | 8 | 1:320 | 1:160 | | |
| | 9 | 1:160 | 1:160 | 1:640 | 1:640 |
| | 10 | 1:2560 | 1:5120 | 1:2560 | 1:2560 |
| | 11 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:1280 |
| | 12 | 1:640 | | 1:1280 | 1:1280 |
| | 13 | 1:1280 | 1:2560 | 1:2560 | 1:5120 |
| | 14 | 1:320 | | | |
| | 15 | 1:160 | 1:160 | | |
| | 16 | <1:10 | 1:160 | | 1:1280 |
| | 17 | 1:640 | 1:320 | | |

CPV, canine parvovirus.

is possible that a significant difference could have been detected if a higher number of dogs had been included but mortality assessment was not the main outcome parameter of the present study.

One limitation was the additional but specifically defined treatment given to some of the dogs in both treatment groups. This was occasionally necessary to prevent severe complications, such as septicæmia or shock and was not identical for all dogs. The number of dogs with additional medication and the number of medications given to an individual dog were not significantly different between the two groups. A completely standardised treatment protocol would not have been ethically acceptable.

This study does not address whether PIND-ORF would have any effect in dogs that suffer from mild disease or in dogs treated as ambulatory patients without intensive care and high cost treatment, including the passive transfer of antibodies. It is possible that PIND-ORF would be effective if applied earlier in the course of infection. However, dogs are usually presented with clinical signs of CPV infection apparent and therefore too late for a metaphylactic approach.

Conclusions

PIND-ORF did not accelerate recovery or improve clinical signs and laboratory values in dogs with CPV infection treated with intensive care. There was no effect on the duration of CPV shedding. PIND-ORF treatment was associated with a significant increase in lymphocytes and a faster increase in CPV antibody titres.

Conflict of interest statement

Zoetis Germany supplied PIND-ORF Zylexis (strain D1701) and placebo and provided financial support of the study but played no role in the collection, analysis and interpretation of data, or in the content of the manuscript or submission for publication. None of the authors has any other financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

The authors thank Professor Ralf S. Mueller for his support in the statistical analysis of this study. They also thank Zoetis, Berlin for supplying PIND-ORF Zylexis (strain D1701) and placebo, and for financial support of the study.

References

Alper, S., Laws, R., Lackford, B., Boyd, W.A., Dunlap, P., Freedman, J.H., Schwartz, D.A., 2008. Identification of innate immunity genes and pathways using a comparative genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7016–7021.

Block, A., Hartmann, K., Lutz, H., Kraft, W., 1997. Placebo-controlled double-blind study on the efficacy of a paramunity inducer in the treatment of naturally FeLV-infected cats. *Tierärztliche Praxis* 25, 261–266.

Castrucci, G., Osburn, B.I., Frigeri, F., Ferrari, M., Salvatori, D., Lo Dico, M., Barreca, F., 2000. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 23, 163–173.

Chappuis, G., 1998. Neonatal immunity and immunisation in early age: Lessons from veterinary medicine. *Vaccine* 16, 1468–1472.

Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005a. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 133–138.

Fachinger, V., Schlapp, T., Strube, W., Schmeer, N., Saalmüller, A., 2000. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *Journal of Virology* 74, 7943–7951.

Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine parvovirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 40, 1041–1053.

Greene, C.E., Decaro, N., 2012. Canine parvovirus enteritis. In: *Infectious Diseases of the Dog and the Cat*, Fourth Ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 67–75.

Iris, K., Leontides, L.S., Mylonakis, M.E., Adamama-Moraitou, K., Rallis, T., Koutinas, A.F., 2010. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalisation and final outcome in canine parvovirus infection. *Research in Veterinary Science* 89, 174–178.

Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197–216.

Kliementowski, S., Kölbl, S., Fischer, M., 1992. The effectiveness of paramunisation for the control of feline coryza. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 105, 253–259.

Kyriakis, S.C., Tzika, E.D., Lyras, D.N., Tsinas, A.C., Saoulidis, K., Sarris, K., 1998. Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science* 64, 187–190.

Kyriakis, S.C., Saoulidis, K., Lekkas, S., Miliotis, C.C., Papoutsis, P.A., Kennedy, S., 2002. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology* 126, 38–46.

Lin, W., Qiu, Z., Liu, Q., Cui, S., 2013. Interferon induction and suppression in swine testicle cells by porcine parvovirus and its proteins. *Veterinary Microbiology* 163, 157–161.

Mayr, A., Brunner, R., 1980. Effectiveness of para-immunisation for the control of piglet breeding losses and enzootic pneumonia of swine (piglet influenza). *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 27, 589–598.

Mayr, A., Büttner, M., 1984. New insights into the foundations of paramunity and paramunisation. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 97, 429–435.

Mayr, A., Mayr, B., 1999. A new concept in prophylaxis and therapy: Paramunisation by poxvirus inducers. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 19, 91–98.

Mayr, A., Sibert, M., 1990. Effectiveness of the para-immunity inducer “Pind-Orf” in diminishing the rise of serum cortisol brought about by transport stress in horses. *Tierärztliche Umschau* 45, 677–682.

Mayr, B., Deininger, S., Büttner, M., 1991. Treatment of chronic stomatitis of cats by local paramunisation with PIND-ORF. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 38, 78–80.

Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Slauson, D.O., 1985. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: The importance of viremia. *Veterinary Pathology* 22, 60–71.

Otto, C.M., Drobatz, K.J., Soter, C., 1997. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11, 65–70.

Paglino, J.C., Andres, W., van den Pol, A.N., 2014. Autonomous parvoviruses neither stimulate nor are inhibited by type I interferon response in human normal or cancer cells. *Journal of Virology* 88, 4932–4942.

Parrish, C.R., Carmichael, L.E., Antczak, D.F., 1982. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional antisera and monoclonal antibodies. *Archives of Virology* 72, 267–278.

Pollock, R.V., Carmichael, L.E., 1982. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: Transfer, decline, and interference with vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 180, 37–42.

Raykov, Z., Grekova, S.P., Hörlein, R., Leuchs, B., Giese, T., Giese, N.A., Rommelaere, J., Zawatzky, R., Daeffler, L., 2013. TLR-9 contributes to the antiviral innate immune sensing of rodent parvoviruses MVMp and H-1PV by normal human immune cells. *PLoS ONE* 8, e55086.

Robert-Tissot, C., Rüegger, V.L., Cattori, V., Meli, M.L., Riond, B., Gomes-Keller, M.A., Vögtlin, A., Wittig, B., Juhs, C., Hofmann-Lehmann, R., et al., 2011. The innate antiviral immune system of the cat: Molecular tools for the measurement of its state of activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 143, 269–281.

Ryan, C., Giguère, S., Fultz, L., Long, M.T., Crawford, P.C., 2010. Effects of two commercially available immunostimulants on leukocyte function of foals following ex vivo exposure to *Rhodococcus equi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 138, 198–205.

Schultz, R.D., Thiel, B., Mukhtar, E., Sharp, P., Larson, L.J., 2010. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 142, S102–S108.

Schunck, B., Kraft, W., Truyen, U., 1995. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in faeces. *Journal of Virological Methods* 55, 427–433.

Schütze, N., Raue, R., Büttner, M., Alber, G., 2009. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Veterinary Microbiology* 137, 260–267.

Schütze, N., Raue, R., Büttner, M., Köhler, G., McInnes, C.J., Alber, G., 2010. Specific antibodies induced by inactivated parapoxvirus ovis potentially enhance oxidative burst in canine blood polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Veterinary Microbiology* 140, 81–91.

Strube, W., Kretzdorn, D., Grunmach, J., Bergle, R.D., Thein, P., 1989. The effectiveness of the paramunity inducer Baypamun (PIND-ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle. *Tierärztliche Praxis* 17, 267–272.

Toman, M., Faldyna, M., Knotigova, P., Pokorova, P., Sinkora, J., 2002. Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87, 321–326.

Yokota, S., Okabayashi, T., Fujii, N., 2010. The battle between virus and host: Modulation of Toll-like receptor signaling pathways by virus infection. *Mediators of Inflammation* 2010, 184328. doi:10.1155/2010/184328.

Ziebell, K.L., Kretzdorn, D., Auer, S., Failing, K., Schmeer, N., 1997a. The use of Baypamun N in crowding-associated infectious respiratory disease: Efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 2-week-old veal calves. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 44, 415–424.

Ziebell, K.L., Steinmann, H., Kretzdorn, D., Schlapp, T., Failing, K., Schmeer, N., 1997b. The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: Efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4–10 month old horses. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 44, 529–536.

IV. INFLUENCE OF CLINICAL AND LABORATORY VARIABLES ON FECAL ANTIGEN ELISA RESULTS IN DOGS WITH PARVOVIROSIS

Anna-Lena Proksch¹

Stefan Unterer¹, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA

Stephanie Speck², Dr. med. vet.

Uwe Truyen², Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Katrin Hartmann¹, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian-Universitaet, Munich

² Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany

The Veterinary Journal, article in press; accepted March 7th 2015



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection

A.L. Proksch^{a,*}, S. Unterer^a, S. Speck^b, U. Truyen^b, K. Hartmann^a

^a Clinic for Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

^b Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 7 March 2015

Keywords:

Polymerase chain reaction (PCR)
In-house test
Canine
Parvovirus
Antibodies
Diagnostic test

ABSTRACT

False negative faecal canine parvovirus (CPV) antigen ELISA results in dogs with CPV infection are common, but the factors that lead to these false negative results are still unknown. The aim of this study was to investigate whether dogs with a false negative faecal CPV antigen ELISA result have milder clinical signs and laboratory changes, a lower faecal virus load, higher faecal and serum CPV antibody titres and a faster recovery than dogs with a positive result. Eighty dogs with CPV infection, confirmed by the presence of clinical signs and a positive faecal CPV polymerase chain reaction (PCR), were assigned to two groups according to their faecal antigen ELISA result. Time until presentation, severity of symptoms, laboratory parameters, faecal virus load, faecal and serum antibody titres, and CPV sequencing data were compared between both groups. In 38/80 dogs that were hospitalised until recovery, the time to recovery, mortality, and the course of the disease were compared between dogs with positive and negative faecal antigen ELISA results.

Of the 80 dogs included, 41 (51.3%) had a false negative faecal antigen ELISA result. ELISA-negative dogs had a significantly shorter time until presentation, lower frequency of defaecation, lower faecal virus load, and higher serum antibody concentrations than ELISA-positive dogs. Laboratory changes, CPV shedding, and outcomes were not associated with faecal antigen ELISA results. In conclusion, low faecal CPV load and antibodies binding to CPV antigen in faeces are likely to be important reasons for false negative faecal antigen ELISA results. Dogs with clinical signs of CPV infection should be retested by faecal PCR.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Canine parvovirus (CPV) infection is caused by CPV-2a, -2b, and -2c (Decaro et al., 2005; Goddard and Leisewitz, 2010). Soon after its emergence in the late 1970s, CPV-2 was replaced by the variants CPV-2a and CPV-2b evolving from single mutations (Goddard and Leisewitz, 2010; Decaro and Buonavoglia, 2012). In 2000, a new antigenetic variant, the Glu-426 mutant, commonly referred to as CPV-2c, was described (Decaro et al., 2009b).

All genetic variants coexist worldwide with a globally different distribution in frequency and genetic variability (Pinto et al., 2012; Aldaz et al., 2013; Streck et al., 2013). Continuous amino acid mutations within the three antigenetic variants CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c lead to the development of new mutants within those variants (Mittal et al., 2014). CPV variant distribution varies locally, with a predominance of CPV-2b and CPV-2c in North America, whereas CPV-2a predominates in Asia and Australia. CPV strain variation also differs

in European countries: CPV-2a is mainly detected in Greece and Hungary, whilst CPV-2a and CPV-2b, and CPV-2a and CPV-2c predominate in the United Kingdom and Italy, respectively. In Germany, all three variants are detected (Decaro and Buonavoglia, 2012).

CPV is highly contagious and primarily transmitted by the faecal-oral route. The main source of infection is CPV shedding from infected dogs (Hoskins, 1997; Smith-Carr et al., 1997; Decaro and Buonavoglia, 2012). An early diagnosis of this potentially fatal infection is essential to provide adequate treatment and to prevent death. Rapid in-house tests detecting faecal CPV antigen are frequently used for diagnosis (Decaro and Buonavoglia, 2012).

The SNAP Parvo test from Idexx Laboratories is a faecal CPV antigen ELISA, which is popular and used worldwide as a rapid in-house test. Although highly specific, very variable data on its sensitivity have been published. Reported sensitivities vary between 81.8% (Marcovich et al., 2012), 56.2% (Desario et al., 2005), and 18.4% (Schmitz et al., 2009). False negative test results are common and can lead to underdiagnosis of CPV infection that can result in inadequate treatment and spread of the virus.

There is only limited knowledge about the reasons for the high number of false negative faecal antigen ELISA results. The aim of

* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 2650.

E-mail address: L.Proksch@medizinische-kleintierklinik.de (A.L. Proksch).

the present study was to investigate whether dogs with false negative faecal antigen ELISA results (1) show milder clinical signs and changes of laboratory variables; (2) have a shorter duration of disease until presentation; (3) have lower faecal CPV load, higher faecal and serum anti-CPV antibody titres; (4) have faster recovery. In addition, potential differences in CPV strain mutations due to changes in amino acids in the VP2 protein were investigated by sequencing.

Materials and methods

Study design

Eighty dogs presented from January 2009 to December 2012 at the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig-Maximilians-Universität Munich were included in the study. The work was performed as a combined prospective and retrospective clinical trial. In total, 64 dogs were included prospectively. For these dogs, the study fulfilled the German guidelines for prospective studies with owners' consent. Additionally, 16 dogs with confirmed CPV infection were included retrospectively. Blood and faecal samples from these dogs were collected for unrelated purposes.

CPV infection in all 80 dogs was confirmed by the presence of clinical signs and a positive faecal polymerase chain reaction (PCR) results. At day of admission, all dogs were tested by faecal antigen ELISA (SNAP Parvo test; Idexx Laboratories) and were assigned to two groups according to their faecal antigen ELISA results.

Dogs

Dogs of all ages, sexes, and breeds were included (Table 1). Inclusion criteria were diagnosis of CPV infection by a positive faecal PCR and clinical signs consistent with CPV infection. To eliminate vaccine-induced positive faecal PCR and ELISA results, vaccination 3 weeks prior to admission led to exclusion.

Clinical signs, laboratory changes, faecal CPV load, and faecal and serum CPV antibody titres were compared between both groups. Course of disease by evaluation of time to recovery, outcome, and CPV shedding was evaluated in 38/80 dogs that were hospitalised. Additionally, CPV sequencing was performed in 20 faecal samples consisting of 10 samples from ELISA-positive dogs and 10 samples from ELISA-negative dogs, all selected randomly.

Clinical parameters

Seven clinical parameters were assessed and compared between both groups (Table 2) including faecal consistency by using the Purina Faecal Scoring System for

Table 1
Signalment of patients in the ELISA-positive and ELISA-negative groups.

| Parameter | ELISA-positive | ELISA-negative | P |
|-----------------|---|---|-------|
| Sex | Male (n = 19) Female (n = 20) | Male (n = 20) Female (n = 21) | 1.000 |
| Breed | Mixed breed (n = 12) Purebred (n = 27) (different breeds) | Mixed breed (n = 17) Purebred (n = 24) (different breeds) | 0.359 |
| Age (weeks) | Median 10.5 (range 5.0–52.0) | Median 10.0 (range 6.0–140) | 0.435 |
| Bodyweight (kg) | Median 3.80 (range 0.52–48.0) | Median 2.15 (range 0.44–17.4) | 0.017 |

Table 2
Scoring system for clinical parameters according to severity of clinical signs.

| Parameter | Grade 0 | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 |
|--------------------------|----------------|------------------|----------------------|--------------------|
| Faecal composites | None | Mucus | Blood admixed | Bloody |
| Frequency of defaecation | 1/day | 2–3/day | 4–5/day | >5/day |
| Vomiting | No vomiting | 1/day | 2–3/day | >3/day |
| General condition | Normal | Mildly depressed | Moderately depressed | Severely depressed |
| Appetite | Normal | Mildly decreased | Moderately decreased | Severely decreased |
| Dehydration | No dehydration | <5% | 5–10% | >10% |

Dogs (PFSSD)¹, faecal composites (e.g., blood) and frequency of defaecation, vomiting, dehydration, appetite, and general condition. Based on the severity of clinical signs, each parameter was graded from 0 to 3. The PFSSD classifies faeces from 1 to 7, whilst a score ≤5 is considered as adequate recovery from diarrhoea. Additionally, the duration of clinical signs observed by the owners before dogs were admitted to the clinic was evaluated.

Complete blood counts (CBC) and biochemistry

CBC parameters (Cell-Dyn 3500 R, Abbott Diagnostics, and Sysmex XT-2000i, Sysmex Corporation) included white blood cell count (WBC), neutrophil, granulocyte and lymphocyte count, haematocrit, and platelet count. Additionally, total protein, globulin, and albumin concentrations were measured (Hitachi 717 Autoanalyzer, Boehringer).

Faecal CPV load

Faecal samples were immediately frozen at –20 °C until further processing. DNA from faecal samples was isolated using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Only 52 faecal samples from 80 dogs were available for further investigation. Quantitation of viral DNA copies was carried out as described by Streck et al. (2013).

Antibodies in faeces and serum

For detection of faecal CPV antibodies, the faecal samples (52/80) were immediately frozen at –20 °C and examined at the end of the study. Briefly, 1 g of each faecal sample was thoroughly mixed in 9 mL PBS (pH 7.2), and the suspensions were filtered using 0.2 µm liquid filters (Sartorius). Of these suspensions two-fold serial dilutions in PBS were prepared. Twenty-five microlitres were mixed with an equal volume of CPV (8 haemagglutinating units/mL). After an incubation period of 2 h at 37 °C, 50 µL of a 0.5% pig erythrocyte suspension was added, incubated overnight at 4 °C and optically evaluated. Samples that revealed haemagglutination inhibition (HI) titres <1:10 were considered negative.

For evaluation of CPV antibodies by serum neutralisation assay, 53/80 serum samples were available. All sera were heat-treated at 56 °C for 30 min and stored at –20 °C. Serum samples were pre-diluted 1:5 and then serially diluted at steps of 1:2. Diluted samples were mixed with an equal volume of CPV (200 median tissue culture infective dose or TCID₅₀ per 0.1 mL). After 2 h of incubation at 37 °C, 100 µL of the serum/virus mixtures was inoculated onto Crandell Rees feline kidney (CRFK) cells seeded in 96-well microtitre plates. Plates were incubated for 5–6 days at 37 °C and 5% CO₂. Cells were then fixed for 20 min at –20 °C using acetone/methyl alcohol 1:1 (vol/vol). For virus staining, an anti-CPV monoclonal antibody (Parrish et al., 1982) and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (H + L) conjugate (Dianova) were applied. Titres <1:10 were considered negative.

CPV sequencing

For CPV sequencing, 20 faecal samples (including 10 ELISA-positive faecal samples and 10 ELISA-negative faecal samples) were randomly chosen from the 52 available faecal samples. Preparation of DNA was carried out as described above. Amplification of CPV DNA was performed using the primer pairs M1) and #19&M5 targeting the CPV structure protein VP2 as described by Steinel et al. (2000). PCR products were sequenced at the Core Unit DNA Technologies (IZKF) of Leipzig University. Determination of open reading frames and subsequent amino acid alignments with corresponding sequences retrieved from the GenBank database² were performed using the software package BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) and the implemented ClustalW version 1.4 (Thompson et al., 1994).

Course of disease

In 38/80 dogs, course of disease, clinical outcome, and CPV shedding between ELISA-positive and ELISA-negative dogs were determined. These dogs were hospitalised until recovery and treated symptomatically (Appendix: Supplementary Table S1). They were represented for follow-up on day 14 after admission. Recovery was defined as normal general condition, normal appetite, no vomiting, normal body temperature (range, 38.0–39.0 °C ± 0.2 °C), normal hydration status, and neutrophil counts above the lower level of the reference range (≥3.0 × 10⁹/L). Faecal consistency had to be equivalent to a score ≤5 of the PFSSD.

Clinical signs and laboratory variables were evaluated daily during hospitalisation and re-evaluated on day 14. Blood of animals with a bodyweight <1.5 kg was only taken every second day. Values of WBC, haematocrit, albumin, total protein, and globulin concentrations were not included in the analysis in dogs that received whole blood transfusions (seven dogs).

¹ See: <http://www.foothillpethospital.com/images/fecal-scoring.jpg> (accessed 28 February 2015).

² See: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 28 February 2015).

CPV shedding throughout treatment between dogs with positive and false negative faecal antigen ELISA results was evaluated by comparing both the number of dogs shedding CPV at a given time point (days 3, 7, and 14) and the duration of CPV shedding. CPV shedding was assessed by a qualitative PCR using a previously described protocol (Schunck et al., 1995) on distinct days rather than as a daily observation. For statistical evaluation, CPV shedding was assumed to occur on the day before the PCR showed a negative result.

Statistical methods

Differences in age, bodyweight, clinical signs, blood parameters, quantitative faecal PCR, and faecal and serum antibody titres between both groups were analysed by unpaired *t* test and Mann–Whitney test (Prism 4.0, GraphPad). Comparison of sex, breed, CPV shedding, CPV sequencing, and mortality rate was performed by Fisher's exact test (Prism 4.0, GraphPad). The course of disease, by comparison of time to recovery and duration of virus shedding, was performed by analysis of comparison of survival curves by Log-rank (Mantel–Cox) test (Prism 4.0, GraphPad). Differences in clinical signs and laboratory parameters examined in hospitalised dogs were analysed by Kruskal–Wallis test and Dunn's Multiple Comparison test (Prism 4.0, GraphPad). $P < 0.05$ was considered significant. When multiple comparisons of the same data were performed, a Bonferroni correction was applied by dividing the *P* value by the number of individual comparisons.

Results

Signalment, clinical and laboratory parameters

There was no significant difference between the dogs in the ELISA-positive and the ELISA-negative groups in terms of sex, breed, and age, but dogs in the ELISA-positive group had a significantly higher bodyweight ($P = 0.018$) than dogs in the ELISA-negative group (Table 1). Comparing the duration of clinical signs before admission, there was a significant difference ($P = 0.030$) between both groups, with a significantly longer duration of clinical signs in the ELISA-positive (median 1.5 days) than in the ELISA-negative group (median 1.0 days, Table 3). When comparing clinical signs between both groups, there was a significantly higher frequency of defaecation in ELISA-positive dogs than ELISA-negative dogs ($P = 0.013$). There was no significant difference either in any other clinical parameter between both groups (Table 3), nor in CBC, total protein, albumin, and globulin concentrations (Appendix: Supplementary Table S2).

CPV load and CPV antibodies in faeces and serum

To normalise data, log-transformation of CPV DNA copy data was performed. Dogs in the ELISA-positive group showed a significantly higher number of faecal CPV DNA copies than dogs of the ELISA-negative group ($P = 0.033$; Fig. 1; Table 4).

Table 3

Clinical parameters evaluated in ELISA-positive and ELISA-negative dogs on the day of presentation and duration (days) of clinical signs observed by the owners before presentation.

| Variable | Mean \pm SD ELISA-positive | Mean \pm SD ELISA-negative | <i>P</i> (ELISA-positive vs. ELISA-negative) |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---|
| Purina faecal score (score 1–7) | 6.4 \pm 0.8 | 6.1 \pm 1.0 | 0.147 |
| Faecal composites (score 0–3) | 1.5 \pm 1.1 | 1.5 \pm 1.1 | 0.856 |
| Frequency of defaecation (score 0–3) | 2.2 \pm 1.0 | 1.6 \pm 0.9 | 0.013 |
| Vomiting (score 0–3) | 1.2 \pm 1.3 | 1.5 \pm 1.3 | 0.288 |
| General condition (score 0–3) | 2.0 \pm 1.0 | 2.1 \pm 0.9 | 0.859 |
| Appetite (score 0–3) | 2.2 \pm 1.2 | 2.2 \pm 1.1 | 0.836 |
| Dehydration (score 0–3) | 1.5 \pm 0.9 | 1.7 \pm 0.8 | 0.413 |
| Duration of clinical signs before presentation (days) | 1.7 \pm 1.3 | 1.3 \pm 1.8 | 0.030 |

Statistical significance (in bold): $P < 0.017$ for faecal parameters after Bonferroni correction; $P < 0.05$ for the other parameters; SD, standard deviation.

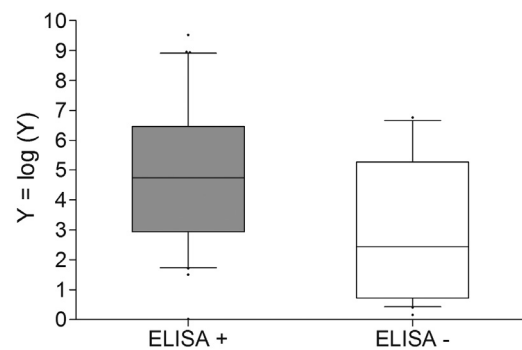


Fig. 1. Faecal DNA canine parvovirus (CPV) copies in faecal antigen ELISA-positive and ELISA-negative dogs. There was a significant difference in faecal DNA CPV copies between the two groups ($P = 0.033$).

Of the 52 investigated faecal samples, only 8/31 ELISA-positive and 7/21 ELISA-negative dogs showed detectable antibodies. Comparison of faecal CPV antibody titres did not reveal a significant difference between both groups ($P = 0.463$). However, when comparing serum CPV antibody titres, the ELISA-positive dogs showed a significantly lower ($P = 0.033$) serum antibody titre (median 1:320) than the ELISA-negative dogs (median 1:80; Table 4).

CPV sequencing

PCR amplification of the gene encoding VP2 generated two amplicons of 786 base pair (bp) (primers M1)) and 841 bp (primers #19&M5), respectively. Deduced amino acid (aa) sequences (data not shown in detail) corresponded to aa 73–335 and aa 343–584 of CPV VP2 (acc. no. FJ197834.1) and revealed no significant differences between the ELISA-positive and ELISA-negative dogs. With the exception of one CPV-2c strain found in the ELISA-positive group, CPV sequencing revealed CPV-2a strains in all other examined faecal samples. Changes in aa occurred at various positions between and within both groups. However, there was no significant difference in aa changes that could be related to the faecal antigen ELISA result (Table 5).

Course of disease

Recovery was achieved after a median of 7 days in the ELISA-positive dogs and a median of 8 days in the ELISA-negative dogs, which was not significantly different ($P = 0.501$) (Appendix: Supplementary Fig. S1). There was also no significant difference in any clinical and laboratory parameter in the course of disease when comparing the ELISA-positive and ELISA-negative dogs. Two dogs with an ELISA-positive test result and one dog with a negative result had to be euthanased due to pending distress. There was no significant difference in mortality ($P = 0.595$). There was a significantly higher number of dogs shedding CPV at day 3 in the ELISA-positive group than in the ELISA-negative group ($P = 0.033$). However, at days

Table 4

Faecal CPV DNA copies determined by real-time PCR and faecal and serum antibodies determined by virus neutralisation assay.

| Parameter | ELISA-positive | ELISA-negative | <i>P</i> |
|---|------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Median of CPV DNA viral copies; $y = \log(y)$ | 4.74 (range 0.02–9.52) | 2.44 (range 0.16–0.84) | 0.033 |
| Median of serum virus neutralisation assay (serum antibody titres) | 1:80 (range <1:10–1:2560) | 1:320 (range <1:10–1:2560) | 0.033 |
| Median of faecal virus neutralisation assay (faecal antibody titres) | <1:10 (range <1:10–1:320) | <1:10 (range <1:10–1:2560) | 0.462 |

CPV, canine parvovirus; log, logarithm; statistical significance: $P < 0.05$ in bold.

Table 5

Amino acid changes detected during CPV sequencing that occurred at 16 different positions of the CPV sequence alignment of the structural protein VP2 of ELISA-positive ($n = 10$) and ELISA-negative ($n = 10$) dogs.

| aa position of CPV alignment | Changed aa | ELISA-positive (number of dogs) | ELISA-negative (number of dogs) | <i>P</i> |
|------------------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|
| 74 | Glu ≥ Asp | 4 | 1 | 0.303 |
| 89 | Lys ≥ Gln | 1 | 0 | 1.000 |
| 122 | Asn ≥ His | 2 | 2 | 1.000 |
| 122 | Asn ≥ Pro | 2 | 2 | 1.000 |
| 124 | Gly ≥ Arg | 1 | 1 | 1.000 |
| 124 | Gly ≥ Val | 1 | 1 | 1.000 |
| 125 | Asp ≥ Asn | 0 | 1 | 1.000 |
| 125 | Asp ≥ His | 1 | 0 | 1.000 |
| 139 | Val ≥ Ile | 1 | 1 | 1.000 |
| 156 | Ser ≥ Phe | 0 | 1 | 1.000 |
| 192 | Ser ≥ Phe | 0 | 2 | 0.474 |
| 323 | Asn ≥ Lys | 0 | 1 | 1.000 |
| 324 | Tyr ≥ His | 0 | 1 | 1.000 |
| 324 | Tyr ≥ Ile | 2 | 2 | 1.000 |
| 381 | Gly ≥ Cys | 0 | 1 | 1.000 |
| 426 | Asn ≥ Glu | 1 | 0 | 1.000 |
| 440 | Ala ≥ Thr | 9 | 7 | 0.582 |
| 516 | Ala ≥ Gly | 0 | 1 | 1.000 |
| 527 | Ala ≥ Asp | 0 | 1 | 1.000 |
| 542 | Ser ≥ Phe | 0 | 1 | 1.000 |

aa, amino acid; CPV, canine parvovirus; *P* between ELISA-positive and ELISA-negative dogs.

7 ($P = 0.746$) and 14 ($P = 0.156$), there was no significant difference. There was no significant difference in the duration of CPV shedding between both groups ($P = 0.800$). Dogs of both groups shed virus until day 13 (median value).

Discussion

CPV infection is a common and severe disease that affects unprotected dogs worldwide. Thus, a quick and safe diagnostic test is essential in order to provide adequate treatment and to prevent virus spread. Rapid faecal antigen ELISA tests (such as the SNAP Parvo test) offer a rapid and low cost in-house solution. However, high numbers of false negative test result and thus a low sensitivity has been reported (Desario et al., 2005; Schmitz et al., 2009; Decaro and Buonavoglia, 2012). The reason for the high number of false negative test results is unclear and the aim this study was to compare dogs with positive and negative faecal antigen ELISA results and to investigate the association of several parameters with the faecal antigen ELISA result.

One theory for the false negative faecal antigen ELISA results is that mutations of CPV strains might occur in the field and are not detected by the faecal antigen ELISA. CPV mutates rapidly, and multiple aa changes within CPV strains are known, resulting in a series of CPV mutants within the antigenetic variants. Among these, the most famous variant is the Glu-426 mutant which emerged only recently. Being recognised as a true antigenetic variant, the Glu-426 mutant is also referred to as CPV-2c (Decaro et al., 2009b; Decaro and Buonavoglia, 2012). It has been suggested that the Glu-426 mutant might not be identified by commercial antigen ELISA but it was recently reported that the Glu-426 mutant was detected by the SNAP Parvo test (Decaro et al., 2009a) and by the Witness Parvo test (Synbiotics Corporation) (Decaro et al., 2013). In the present study, one dog (of 20) in which the genome was sequenced was infected with the Glu-426 mutant, but had a positive faecal antigen ELISA result. It is possible that other mutations of virus strains might not react positively in the antigen test. In this study, several aa changes in the CPV VP2 structure protein occurred within both groups. However, these changes occurred at various positions of the VP2 structure protein and did not lead to alterations of virus strains,

and there was no difference detected between ELISA-positive and ELISA-negative dogs. Thus, the results of CPV sequencing did not reveal mutations of CPV strains that would prevent interactions with the faecal antigen ELISA test.

ELISA-positive dogs had a significantly higher virus load than ELISA-negative dogs. Thus, the amount of virus in the faeces seems to be one important parameter that influences the faecal antigen ELISA result. The SNAP Parvo test has previously been reported to depend on faecal CPV load as large amounts of viral antigen are required for a clear visibility of the results (Desario et al., 2005). The results of the present study confirm that a low virus load can cause false negative faecal antigen ELISA results. High CPV faecal antibody concentrations could be one reason for a low faecal virus concentration. Faecal antibodies could bind to the CPV antigen, which therefore would not then be detected by the faecal antigen ELISA. Indeed, ELISA-negative dogs in this study had a significantly higher serum antibody titre than ELISA-positive dogs, in support of this theory.

Dogs with CPV infections have severe protein-losing enteropathy with loss of protein (including antibodies) in the faeces. Thus, dogs with high serum antibody titres would in addition be expected to have high faecal antibody titres. However, faecal antibody titres did not significantly differ between both groups. Yet, faecal antibodies were only detectable in 8/31 ELISA-positive and 7/21 ELISA-negative dogs. This surprisingly low number of dogs with faecal antibodies may be falsely low. It is assumed that faecal CPV and faecal antibodies form antigen-antibody complexes and it is possible that the antigen-antibody complex formation would interfere not only with the faecal antigen ELISA result in ELISA-negative dogs, but also with the HI used to determine faecal antibody titres.

Dogs with very liquid, bloody diarrhoea could lose more protein and consequently antibodies in their faeces, but in the present study, ELISA-negative dogs had a significantly lower frequency of defaecation and thus, less severe diarrhoea. The theory that dogs with more liquid faeces are more likely to have false negative faecal antigen ELISA results could not be supported. In contrast, dogs with negative faecal antigen ELISA results and thus lower CPV load had milder clinical signs than ELISA-positive dogs, especially when looking at the frequency of defaecation. The clinical course of infection and the outcome of CPV infection, however, did not differ as was shown by the many follow-up parameters investigated.

Another possibility for the difference in faecal virus load and consequently the difference in faecal antigen ELISA results could be the timing of testing. In experimental studies, CPV shedding was demonstrated as early as 3–4 days after inoculation (Macartney et al., 1984; Meunier et al., 1985) with a peak of virus shedding 4–7 days after inoculation (Macartney et al., 1984; Goddard and Leisewitz, 2010). Whilst tests such as the haemagglutination assay, virus isolation, and ELISA are reported to detect virus only for a few days up to 11 days after infection, PCR is able to detect viral DNA for as long as 6 weeks after infection (Decaro et al., 2005; Goddard and Leisewitz, 2010; Decaro and Buonavoglia, 2012).

Although not described in the literature, the window of detection of CPV shedding by ELISA might be smaller than the detection of virus shedding by PCR based on the superior sensitivity of PCR. Thus, PCR may be able to detect viral DNA at an earlier stage. Indeed, in the present study, there was a significant difference in the period of time owners had observed clinical signs before dogs were admitted to the clinic with a significantly longer period of clinical signs in ELISA-positive dogs. Therefore, the false-negative faecal antigen ELISA results found in ELISA-negative dogs could reflect an early stage of CPV infection. As the duration of clinical signs in ELISA-positive and ELISA-negative dogs only differed by half a day, it seems reasonable to repeat the faecal antigen ELISA after several hours or on the following days in dogs suspected to have CPV infection.

The ELISA-positive dogs in the present study had significantly higher bodyweights than ELISA-negative dogs. Although no breed predisposition was detected, it has been reported that some breeds (including Rottweilers, Doberman pinschers, and Labrador retrievers) are more susceptible to CPV infection (Glickman et al., 1985; Goddard and Leisewitz, 2010). Thus, the significant difference in bodyweight could reflect a predisposition for large breed dogs to have higher CPV replication in the gut and so shed more antigens in the faeces.

One limitation of this study is that only 52 faecal samples and 53 serum samples were available for antibody testing. In some of the dogs, the amount of faeces was not sufficient for all examinations. Also, the amount of blood in some animals was limited due to their low bodyweight. Another limitation was that only 38 dogs were available for comparison of the course of disease.

Conclusions

False negative faecal antigen ELISA results occurred in 51.3% of the dogs tested. The main reason for a false negative faecal antigen ELISA result was a low faecal virus load. High serum antibody concentrations that cross the intestinal barrier may also contribute by binding to the antigen in faeces. Clinical signs (except for frequency of defaecation) or outcome did not differ between ELISA-positive and ELISA-negative dogs. It is important to recognise that there is a high number of false-negative faecal antigen ELISA results. Therefore, infected dogs may be missed and this could contribute to fatality and virus spread.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

The authors thank Professor Ralf S. Mueller for his support in the statistical analysis of this study and N. Leinecker for her work in the laboratory. These data were partly presented as an oral research abstract presentation at the ACVIM-Congress 2013, Seattle and as an oral research abstract presentation at the FECAVA-Congress 2014, Munich.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.tvjl.2015.03.009.

References

Aldaz, J., García-Díaz, J., Calleros, L., Sosa, K., Iraola, G., Marandino, A., Hernández, M., Panzera, Y., Pérez, R., 2013. High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador. *Veterinary Microbiology* 166, 214–219.

- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirus – a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology* 155, 1–12.
- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 133–138.
- Decaro, N., Desario, C., Beall, M.J., Cavalli, A., Campolo, M., Dimarco, A.A., Amorisco, F., Colaianni, M.L., Buonavoglia, C., 2009a. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *The Veterinary Journal* 184, 373–375.
- Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Larusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Di Trani, L., et al., 2009b. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* 385, 5–10.
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Colao, V., Elia, G., Ventrella, G., Kusi, I., Bo, S., et al., 2013. Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. *The Veterinary Journal* 198, 504–507.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C., 2005. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods* 126, 179–185.
- Glickman, L.T., Domanski, L.M., Patronek, G.J., Visintainer, F., 1985. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187, 589–594.
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine parvovirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 40, 1041–1052.
- Hall, T., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Hoskins, J.D., 1997. Update on canine parvoviral enteritis. *Veterinary Medicine* 92, 694–709.
- Macartney, L., McCandlish, I.A., Thompson, H., Cornwell, H.J., 1984. Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. *Veterinary Record* 115, 453–460.
- Marcovich, J.E., Stucker, K.M., Carr, A.H., Harbison, C.E., Scarlett, J.M., Parrish, C.R., 2012. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241, 66–72.
- Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Slauson, D.O., 1985. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: The importance of viremia. *Veterinary Pathology* 22, 60–71.
- Mittal, M., Chakravarti, S., Mohapatra, J.K., Chug, P.K., Dubey, R., Upmanuy, V., Narwal, P.S., Kumar, A., Churamani, C.P., Kanwar, N.S., 2014. Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure. *Infection, Genetics and Evolution* 23, doi:10.1016/j.meegid.2014.01.015.
- Parrish, C.R., Carmichael, L.E., Antczak, D.F., 1982. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional antisera and monoclonal antibodies. *Archives of Virology* 72, 267–278.
- Pinto, L.D., Streck, A.F., Gonçalves, K.R., Souza, C.K., Corbellini, Â.O., Corbellini, L.G., Canal, C.W., 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Research* 165, 29–33.
- Schmitz, S., Coenen, C., König, M., Thiel, H.J., Neiger, R., 2009. Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21, 344–345.
- Schunck, B., Kraft, W., Truyen, U., 1995. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of Virological Methods* 55, 427–433.
- Smith-Carr, S., Macintire, D.K., Swango, L.J., 1997. Canine parvovirus. Part I. pathogenesis and vaccination. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 19, 125–133.
- Steinel, A., Munson, L., van Vuuren, M., Truyen, U., 2000. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *Journal of General Virology* 81, 345–350.
- Streck, A.F., Rüster, D., Truyen, U., Homeier, T., 2013. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *Journal of Virological Methods* 193, 6–8.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.

V. DISKUSSION

Die Parvovirose des Hundes ist weltweit verbreitet und stellt die häufigste Viruskrankheit von Hunden dar (TRUYEN, 2006; DECARO et al., 2007a; NANDI et al., 2010). Betroffen sind vor allem Welpen, die durch Fehlen von Antikörpern nicht vor Erkrankung geschützt sind (STUDDERT et al., 1983; IRIS et al., 2010). Welpen sind zum Schutz vor Infektionskrankheiten, wie Parvovirose, auf die Aufnahme von MDA aus der Muttermilch angewiesen (POLLOCK und CARMICHAEL, 1982; O'BRIEN, 1994; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). MDA interagieren mit eindringenden CPV vor Ausbildung einer Virämie und verhindern damit die Verteilung von Virus im Körper und das Ausbrechen von klinischen Symptomen, oder mildern sie zumindest ab (CHAPPUIS, 1998; ELIA et al., 2005; GREENE und LEVY, 2012). Die Konzentration von MDA im Blut der Welpen und somit auch der Schutz vor Infektionserregern sinkt über die ersten Lebenswochen kontinuierlich, während sich das Immunsystem der Welpen langsam entwickelt (POLLOCK und CARMICHAEL, 1982; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Die Ausbildung der spezifischen Immunität der Welpen gegen CPV ist zeitlich nicht festgelegt, sondern vom Verhältnis zwischen noch bestehender MDA-Konzentration und der Konzentration des Pathogens oder Impfantigens abhängig (GREENE und LEVY, 2012). Konzentration und Dauer, mit der die MDA im Welpen zirkulieren, sind abhängig vom Antikörpertiter des Muttertiers. Je höher der Antikörpertiter im Muttertier, desto höher und länger anhaltend ist die Konzentration der MDA im Welpen. Die Halbwertszeit der MDA gegen CPV liegt bei 9,7 Tagen. Der Schutz von MDA gegen CPV kann bis zur 15. Lebenswoche andauern (CHAPPUIS, 1998; DAY, 2007; GREENE und LEVY, 2012), jedoch auch deutlich kürzer sein. Abhängig von der Konzentration der MDA sind die Welpen zwischen der 6. und 12. Lebenswoche immunkompetent (DAY, 2007), so dass das spezifische Immunsystem der Welpen Antikörper, beispielsweise durch Impfung, adäquat bilden und einen Schutz aufbauen kann. Man nimmt an, dass die Replikation von CPV im Welpen nach Erstkontakt mit dem Virus bei einem HI-Antikörpertiter von 1:80 zu verhindern ist. Die Replikation von Impfvirus wird jedoch in der Regel bereits bei einem HI-Titer von $< 1:10$ unterbunden. Dies bedeutet, dass der MDA-Titer irgendwann zwischen der 6. und 15. Lebenswoche so gering ist, dass

die Schutzwirkung nicht mehr ausreichend ist (GREENE und DECARO, 2012; GREENE und LEVY, 2012). Gleichzeitig sind jedoch noch immer so hohe Konzentrationen an MDA vorhanden, dass diese die Ausbildung eines aktiven Schutzes durch Bildung eigener Antikörper nach Impfung durch Interaktion mit dem Impfvirus verhindern können (CHAPPUIS, 1998; ELIA et al., 2005). Der Zeitraum, in dem die MDA keinen ausreichenden Schutz mehr bieten, jedoch mit der Impfung interagieren, wurde früher als „immunologische Lücke“ bezeichnet (CHAPPUIS, 1998). Während der „immunologischen Lücke“ sind die Welpen daher gefährdet, sich mit CPV anzustecken und Symptome der Parvovirose zu entwickeln (POLLOCK und CARMICHAEL, 1982; GODDARD und LEISEWITZ, 2010).

CPV wird hauptsächlich mit Kot ausgeschieden. Durch seine extreme Stabilität ist CPV in der Außenwelt über sehr lange Zeiträume von mehreren Monaten infektiös und stellt damit für empfängliche Hunde und Katzen ein hohes Infektionsrisiko dar (SAKNIMIT et al., 1988; HOSKINS, 1997; SMITH-CARR et al., 1997; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). CPV löst zwei Krankheitsbilder aus; die Krankheit kann sich als CPV-Enteritis oder CPV-Myokarditis manifestieren. Während Welpen über acht Wochen in der Regel eine CPV-Enteritis zeigen, ist die CPV-Myokarditis aufgrund der weltweiten Impfungen und natürlichen Boosterungen durch in der Umwelt befindliche CPV, und damit aufgrund der Übertragung von MDA des Muttertiers auf die Welpen, heutzutage nur noch selten (DECARO et al., 2005a; GODDARD und LEISEWITZ, 2010; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

Es gibt zwei Gründe, weshalb eine schnelle und zuverlässige Diagnose bei Parvovirose notwendig ist: zum Einen stellt die Parvovirose noch immer die häufigste Todesursache bei Welpen dar (MARULAPPA und KAPIL, 2009; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). An CPV-erkrankte Welpen müssen daher schnellstmöglich einer intensiven Therapie unterzogen werden, um den Krankheitsverlauf zu mildern und eine mögliche Todesfolge zu verhindern. Zum Anderen ist eine Diagnose notwendig, um die bei CPV erforderlichen Hygienemaßnahmen frühzeitig und strikt durchzuführen, um eine Verbreitung des Virus und eine Übertragung auf andere empfängliche Hunde und Katzen zu verhindern (LITSTER et al., 2012b). Es ist nicht immer einfach, die Diagnose „Parvovirose“ zu stellen. Die klinischen Veränderungen sind nicht

pathognomonisch und lassen lediglich einen klinischen Verdacht zu. Für die Diagnosestellung ist der Nachweis von CPV notwendig (GREENE und DECARO, 2012). Während die Bestimmung von Antikörpern für die Diagnose einer CPV-Infektion nicht geeignet ist (SCHMITZ et al., 2009; GREENE und DECARO, 2012), gibt es zum direkten Nachweis von CPV, CPV-DNA oder CPV-Antigen verschiedene Möglichkeiten. Die am häufigsten verwendeten Tests sind EM, VI, HA, ELISA und PCR (DESARIO et al., 2005; SCHMITZ et al., 2009). Beim direkten Erregernachweis ist ein positives Testergebnis beweisend, da die Anwesenheit von CPV oder CPV-Bestandteilen, wie CPV-DNA oder CPV-Antigen, nachgewiesen wird. Die Spezifität von VI, EM und HA ist sehr hoch, bei ELISA und PCR liegt sie sogar nahe bei 100 %; falsch positive Testergebnisse sind also nicht zu erwarten. Auch der SNAP[®] Parvo Test hat eine Spezifität von 98 % (SCHMITZ et al., 2009). Problematisch ist allerdings, dass der Antigen-ELISA nicht zwischen Feld- und Impfstamm unterscheiden kann und möglicherweise ein „falsch“-positives Ergebnis nach Impfung anzeigt (GREENE und DECARO, 2012). Die Ausscheidung von Impfvirus (modifizierte Lebendvaccine) kann einige Wochen andauern (DECARO et al., 2014). Schwierig ist dies besonders dann, wenn ein Welpen klinische Symptome einer CPV-Infektion zeigt, aber innerhalb der letzten drei Wochen geimpft wurde. Während die Symptome in einer solchen Situation in der Regel tatsächlich meist durch eine gleichzeitige Infektion mit Feldstamm im Impfzeitraum verursacht werden (DECARO et al., 2007b), können herkömmliche Methoden keine Aussage darüber treffen, ob eine Parvovirose tatsächlich vorliegt. In solchen Fällen kann mittels MGB-PCR eine CPV-Differenzierung zur Unterscheidung von Impf- und Feldstamm erfolgen (DECARO et al., 2006a; DECARO et al., 2006c; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012).

Die PCR, besonders seit Entwicklung der real-time-PCR, ist das Verfahren mit der höchsten Sensitivität und einer exzellenten Spezifität zum Nachweis von CPV. Sie muss jedoch in kommerziellen Laboren durchgeführt werden (DECARO et al., 2005b; DESARIO et al., 2005; DECARO und BUONAVOGLIA, 2012). ELISA-Verfahren sind in ihrer Sensitivität der PCR unterlegen, sind aber ebenfalls hoch spezifisch (KUFFER et al., 1995; SCHMITZ et al., 2009). Praxistaugliche Schnelltests auf ELISA-Basis zeigen innerhalb von Minuten oder wenigen Stunden ein Ergebnis und sind damit sehr gut für den

Einsatz in der Praxis geeignet. Der SNAP[®] Parvo Test ist einer dieser ELISA-basierenden Schnelltests und wird weltweit zur Diagnostik einer CPV-Infektion genutzt (DESARIO et al., 2005; SCHMITZ et al., 2009; DECARO et al., 2010; MARKOVICH et al., 2012). Vergleicht man die Ergebnisse verschiedener Studien, so fällt jedoch auf, dass die Angaben der Sensitivität mit 18 % (SCHMITZ et al., 2009) und 82 % (MARKOVICH et al., 2012) für diesen Schnelltest stark variieren und dass falsch-negative ELISA-Ergebnisse sehr häufig auftreten (DESARIO et al., 2005; SCHMITZ et al., 2009; MARKOVICH et al., 2012). Ein falsch-negatives ELISA-Ergebnis kann nicht nur zu einer Fehldiagnose und damit zu einer unzureichenden Behandlung verleiten. Nicht erkannte CPV-infizierte Welpen dienen außerdem als Übertragungs- und Infektionsquelle für andere Hunde und Katzen.

Bislang ist ungeklärt, worauf diese niedrige Sensitivität zurückzuführen ist und welche Parameter die Sensitivität beeinflussen. Das Ziel der zweiten Studie dieser Arbeit war daher, herauszufinden ob Zeitpunkt der Durchführung des Tests, klinische Symptome, Laborveränderungen, Viruslast im Darm oder Präsenz von Antikörpern in Serum und Kot einen Einfluss auf das Testergebnis dieses Antigen-ELISA haben. Weiterhin wurde untersucht, ob manche Virusstämme nicht mit dem Antigen-ELISA reagieren. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob Tiere mit falsch-negativem Antigen-ELISA Testergebnis einen milderen Verlauf und eine kürzere Virusausscheidung gegenüber positiv getesteten Hunden zeigen.

Die Studie bestand aus zwei Untersuchungsansätzen. Im ersten Teil wurde der Einfluss verschiedener klinischer und labordiagnostischer Parameter auf das Testergebnis des Antigen-ELISA am Tag der Einlieferung (Tag 0) untersucht. Im zweiten Teil sollte untersucht werden, ob Tiere mit falsch-negativem Testergebnis einen milderen und kürzeren Krankheitsverlauf sowie ein verändertes Virusausscheidungsverhalten zeigten. An Tag 0 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in Geschlecht, Rasse und Alter festgestellt. Tiere mit positivem Testergebnis hatten jedoch ein signifikant höheres Körpergewicht als Tiere mit falsch-negativem Testergebnis. Außerdem bestand ein signifikanter Unterschied in der Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt, an dem Besitzer erstmals Symptome beobachtet hatten und dem Zeitpunkt, zu dem die Tiere in der Klinik vorgestellt wurden und der Antigen-ELISA durchgeführt wurde. Hunde mit

positivem Antigen-ELISA wurden signifikant später (1,5 Tage) vorgestellt als Tiere mit falsch-negativem Testergebnis (1 Tag). Hunde mit positivem Antigen-ELISA hatten eine signifikant höhere Kotabsatzfrequenz. Darüber hinaus bestand kein signifikanter Unterschied in allen anderen klinischen und allen labordiagnostischen Parametern zwischen beiden Gruppen.

ELISA-positive Hunde hatten eine signifikant höhere Viruslast im Kot als Hunde mit falsch-negativem Antigen-ELISA. Während kein signifikanter Unterschied in der Menge der anti-CPV-Antikörper im Kot bestand, wurde bei ELISA-positiven Hunden ein signifikant niedrigerer anti-CPV-Antikörper-Titer im Serum nachgewiesen. Bei den Hunden, deren klinischer Verlauf untersucht wurde, bestand kein signifikanter Unterschied in klinischen Parametern, Verlauf und Mortalitätsrate zwischen Hunden beider Gruppen. ELISA-positive Tiere waren im Median nach sieben, ELISA-negative Tiere im Median nach acht Tagen vollständig genesen. Am Tag drei war die Anzahl der Virusausscheider in der ELISA-positiven Gruppe verglichen mit den ELISA-negativen Hunden signifikant höher, jedoch war an den späteren Untersuchungstagen kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen. Die Länge der Virusausscheidung ergab in beiden Gruppen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Die Virusausscheidung dauerte im Median in beiden Gruppen 13 Tage.

Die Sensitivität des SNAP[®] Parvo Tests in der vorliegenden Studie lag bei 49 %, was bedeutet, dass 41 von 80 Hunden ein falsch-negatives Antigen-ELISA Ergebnis hatten. Bis heute sind die Ursachen der hohen Anzahl falsch-negativer Testergebnisse des SNAP[®] Parvo Test ungeklärt.

Die wichtigste Theorie besteht wohl darin, dass die Viruslast im Kot zu niedrig ist, um ein positives Antigen-ELISA Ergebnis hervorzurufen und der Test dadurch falsch-negativ ausfällt (DESARIO et al., 2005). Mehrere Gründe erscheinen plausibel, weshalb die Viruslast im Darm niedrig sein könnte. Hunde mit Parvovirose werden häufig mit wässrigem, teils auch blutigem Durchfall vorgestellt (DECARO et al., 2005a). Eine Theorie spekuliert, dass eine wässrige Kotkonsistenz durch Verdünnung des Kots und letztlich damit auch des CPV-Gehalts pro Gramm Kot oder Kotwasser einen Effekt auf das Testergebnis haben könnte. Dabei wäre anzunehmen, dass Hunde mit einer schweren Form der Parvovirose eher wässrigen Durchfall zeigen und somit klinisch schwerer betroffene Hunde eher ein falsch-negatives Antigen-ELISA Ergebnis aufweisen

als weniger stark betroffene Hunde. Diese Theorie wird allerdings durch die vorliegende Studie nicht gestützt. Im Gegenteil, aufgrund der signifikant niedrigeren Kotabsatzfrequenz bei ELISA-negativen Hunden muss davon ausgegangen werden, dass ELISA-negative Hunde weniger schlimmen Durchfall und damit insgesamt mildere klinische Symptome zeigen als ELISA-positive Hunde, wenngleich auch in den anderen klinischen Parametern kein Unterschied festgestellt werden konnte. Auch im weiteren Krankheitsverlauf gab es keinen Unterschied in klinischen oder labordiagnostischen Parametern zwischen ELISA-positiven und ELISA-negativen Hunden.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass Hunde mit falsch-negativem Antigen-ELISA eine milde Form der Parvovirose durchlaufen. Möglicherweise haben diese Hunde keine ausreichende MDA-Konzentration, um sie vor der Ausbildung von Symptomen nach Infektion zu schützen, aber noch eine ausreichende MDA-Konzentration, um die Replikation von CPV zu schwächen. Denkbar wäre, dass auf die reduzierte Virusreplikation eine verminderte Virusausscheidung erfolgt und die Viruslast im Kot dadurch absinkt. DESARIO und Mitarbeiter (2005) beschrieben, dass die benötigte Virusmenge im Kot hoch sein muss, um den cut-off Wert des SNAP[®] Parvo Tests zu überschreiten und ein positives Testsignal zu erzeugen (DESARIO et al., 2005). Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützt. Durch Quantifizierung der ausgeschiedenen CPV-Partikel konnte nachgewiesen werden, dass Hunde mit positivem Antigen-ELISA eine signifikant höhere Anzahl von DNA-Kopien im Kot hatten, also eine höhere Viruslast, als Hunde mit falsch-negativem Antigen-ELISA. Demnach scheint die Viruslast im Darm ein ganz entscheidender Faktor für die Entstehung von falsch-negativen Antigen-ELISA-Ergebnissen und damit ein wesentlicher Grund für die niedrige Sensitivität des SNAP[®] Parvo Test zu sein.

Ein weiterer Grund für eine niedrige Viruslast im Kot, abgesehen von reduzierter Ausscheidung, könnte eine Reduktion von frei verfügbarem CPV sein. CPV aus dem Kot interagiert mit den Antikörpern im Antigen-ELISA. Hierzu muss aber das im Kot befindliche CPV frei vorliegen und darf nicht anderweitig an Antikörper gebunden werden. Bei der CPV-Enteritis kommt es zu einer Protein-Verlust-Enteropathie; neben Albumin gehen auch Globuline über die zerstörte Darmschranke verloren (MACARTNEY et al., 1984; KEMPF et al., 2010). Es ist

also denkbar, dass so auch anti-CPV-Antikörper in den Darm verloren gehen. Diese anti-CPV-Antikörper wiederum könnten dann an freies CPV im Kot binden, wodurch die Menge von ungebundenem, für den Antigen-ELISA verfügbaren CPV reduziert wäre (DESARIO et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass die Menge der Antikörper im Kot mit der Menge der Antikörper im Serum korreliert und dass Hunde mit einer schweren Protein-Verlust-Enteropathie, neben anderen Serumproteinen, auch anti-CPV Antikörper in den Darm verlieren. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie gestützt. ELISA-positive Hunde hatten im Serum eine signifikant niedrigere Menge an Antikörpern als ELISA-negative Hunde. Jedoch reflektiert dieses Ergebnis nicht das Ergebnis der Antikörper-Untersuchung aus dem Kot. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Menge von Antikörpern im Kot zwischen Hunden beider Gruppen festgestellt werden. Antikörper im Kot sind jedoch schwierig nachzuweisen. Nur bei acht von 31 ELISA-positiven Hunden und bei sieben von 21 ELISA-negativen Hunden wurden überhaupt anti-CPV-Antikörper im Kot nachgewiesen. Möglicherweise war die Anzahl der Hunde mit auswertbaren Antikörpertitern zu gering, um eine statistische Signifikanz zu erzielen. Somit bleibt die Theorie bestehen, dass auch das Vorhandensein von anti-CPV-Antikörpern im Kot das Ergebnis des Antigen-ELISA beeinflusst.

Ein weiterer möglicher Grund für falsch-negative Testergebnisse besteht darin, dass der Antigen-ELISA mutierte Virusfeldstämme möglicherweise nicht erkennen kann. Besonders CPV 2c, die jüngste, aber bereits weltweit verbreitete Variante, stand im Verdacht, von herkömmlichen Schnelltests nicht nachgewiesen zu werden. DECARO und Mitarbeiter (2010) konnten in ihrer Studie jedoch zeigen, dass der SNAP[®] Parvo Test CPV 2c ebenso zuverlässig erkennt wie CPV 2a und CPV 2b (DECARO et al., 2010). In der vorliegenden Studie wurden zufällig ausgewählte Kotproben von je zehn ELISA-positiven und zehn ELISA-negativen Hunden sequenziert. In 19 Kotproben wurde CPV 2a nachgewiesen, eine Kotprobe wies die Mutation Glu-426 auf und wurde damit als CPV 2c charakterisiert. Diese Kotprobe war jedoch im Antigen-ELISA positiv. Der SNAP[®] Parvo Test kann also CPV 2c nachweisen. Das Ergebnis der vorliegenden Studie unterstützt damit die Ergebnisse der Studie von DECARO und Mitarbeitern (DECARO et al., 2010). Feldstammmutationen scheinen offenbar keinen Einfluss auf die Ergebnisse des SNAP[®] Parvo Tests zu haben.

Eine andere mögliche Ursache für falsch-negative Testergebnisse könnte im Zeitpunkt der Testung liegen. CPV wird ab dem vierten bis sechsten Tag nach Infektion ausgeschieden (MEUNIER et al., 1985b). Die Ausscheidung dauert bis zu mehreren Wochen an (DECARO et al., 2005a). Die maximale Virusausscheidung erfolgt innerhalb der ersten Tage nach Infektion (SCHMITZ et al., 2009; GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Möglicherweise hat also der Zeitpunkt der Testung einen Einfluss auf das Testergebnis. Tatsächlich bestand bei ELISA-positiven Tieren eine signifikant längere Zeitspanne zwischen Auftreten von klinischen Symptomen und Vorstellung in der Klinik (und damit auch bis zur Durchführung des Tests) als bei ELISA-negativen Hunden. Dieser signifikante Unterschied betrug allerdings nur einen halben Tag. Es ist aus klinischer Sicht daher nur schwer vorstellbar, dass dieses Ergebnis tatsächlich Relevanz haben sollte. Dennoch sollten Hunde, bei denen klinisch und anamnestisch der Verdacht auf Parvovirose besteht und die ein negatives Antigen-ELISA Testergebnis aufweisen, zu einem späteren Zeitpunkt nachgetestet werden, falls keine PCR verfügbar ist.

In der vorliegenden Studie zeigten Hunde beider Gruppen keinen Unterschied im Signalement, jedoch hatten ELISA-positive Hunde ein signifikant höheres Körpergewicht als ELISA-negative. Obwohl für einige Rassen, wie den Rottweiler oder Dobermann, eine Rasseprädisposition für Parvovirose beschrieben ist (GLICKMAN et al., 1985; GODDARD und LEISEWITZ, 2010), konnte in der vorliegenden Studie keine Rasseprädisposition von an Parvovirose erkrankten Hunden oder eine Rasseprädisposition im Hinblick auf das Antigen-ELISA-Ergebnis nachgewiesen werden. Möglicherweise spiegelt der Unterschied im Körpergewicht dennoch eine Rasseprädisposition wieder, da der signifikante Gewichtsunterschied aufgrund des gleichen durchschnittlichen Alters der eingeschlossenen Hunde nicht mit einem altersbedingt veränderten Gewicht, sondern eher rassebedingt zu erklären ist. Wenn auch keine Rasseprädisposition in dieser Studie nachgewiesen werden konnte, kann eine Rasseprädisposition-bedingt erhöhte Virusreplikation und vermehrte Virusausscheidung nicht ausgeschlossen werden.

Grundsätzlich sind alle Welpen, die keine ausreichenden anti-CPV-Antikörpertiter besitzen, gefährdet, klinische Symptome einer CPV-Infektion zu entwickeln (STUDDERT et al., 1983; IRIS et al., 2010). Sie sind nach der Geburt durch die

Aufnahme von MDA aus der Muttermilch geschützt (POLLOCK und CARMICHAEL, 1982; O'BRIEN, 1994; GODDARD und LEISEWITZ, 2010), der Schutz verliert sich jedoch durch den Abbau der MDA im Blut der Welpen aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit und durch ein starkes Absinken der MDA-Konzentration in der Muttermilch irgendwann zwischen der 6. und 15. Lebenswoche (GREENE und DECARO, 2012; GREENE und LEVY, 2012).

Während der Zeit, in der keine ausreichenden Antikörperkonzentrationen durch MDA oder durch Impfung zum Schutz des Welpen vorliegen, werden dem unspezifischen, angeborenen Immunsystem wichtige Funktionen in der Abwehr von Infektionserregern zugeschrieben (TOMAN et al., 2002; DAY, 2007). Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems besteht vor allem darin, in den Körper eindringende Pathogene schnellstmöglich zu erkennen und erfolgreich abzuwehren. Die Zellen des angeborenen Immunsystems nutzen eine Vielzahl von Rezeptoren, um diese Pathogene schnellstmöglich zu erkennen. Diese Rezeptoren sind Proteine, die spezifisch-Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) erkennen und binden, weshalb sie als Pattern Recognition Receptors (PRR) bezeichnet werden (MEDZHITOV und JANEWAY, 1997). Durch das Erkennen und Binden von PAMP, in diesem Fall CPV, werden Signalketten aktiviert, die zur Transkription von Genen führen und für Zytokine mit antiviraler Wirkung kodieren. Dadurch entwickelt sich nicht nur in bereits infizierten Zellen, sondern auch benachbarten, nicht infizierten Zellen ein antiviraler Zustand (JANEWAY und MEDZHITOV, 2002; YOKOTA et al., 2010; RAYKOV et al., 2013).

Es gibt zahlreiche Studien, die den Einfluss von CPV auf das erworbene Immunsystem untersuchten (CHAPPUIS, 1998; TOMAN et al., 2002; SCHULTZ et al., 2010), jedoch wird über die Interaktion zwischen angeborenem Immunsystem und Parvoviren nur sehr wenig berichtet (PAGLINO et al., 2014). Die Mechanismen, mit denen Parvoviren dem angeborenen Immunsystem entkommen können, sind nur unzureichend untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass die initiale, antivirale Immunantwort eine essentielle Rolle für den Ausgang von viralen Infektionen spielt (ALPER et al., 2008).

Der beste Schutz vor Parvovirose besteht in der Prophylaxe, das heißt, in Impfungen. Um die noch sehr jungen Welpen mit MDA aus der Muttermilch versorgen zu können, muss das Muttertier ausreichend anti-CPV-Antikörper

besitzen. Die Impfung der Muttertiere ist daher eine wichtige Maßnahme. Nachfolgend sollten dann die Welpen ab einem Alter von 6 Wochen geimpft werden (DE MARI et al., 2003; GREENE und LEVY, 2012). Trotzdem sind die Welpen dem Risiko einer Erkrankung an CPV ausgesetzt und eine antivirale Therapie ist oft notwendig (DE MARI et al., 2003). Interferone (IFN) modulieren zahlreiche zelluläre und immunologische Funktionen, haben einen antiviralen Effekt und interferieren mit der Virusreplikation (SAMUEL, 1991; ISHIWATA et al., 1998). Rekombinantes felines Interferon omega (rfIFN- ω) wird mithilfe eines Baculovirus als Vector aus Seidenspinnerraupe-Larven gewonnen. Das rfIFN- ω wird zu den Typ-1-IFN gezählt (KUWABARA et al., 2006). Die Typ-1-IFN werden von dendritischen Zellen gebildet und induzieren antivirale Mechanismen, wie Produktion antiviraler Proteine, Sensibilisierung von Virus-infizierten Zellen zur Apoptose und Stimulation von antiviralen Effektorzellen, wie natürliche Killerzellen und zytotoxische Zellen (STETSON und MEDZHITOV, 2006). In Placebo-kontrollierten Studien bei CPV-infizierten Welpen konnte rfIFN- ω eine Abmilderung der klinischen Symptome sowie eine Reduktion der Mortalitätsrate erzielen (ISHIWATA et al., 1998; DE MARI et al., 2003; KUWABARA et al., 2006).

Die IFN- α und IFN- β zeigen die gleichen Eigenschaften wie rfIFN- ω . Sie gehören ebenfalls zu den Typ-1-IFN. In einer *in-vitro*-Studie wurde nachgewiesen, dass der Paramunitätsinducer PIND-ORF die Induktion dieser IFN aus dendritischen Zellen vermittelt (SIEGEMUND et al., 2009). Paramunitätsinducer werden aufgrund ihrer immunogenen Eigenschaften seit Jahrzehnten in der Tiermedizin eingesetzt, um das unspezifische Immunsystem zu stimulieren (MAYR, 1982; MAYR und MAYR, 1999), da inaktivierte Pockenviren durch Stimulation des unspezifischen Immunsystems eine starke Reaktion hervorrufen können (GHERARDI und ESTEBAN, 2005; BURGERS et al., 2008). Die Angaben über den Effekt von PIND-ORF auf Zellen des angeborenen Immunsystems variieren aber. In einer *in-vitro*-Studie an porcinen Leukozyten aus heparinisertem Blut wurde die Stimulation von PIND-ORF auf frühe (Phagozytose, oxidativer burst, Aktivität natürlicher Killerzellen) und späte Effekte (Induktion von Il-2, IFN- α und IFN- γ) des unspezifischen Immunsystems untersucht. PIND-ORF konnte zwar CD4⁺-T-Helferzellen aktivieren, deren Aktivität zu einer erhöhten Freisetzung der Zytokine Il-2, IFN- α und IFN- γ führte, war allerdings nicht in der

Lage, die Rate von Phagozytose und oxidativem burst in den porcinen Leukozyten zu verstärken (FACHINGER et al., 2000). In einer *in-vitro*-Studie beim Hund jedoch konnte eine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate in Monozyten und Makrophagen sowie eine signifikante Verstärkung des oxidativen bursts ausgelöst werden (SCHUTZE et al., 2009). Außerdem wurde eine PIND-ORF-induzierte Aktivierung und Proliferation von T-Zellen *in-vitro* beschrieben (SCHUTZE et al., 2009).

Bis heute werden Paramunitätsinducer bei verschiedenen Tierarten und einer Vielzahl von Krankheitsbildern eingesetzt. Sowohl akute, als auch chronische Krankheiten, Infektionskrankheiten sowie Tumorkrankheiten wurden mit Paramunitätsinducern prophylaktisch, metaphylaktisch und therapeutisch behandelt (MAYR und BUTTNER, 1984; MAYR und MAYR, 1999). Placebo-kontrollierte Wirksamkeitsstudien liegen jedoch nur in geringer Zahl vor (KLIMENTOWSKI et al., 1992; BLOCK et al., 1997; ZIEBELL et al., 1997b; KYRIAKIS et al., 1998). Hauptsächlich werden positive Wirkungen von PIND-ORF in kontrollierten Studien über Prophylaxe beschrieben (ZIEBELL et al., 1997a; ZIEBELL et al., 1997b; KYRIAKIS et al., 1998; RYAN et al., 2010), es gibt jedoch auch wenige kontrollierte Studien über den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von PIND-ORF, beispielsweise bei der infektiösen Rhinotracheitis des Rindes und der enzootischen Pneumonie des Schweines (MAYR und BRUNNER, 1980; MAYR et al., 1991; CASTRUCCI et al., 2000). Die vorliegende Studie ist die erste klinische Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie über den therapeutischen Einsatz von Paramunitätsinducern beim Hund.

Um den Effekt von PIND-ORF auf den Heilungsverlauf von Parvovirose zu ermitteln, wurde in dieser Studie untersucht, ob der therapeutische Einsatz bei an Parvovirose erkrankten Hunden einen positiven Effekt auf die Schwere der Symptome, den Verlauf der Krankheit und die Mortalitätsrate hat. Der Einsatz von PIND-ORF hatte jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss auf Heilungsverlauf, Mortalitätsrate und Virusausscheidung. Außerdem konnte an keinem der untersuchten Tage während des stationären Aufenthaltes und bei der Kontrolle an Tag 14 ein signifikanter Unterschied in klinischen und labordiagnostischen Parametern zwischen Hunden der PIND-ORF- und Hunden der Placebo-Gruppe festgestellt werden.

Innerhalb der PIND-ORF-Gruppe war allerdings ein signifikanter Anstieg der Lymphozyten zwischen Tag 7 und Tag 0 darstellbar, der innerhalb der Placebogruppe nicht auftrat. Beim Vergleich der Lymphozytenwerte zwischen beiden Gruppen bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Lymphozytenzahl. In einer *in-vitro*-Studie über den Einfluss von PIND-ORF auf porcine Leukozyten wurde wenige Tage nach Stimulation mit PIND-ORF eine Proliferation von Lymphoblasten und ein gleichzeitiger Anstieg von Zytokinen (Interleukin (IL)-2, IFN- α und IFN- γ) nachgewiesen. Die Zytokinproduktion war auf T-Helferzellen zurückzuführen, die durch PIND-ORF aktiviert worden waren (FACHINGER et al., 2000). Tatsächlich wurde auch in der vorliegenden Studie ein signifikanter Anstieg von Lymphozyten zwischen Tag 7 und Tag 0 festgestellt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine von PIND-ORF verursachte unspezifische Stimulation der Lymphozyten. Im Vergleich mit der Placebo-Gruppe war der Unterschied in der Lymphozytenzahl jedoch nicht signifikant. Der Einfluss von PIND-ORF auf Lymphozyten erscheint daher klinisch nicht relevant. Möglicherweise würde der PIND-ORF-vermittelte Effekt auf die Lymphozyten bei der caninen Parvovirose zu einem späteren Zeitpunkt eine größere Rolle spielen, da auch *in-vitro* ein Anstieg der IFN-Produktion durch T-Helferzellen erst nach fünf Tagen festgestellt werden konnte (FACHINGER et al., 2000). Möglicherweise könnte daher auch klinisch sein späterer Effekt sichtbar werden. Bei Parvovirose handelt es sich jedoch um eine akute Infektionskrankheit, die Tiere genesen in der Regel innerhalb einer Woche (IRIS et al., 2010). Ein durch PIND-ORF vermittelter Effekt, der erst nach etwa fünf Tagen auftritt, würde demnach zu spät eintreten. PIND-ORF scheint daher keinen therapeutischen Nutzen für den Einsatz bei Parvovirose zu haben. Denkbar wäre allerdings ein prophylaktischer Nutzen von PIND-ORF. PIND-ORF müsste prophylaktisch etwa eine Woche vor Infektion mit CPV erfolgen. Da eine Ansteckung mit CPV jedoch nicht vorhergesagt werden kann, ist diese Fragestellung nichtig.

Während des stationären Aufenthaltes gab es zwischen den Hunden der PIND-ORF und der Placebo-Gruppe zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied in den klinischen Parametern. Allerdings konnte zwischen Tag 7 und Tag 0 sowie Tag 14 und Tag 0 ein signifikanter Unterschied innerhalb der jeweiligen Gruppe in allen klinischen Parametern festgestellt werden. Da die

Tiere beider Gruppen innerhalb einer vergleichbaren Zeit gesund wurden, ist auch hinsichtlich des klinischen Verlaufs und der Symptomschwere nicht von einem Einfluss durch den Paramunitätsinducer PIND-ORF auszugehen. Die Genesung der Tiere ist daher viel eher auf den natürlichen Verlauf der Parvovirose zurückzuführen, unterstützt durch eine intensive, individuelle Therapie während des stationären Aufenthaltes.

Während bei allen Hunden aus der PIND-ORF-Gruppe eine vollständig Genesung eintrat, mussten drei Hunde aus der Placebo-Gruppe aufgrund bevorstehender Agonie euthanasiert werden. Dennoch bestand in der Mortalitätsrate zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Möglicherweise wäre bei einer höheren Probandenzahl ein signifikanter Unterschied in der Mortalitätsrate festzustellen gewesen. Um darüber eine Aussage treffen zu können, hätte allerdings eine sehr hohe Tierzahl untersucht werden müssen.

Es bestand auch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Virusausscheidung; Hunde beider Gruppen schieden CPV bis Tag 13 (Median) aus. Eine Limitation der Studie besteht darin, dass die Untersuchung auf Virusausscheidung nicht täglich erfolgte, sondern nur an vier ausgewählten Tagen. Eine genaue Aussage über den tatsächlich letzten Tag der Virusausscheidung der einzelnen Hunde konnte daher aufgrund des Studiendesigns nicht erfolgen. Jedoch konnte für beide Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Virusausscheidung zwischen Tag 14 und Tag 0 festgestellt werden. Da dies sowohl in der PIND-ORF-Gruppe als auch in der Placebo-Gruppe festzustellen war, ist dieser Unterschied am wahrscheinlichsten auf den natürlichen Verlauf der Parvovirose zurückzuführen. Ein Einfluss des Paramunitätsinducers ist daher nicht anzunehmen. Weiterhin limitierend ist, dass keine weiteren Kotuntersuchungen nach Tag 14 erfolgt waren. Ein möglicher, späterer Einfluss von PIND-ORF auf die Virusausscheidung nach dieser Zeit ist also nicht auszuschließen. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nach Tag 14 ist jedoch nur schwerlich anzunehmen, da bereits 80 % der Tiere aus der Placebo-Gruppe und 90 % der Hunde aus der PIND-ORF-Gruppe vor Tag 14 mit der Virusausscheidung abgeschlossen hatten. Ein nachträglicher Effekt durch PIND-ORF erscheint daher sehr unwahrscheinlich.

Neben den bereits genannten Limitationen besteht die Hauptlimitation der Studie in der Verabreichung von Medikamenten zusätzlich zum Standardprotokoll. Alle

Hunde der Studie wurden neben dem Studienmedikament mit einem standardisierten Behandlungsprotokoll therapiert. Es war jedoch bei einigen Hunden aus ethischen Gründen erforderlich, dass dieses Standardprotokoll individuell durch Gabe zusätzlicher Medikamente erweitert wurde. Somit wurden die 38 in die Studie eingeschlossenen Hunde nicht ausschließlich nach einem Standardprotokoll behandelt. Die Erweiterung des Standardprotokolls verlief jedoch nach strikten Regeln und Indikationen. Um trotzdem eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden zusätzliche Medikamente nur bei bestimmten Laborwertabweichungen oder klinischen Parametern verabreicht. Weder die Anzahl der Medikamente pro Hund, noch die Anzahl der Tiere, die mit zusätzlichen Medikamenten behandelt wurden, einschließlich der drei euthanasierten Hunde, ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Eine weitere Limitation bestand in der im Standardprotokoll enthaltenen Verabreichung von anti-CPV-Antikörpern. Möglicherweise könnte dadurch ein klinischer Effekt von PIND-ORF unsichtbar geblieben sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie erlauben daher keine Antwort auf die Frage, ob Hunde mit milderem klinischen Verlauf und daher ambulanter, nicht intensiver Therapie oder Hunde, die nicht mit anti-CPV-Antikörpern behandelt werden, von einer Behandlung mit PIND-ORF profitieren würden. Die Ergebnisse der Studie lassen jedoch den Schluss zu, dass der Paramunitätsinducer PIND-ORF keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf, die Mortalität und die Virusausscheidung hatte. Möglicherweise kann von einem unspezifischen Effekt auf die Lymphozyten ausgegangen werden, da bei Tieren der PIND-ORF-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Lymphozytenzahl zwischen Tag 7 und Tag 0 festzustellen war; dieser Anstieg war jedoch nicht von klinischer Relevanz, zumal zwischen beiden Gruppen kein Unterschied in der Lymphozytenzahl bestand.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

An CPV-Infektion erkranken vor allem Welpen, bei denen die MDA-Konzentration unter die schützende Grenze abgefallen ist. Bei Welpen spielt das angeborene, unspezifische Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Abwehr. Dieses kann durch Paramunitätsinducer stimuliert werden. Das Ziel der vorliegenden Studie war daher, den Effekt des Paramunitätsinducers PIND-ORF auf den Heilungsverlauf der Parvovirose zu untersuchen. In die Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie wurden 38 CPV PCR-positive Hunde mit klinischen Symptomen der Parvovirose eingeschlossen, bis zur Genesung stationär aufgenommen und an Tag 14 nachuntersucht. Neben dem Studienmedikament (PIND-ORF oder Placebo) wurden die Hunde mit einem Standardprotokoll behandelt; eine zusätzliche Medikation erfolgte nur innerhalb strikter Kriterien. Sieben klinische Parameter sowie Laborparameter wurden zwischen beiden Gruppen verglichen. Eine PCR auf CPV zur Beurteilung der Virusausscheidung erfolgte an Tag 0, 3, 7 und 14. Weder bei Einlieferung, noch während des Untersuchungszeitraumes konnte ein signifikanter Unterschied in klinischen und labordiagnostischen Parametern, Mortalitätsrate, individueller Zusatztherapie und Virusausscheidung festgestellt werden. Lediglich in der PIND-ORF-Gruppe war ein signifikanter Anstieg der Lymphozyten zwischen Tag 0 und Tag 7 nachweisbar. Nach sieben Tagen (Median) waren die Tiere vollständig genesen; die Virusausscheidung beider Gruppen lag bei 13 Tagen (Median). Der Einsatz von PIND-ORF bei der Behandlung von Parvovirose erzielt demnach keinen klinisch relevanten Nutzen.

Die Übertragung von CPV erfolgt hauptsächlich oronasal über den Kontakt zu CPV-haltigem Kot. Die Diagnose wird am besten durch direkten Erregernachweis gestellt. Tests auf Antigen-ELISA-Basis, wie der SNAP[®] Parvo Test, werden weltweit eingesetzt; falsch-negative Ergebnisse sind jedoch häufig. Die Gründe hierfür sind bislang ungeklärt. Ein Ziel der Doktorarbeit war daher, den Einfluss klinischer und labordiagnostischer Parameter auf das Ergebnis des SNAP[®] Parvo Test zu ermitteln und herauszufinden, ob ein falsch-negatives Antigen-ELISA-Ergebnis mit einem unterschiedlichen klinischen Verlauf zusammenhängt. Die zweite Studie bestand aus zwei Teilen. Im ersten Teil wurden 80 an Parvovirose erkrankte Hunde mit positivem CPV-PCR-Ergebnis je nach Schnelltestergebnis

einer von zwei Gruppen (ELISA-positive oder ELISA-negative Hunde) zugeteilt. Signalement, Dauer der klinischen Symptome bis zur Einlieferung, klinische Parameter und Laborparameter sowie Viruslast im Darm, anti-CPV-Antikörper aus Serum, Kot und CPV-Sequenzierung wurden untersucht. Im zweiten Teil dieser Studie wurden Krankheitsverlauf und CPV-Ausscheidungsverhalten zwischen beiden Gruppen evaluiert. Von 80 CPV-PCR-positiven Hunden hatten nur 39 Hunde ein positives Antigen-ELISA Ergebnis. Hunde mit positivem Schnelltest waren signifikant später in der Klinik vorgestellt und getestet worden und zeigten ein signifikant höheres Körpergewicht als ELISA-negative Hunde. ELISA-positive Hunde hatten eine signifikant höhere Kotabsatzfrequenz und eine signifikant höhere Viruslast im Darm sowie signifikant niedrigere Mengen von anti-CPV-Antikörpern im Serum. Die CPV-Sequenzierung zufällig ausgewählter Kotproben ergab keinen Unterschied zwischen zehn ELISA-positiven und zehn ELISA-negativen Kotproben. Die Sequenzierung bestätigte einerseits, dass CPV 2c vom SNAP[®] Parvo Test erkannt wird, andererseits wird deutlich, dass Einzelmutationen in der Aminosäuresequenz des CPV-Strukturproteins keine Auswirkungen auf das Antigen-ELISA-Ergebnis zu haben scheinen. In Heilungsverlauf, Mortalität und Dauer der Virusausscheidung bestand zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Lediglich an Tag 3 gab es in der ELISA-positiven Gruppe eine signifikant höhere Anzahl an Virusausscheidern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Paramunitätsinducer PIND-ORF keinen klinisch relevanten Effekt auf die Behandlung und den Verlauf von Parvovirose bei intensiv behandelten Hunden hat. Der SNAP[®] Parvo Test hat eine niedrige Sensitivität, verdächtige Tiere sollten unbedingt mit PCR nachuntersucht werden. Ein wichtiger Grund hierfür ist eine zu niedrige Viruslast im Kot. Die Rolle von Antikörpern in Kot ist noch nicht geklärt.

VII. SUMMARY

CPV infection is a severe and common disease particularly affecting young dogs. Puppies have a high risk to develop the disease after maternally MDA have waned. The innate immunity is the first line of defense against virus infections and plays a critical role in determining the outcome of infectious diseases, such as CPV infection. Paramunity inducers stimulate the immune system by enhancing early mechanisms of the innate immunity.

The aim of the first study was to determine the effects of the paramunity inducer PIND-ORF on the treatment of CPV-infection and on the course of disease. The study was performed as a placebo-controlled double-blinded clinical trial including 38 dogs with clinical signs of CPV infection and positive faecal CPV PCR result. All dogs were hospitalised until recovery and examined daily during hospitalization and at a recheck on day 14. A standardized symptomatic treatment protocol was accomplished by additional medication supplied following specific criteria in cases of fatal disease. Comparison of clinical and laboratory parameters was performed daily during hospitalization and on day 14. For evaluation of virus shedding, a faecal CPV PCR was performed on days 0, 3, 7, and 14. There was no significant difference in any clinical or laboratory parameter, mortality rate, additional treatment, and virus shedding. However, in the PIND-ORF group only, a significant increase in the lymphocyte count was detectable comparing day 7 to day 0. Dogs of both groups recovered within seven days in median, virus shedding occurred until day 13 (median). PIND-ORF was not able to accelerate recovery and improve clinical and laboratory variables in dogs with CPV-infection treated with intensive care. Also, no effect on virus shedding was detectable.

Main source of infection is faecal virus shedding with CPV being transmitted by oral-faecal route. Detection of faecal antigen is the method of choice to diagnose CPV infection. Faecal antigen ELISA such as the SNAP[®] parvo antigen test, are popular and used worldwide. However, sensitivity of this fecal antigen ELISA is low. Yet, the reasons for this are unclear. Thus, the aim of the second study was to investigate whether clinical and laboratory variables influence the fecal antigen ELISA thereby leading to false-negative test results and second, whether a false-

negative test result would correlate with a less severe course of disease.

The study comprised two parts. In the first part, 80 dogs with confirmed CPV infection showing clinical signs and a positive faecal CPV PCR were included into the study. Assignment to a group was performed according to their faecal antigen ELISA result. Clinical signs, laboratory variables, faecal CPV load, and faecal and blood CPV antibodies were compared between both groups. In the second part, course of disease (time until recovery, mortality rate, and CPV shedding) was compared in 38 hospitalised dogs.

Out of 80 dogs, only 39 dogs had a positive fecal antigen ELISA result. There was no significant difference between ELISA-positive and ELISA-negative dogs in gender, age, and breed. ELISA-positive dogs had a significantly higher bodyweight than ELISA-negative dogs. ELISA-positive dogs had a significantly longer duration of clinical signs prior to admission. Comparing clinical signs, there was a significantly higher frequency of defecation in ELISA-positive dogs. There was no significant difference in any other clinical parameter. ELISA-positive dogs had a significantly higher CPV load in faeces. In serum, ELISA-positive dogs had significantly lower antibody titres.

CPV DNA sequencing data revealed no difference between ELISA-positive and ELISA-negative dogs. The fecal antigen ELISA does detect CPV 2c. Also, several amino acid changes occurring within the CPV VP2 structure protein did not lead to alterations of virus strains. There was no significant difference in CPV sequencing data between ELISA-positive and ELISA-negative dogs.

The fecal antigen ELISA result was not associated with a difference in time until recovery, mortality rate, and virus shedding. However, on day 3, there was a significantly increased number of dogs shedding CPV in the ELISA-positive group only.

Conclusions of both studies are that the paramunity inducers failed to show an effect on treatment and outcome of intensively treated dogs with CPV infection. The sensitivity of the SNAP[®] parvo antigen test is low. Main reason is the low faecal CPV load, the role of faecal antibodies, however, remains unclear.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Agungpriyono DR, Uchida K, Tabaru H, Yamaguchi R, Tateyama S. Subacute massive necrotizing myocarditis by canine parvovirus type 2 infection with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy. *Vet Pathol* 1999; 36: 77-80.

Alper S, Laws R, Lackford B, Boyd WA, Dunlap P, Freedman JH, Schwartz DA. Identification of innate immunity genes and pathways using a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7016-21.

Appel MJ, Scott FW, Carmichael LE. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec* 1979; 105: 156-9.

Bastianello SS. Canine parvovirus myocarditis: clinical signs and pathological lesions encountered in natural cases. *J S Afr Vet Assoc* 1981; 52: 105-8.

Beare JM. Orf (Contagious Pustular Dermatitis of Sheep). *Ulster Med J* 1956; 25: 18-24.

Block A, Hartmann K, Lutz H, Kraft W. [Placebo-controlled double-blind study on the efficacy of a paramunity inducer in the treatment of naturally FeLV-infected cats]. *Tierarztl Prax* 1997; 25: 261-6.

Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol* 2001; 82: 3021-5.

Burgers WA, Shephard E, Monroe JE, Greenhalgh T, Binder A, Hurter E, Van Harmelen JH, Williamson C, Williamson AL. Construction, characterization, and immunogenicity of a multigene modified vaccinia Ankara (MVA) vaccine based on HIV type 1 subtype C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24: 195-206.

Burtonboy G, Coignoul F, Delferriere N, Pastoret PP. Canine hemorrhagic enteritis: detection of viral particles by electron microscopy. *Arch Virol* 1979; 61: 1-11.

Büttner M. Direkter Virusnachweis. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7 edn. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke Verlag 2002: 130-1.

Cargnelutti JF, Masuda EK, Martins M, Diel DG, Rock DL, Weiblen R, Flores EF. Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice. *Microb Pathog* 2011; 50: 56-62.

Carman PS, Povey RC. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery. *Res Vet Sci* 1985; 38: 134-40.

Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res* 1980; 41: 784-91.

Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response. *Cornell Vet* 1983; 73: 13-29.

Castrucci G, Osburn BI, Frigeri F, Ferrari M, Salvatori D, Lo Dico M, Barreca F. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000; 23: 163-73.

Chappuis G. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine* 1998; 16: 1468-72.

Cohn LA, Rewerts JM, McCaw D, Boon GD, Wagner-Mann C, Lothrop CD, Jr. Plasma granulocyte colony-stimulating factor concentrations in neutropenic, parvoviral enteritis-infected puppies. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 581-6.

Crawford PC, Sellon RK. Canine parvovirus. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th edn. Ettinger SJ, Feldmann EC, eds.: Saunders Elsevier

2010: 958-60.

Day MJ. Immune system development in the dog and cat. *J Comp Pathol* 2007; 137 Suppl 1: S10-5.

De Mari K, Maynard L, Eun HM, Lebreux B. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet Rec* 2003; 152: 105-8.

Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci D, Lorusso E, Buonavoglia C. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest* 2005a; 17: 133-8.

Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 2005b; 105: 19-28.

Decaro N, Elia G, Desario C, Roperto S, Martella V, Campolo M, Lorusso A, Cavalli A, Buonavoglia C. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J Virol Methods* 2006a; 136: 65-70.

Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, Cirone F, Lorusso E, Lucente MS, Narcisi D, Scalia P, Buonavoglia C. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods* 2006b; 133: 92-9.

Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Buonavoglia D, Bellacicco AL, Tempesta M, Buonavoglia C. Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *J Virol Methods* 2006c; 138: 10-6.

Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C. The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 2007a; 13: 1222-4.

Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, Martella V, Buonavoglia C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 2007b; 25: 1161-6.

Decaro N, Desario C, Beall MJ, Cavalli A, Campolo M, Dimarco AA, Amorisco F, Colaianni ML, Buonavoglia C. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *Vet J* 2010; 184: 373-5.

Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol* 2012; 155: 1-12.

Decaro N, Crescenzo G, Desario C, Cavalli A, Losurdo M, Colaianni ML, Ventrella G, Rizzi S, Aulicino S, Lucente MS, Buonavoglia C. Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine* 2014; 32: 3850-3.

Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods* 2005; 126: 179-85.

Drane DP, Hamilton RC, Cox JC. Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus. *Vet Microbiol* 1994; 41: 293-302.

Drozina G, Kohoutek J, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Expression of MHC II genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 290: 147-70.

Duffy A, Dow S, Ogilvie G, Rao S, Hackett T. Hematologic improvement in dogs with parvovirus infection treated with recombinant canine granulocyte-colony

stimulating factor. *J Vet Pharmacol Ther* 2010; 33: 352-6.

Elia G, Cavalli A, Cirone F, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia D, Tempesta M. Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52: 320-2.

Esfandiari J, Klingeborn B. A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 145-53.

Fachinger V, Schlapp T, Strube W, Schmeer N, Saalmuller A. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J Virol* 2000; 74: 7943-51.

Frandsen J, Enslow M, Bowen AR. Orf parapoxvirus infection from a cat scratch. *Dermatol Online J* 2011; 17: 9.

Gherardi MM, Esteban M. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol* 2005; 86: 2925-36.

Glickman LT, Domanski LM, Patronek GJ, Visintainer F. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 589-94.

Goddard A, Leisewitz AL, Christopher MM, Duncan NM, Becker PJ. Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 309-16.

Goddard A, Leisewitz AL. Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 1041-53.

Gray LK, Crawford PC, Levy JK, Dubovi EJ. Comparison of two assays for detection of antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in dogs admitted to a Florida animal shelter. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 240: 1084-7.

Greene CE, Decaro N. Canine viral enteritis. In: Infectious disease of the dog and cat, 4th edn. Greene CE, ed.: Elsevier Saunders 2012: 67-75.

Greene CE, Levy JK. Immunoprophylaxis. In: Infectious diseases of the dog and cat, 4 edn. Greene CE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders 2012: 1163-205.

Haig DM, Mercer AA. Ovine diseases. *Orf. Vet Res* 1998; 29: 311-26.

Hammond MM, Timoney PJ. An electron microscopic study of viruses associated with canine gastroenteritis. *Cornell Vet* 1983; 73: 82-97.

Hayes MA, Russell RG, Babiuk LA. Sudden death in young dogs with myocarditis caused by parvovirus. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 174: 1197-203.

Hoskins JD. Update on canine parvoviral enteritis. *Vet Med* 1997; 92: 694-709.

Iris K, Leontides LS, Mylonakis ME, Adamama-Moraitou K, Rallis T, Koutinas AF. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci* 2010; 89: 174-8.

Ishiwata K, Minagawa T, Kajimoto T. Clinical effects of the recombinant feline interferon-omega on experimental parvovirus infection in beagle dogs. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 911-7.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.

Kapil S, Cooper E, Lamm C, Murray B, Rezabek G, Johnston L, 3rd, Campbell G, Johnson B. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 4044-7.

Kempf C, Schulz BS, Strauch C, Sauter-Louis C, Truyen U, Hartmann K. [Virus detection, clinical signs, and laboratory findings in dogs with acute hemorrhagic

diarrhea: a retrospective study of 935 cases]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2010; 38: 79-86.

Kitchen M, Muller H, Zobl A, Windisch A, Romani N, Huemer H. ORF virus infection in a hunter in Western Austria, presumably transmitted by game. *Acta Derm Venereol* 2014; 94: 212-4.

Klimentowski S, Kolbl S, Fischer M. [The effectiveness of paramunization for the control of feline coryza]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1992; 105: 253-9.

Kuffer M, Schunck B, Hartmann K, Kraft W. [Rapid enzymatic test for diagnosis of parvovirus infections in dogs]. *Tierarztl Prax* 1995; 23: 415-7.

Kumar M, Nandi S. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *J Virol Methods* 2010; 169: 198-201.

Kumar M, Nandi S, Chidri S. Development of a polyclonal antibody-based AC-ELISA and its comparison with PCR for diagnosis of canine parvovirus infection. *Virol Sin* 2010; 25: 352-60.

Kuwabara M, Nariai Y, Horiuchi Y, Nakajima Y, Yamaguchi Y, Horioka E, Kawanabe M, Kubo T, Yukawa M, Sakai T. Immunological effects of recombinant feline interferon-omega (KT-80) administration in the dog. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 637-41.

Kyriakis SC, Tzika ED, Lyras DN, Tsinas AC, Saoulidis K, Sarris K. Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. *Res Vet Sci* 1998; 64: 187-90.

Lappin MR. Laboratory diagnosis of infectious disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine*. Ettinger SJ, Feldman EC, eds.: Saunders Elsevier

2010: 847-53.

Lenghaus C, Studdert MJ, Finnie JW. Acute and chronic canine parvovirus myocarditis following intrauterine inoculation. *Aust Vet J* 1980; 56: 465-8.

Lenghaus C, Studdert MJ. Acute and chronic viral myocarditis. Acute diffuse nonsuppurative myocarditis and residual myocardial scarring following infection with canine parvovirus. *Am J Pathol* 1984; 115: 316-9.

Litster A, Nichols J, Volpe A. Prevalence of positive antibody test results for canine parvovirus (CPV) and canine distemper virus (CDV) and response to modified live vaccination against CPV and CDV in dogs entering animal shelters. *Vet Microbiol* 2012a; 157: 86-90.

Litster AL, Pressler B, Volpe A, Dubovi E. Accuracy of a point-of-care ELISA test kit for predicting the presence of protective canine parvovirus and canine distemper virus antibody concentrations in dogs. *Vet J* 2012b; 193: 363-6.

Luff PR, Wood GW, Hebert CN, Thornton DH. Canine parvovirus serology: a collaborative assay. *Vet Rec* 1987; 120: 270-3.

Macartney L, McCandlish IA, Thompson H, Cornwell HJ. Canine parvovirus enteritis 1: Clinical, haematological and pathological features of experimental infection. *Vet Rec* 1984; 115: 201-10.

Markovich JE, Stucker KM, Carr AH, Harbison CE, Scarlett JM, Parrish CR. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 66-72.

Marulappa SY, Kapil S. Simple tests for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 127-31.

Mathys A, Mueller R, Pedersen NC, Theilen GH. Hemagglutination with formalin-fixed erythrocytes for detection of canine parvovirus. *Am J Vet Res* 1983; 44: 150-1.

Mayr A, Brunner R. [Effectiveness of para-immunization for the control of piglet breeding losses and enzootic pneumonia of swine (piglet influenza)]. *Zentralbl Veterinarmed B* 1980; 27: 589-98.

Mayr A. [Paramunity and paramunization]. *Zentralbl Veterinarmed B* 1982; 29: 5-23.

Mayr A, Buttner M. [New insights into the foundations of paramunity and paramunization]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1984; 97: 429-35.

Mayr A, Mayr B. A new concept in prophylaxis and therapy: paramunization by poxvirus inducers. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 1999; 19: 91-8.

Mayr A. [Development of of non-immunising, paraspecific vaccine from attenuated pox viruses: a new type of vaccine]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2001; 114: 184-7.

Mayr B, Deininger S, Buttner M. Treatment of chronic stomatitis of cats by local paramunization with PIND-ORF. *Zentralbl Veterinarmed B* 1991; 38: 78-80.

McKeever DJ, Jenkinson DM, Hutchison G, Reid HW. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *J Comp Pathol* 1988; 99: 317-28.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-8.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, Slauson DO. Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups. *Vet Pathol* 1984; 21: 509-15.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, Lanieu ME, Slauson DO. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Vet Pathol* 1985a; 22: 617-24.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, Slauson DO. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet Pathol* 1985b; 22: 60-71.

Mochizuki M, San Gabriel MC, Nakatani H, Yoshida M, Harasawa R. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci* 1993; 55: 60-3.

Mulvey JJ, Bech-Nielsen S, Haskins ME, Jezyk PF, Taylor HW, Eugster AK. Myocarditis induced by parvoviral infection in weanling pups in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 177: 695-8.

Nandi S, Chidri S, Kumar M, Chauhan RS. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Res Vet Sci* 2010; 88: 169-71.

Neuerer FF, Horlacher K, Truyen U, Hartmann K. Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 247-51.

O'Brien SE. Serologic response of pups to the low-passage, modified-live canine parvovirus-2 component in a combination vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 204: 1207-9.

Oh JS, Ha GW, Cho YS, Kim MJ, An DJ, Hwang KK, Lim YK, Park BK, Kang B, Song DS. One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 520-4.

Otto CM, Drobatz KJ, Soter C. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 65-

70.

Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, Russell MW. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 1500-4.

Paglino JC, Andres W, van den Pol AN. Autonomous parvoviruses neither stimulate nor are inhibited by the type I interferon response in human normal or cancer cells. *J Virol* 2014; 88: 4932-42.

Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 1985; 230: 1046-8.

Parrish CR, Have P, Foreyt WJ, Evermann JF, Senda M, Carmichael LE. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol* 1988; 69: 1111-6.

Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol* 1991; 65: 6544-52.

Parrish CR. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres Clin Haematol* 1995; 8: 57-71.

Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, D'Angelo M, Durigon EL. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 2000; 75: 127-33.

Pollock RV, Carmichael LE. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 37-42.

Potgieter LN, Jones JB, Patton CS, Webb-Martin TA. Experimental parvovirus infection in dogs. *Can J Comp Med* 1981; 45: 212-6.

Raykov Z, Grekova SP, Horlein R, Leuchs B, Giese T, Giese NA, Rommelaere J, Zawatzky R, Daeffler L. TLR-9 contributes to the antiviral innate immune sensing of rodent parvoviruses MVMp and H-1PV by normal human immune cells. *PLoS One* 2013; 8: e55086.

Rewerts JM, McCaw DL, Cohn LA, Wagner-Mann C, Harrington D. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor for treatment of puppies with neutropenia secondary to canine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 991-2.

Rimmelzwaan GF, Juntti N, Klingeborn B, Groen J, UytdeHaag FG, Osterhaus AD. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on monoclonal antibodies for the serology and antigen detection in canine parvovirus infections. *Vet Q* 1990; 12: 14-20.

Rimmelzwaan GF, Groen J, Egberink H, Borst GH, UytdeHaag FG, Osterhaus AD. The use of enzyme-linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dogs in The Netherlands. *Vet Microbiol* 1991; 26: 25-40.

Roberts J, Camacho Z. Oxidation of NADPH by polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *Nature* 1967; 216: 606-7.

Robinson WF, Wilcox GE, Flower RL. Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Vet Pathol* 1980; 17: 589-99.

Ryan C, Giguere S, Fultz L, Long MT, Crawford PC. Effects of two commercially available immunostimulants on leukocyte function of foals following ex vivo exposure to *Rhodococcus equi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 138: 198-205.

Saknimit M, Inatsuki I, Sugiyama Y, Yagami K. Virucidal efficacy of physico-chemical treatments against coronaviruses and parvoviruses of laboratory animals.

Jikken Dobutsu 1988; 37: 341-5.

Samuel CE. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* 1991; 183: 1-11.

Sarma DP, Cox M, Walter P, Crisler W, Huerter C. A man with an umbilicated papule of the hand: what is your diagnosis? *Case Rep Med* 2010; 2010: 524021.

Schmitz S, Coenen C, König M, Thiel HJ, Neiger R. Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21: 344-5.

Schultz RD, Thiel B, Mukhtar E, Sharp P, Larson LJ. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J Comp Pathol* 2010; 142 Suppl 1: S102-8.

Schunck B, Kraft W, Truyen U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods* 1995; 55: 427-33.

Schutze N, Raue R, Buttner M, Alber G. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet Microbiol* 2009; 137: 260-7.

Schutze N, Raue R, Buttner M, Kohler G, McInnes CJ, Alber G. Specific antibodies induced by inactivated parapoxvirus ovis potentially enhance oxidative burst in canine blood polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet Microbiol* 2010; 140: 81-91.

Senda M, Hirayama N, Yamamoto H, Kurata K. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 1986; 12: 1-6.

Senda M, Hirayama N, Itoh O, Yamamoto H. Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *J Gen Virol* 1988; 69: 349-54.

Siegemund S, Hartl A, von Buttlar H, Dautel F, Raue R, Freudenberg MA, Fejer G, Buttner M, Kohler G, Kirschning CJ, Sparwasser T, Alber G. Conventional bone marrow-derived dendritic cells contribute to toll-like receptor-independent production of alpha/beta interferon in response to inactivated parapoxvirus ovis. *J Virol* 2009; 83: 9411-22.

Smith-Carr S, Macintire DK, Swango LJ. Canine Parvovirus. Part I. Pathogenesis and vaccination. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1997; 19: 125-33.

Stern A. Pathology in practice. Enteritis. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 236: 45-7.

Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity* 2006; 25: 373-81.

Streck AF, Ruster D, Truyen U, Homeier T. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *J Virol Methods* 2013; 193: 6-8.

Studdert MJ, Oda C, Riegl CA, Roston RP. Aspects of the diagnosis, pathogenesis and epidemiology of canine parvovirus. *Aust Vet J* 1983; 60: 197-200.

Teramoto YA, Mildbrand MM, Carlson J, Collins JK, Winston S. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination, and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 373-8.

Thomson GW, Gagnon AN. Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent. *Can Vet J* 1978; 19: 346.

Tizard I, Ni Y. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 54-60.

Toman M, Faldyna M, Knotigova P, Pokorova D, Sinkora J. Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Vet Immunol*

Immunopathol 2002; 87: 321-6.

Touihri L, Bouzid I, Daoud R, Desario C, El Goulli AF, Decaro N, Ghorbel A, Buonavoglia C, Bahloul C. Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. *Virus Genes* 2009; 38: 249-58.

Truyen U, Parrish CR. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J Virol* 1992; 66: 5399-408.

Truyen U. Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines? *Vet Microbiol* 2006; 117: 9-13.

Tryland M, Klein J, Berger T, Josefsen TD, das Neves CG, Oksanen A, Asbakk K. Experimental parapoxvirus infection (contagious ecthyma) in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Vet Microbiol* 2013; 162: 499-506.

Turan E, Yesilova Y, Ucmak D. A case of orf (ecthyma contagiosum) with multiple lesions. *J Pak Med Assoc* 2013; 63: 786-7.

Twark L, Dodds WJ. Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 1021-4.

Van den Broek AH. Serum protein electrophoresis in canine parvovirus enteritis. *Br Vet J* 1990; 146: 255-9.

Waner T, Naveh A, Wudovsky I, Carmichael LE. Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 427-32.

Waner T, Mazar S, Nachmias E, Keren-Kornblatt E, Harrus S. Evaluation of a dot

ELISA kit for measuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. *Vet Rec* 2003; 152: 588-91.

Wilson JJ, Neame PB, Kelton JG. Infection-induced thrombocytopenia. *Semin Thromb Hemost* 1982; 8: 217-33.

Yokota S, Okabayashi T, Fujii N. The battle between virus and host: modulation of Toll-like receptor signaling pathways by virus infection. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 184328.

Ziebell KL, Kretzdorn D, Auer S, Failing K, Schmeer N. The use of Baypamun N in crowding-associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 2-week-old veal calves. *Zentralbl Veterinarmed B* 1997a; 44: 415-24.

Ziebell KL, Steinmann H, Kretzdorn D, Schlapp T, Failing K, Schmeer N. The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4-10 month old horses. *Zentralbl Veterinarmed B* 1997b; 44: 529-36.

IX. DANKSAGUNG

Der Weg dieser Dissertation war lang und steinig. Ohne die mir von vielen verschiedenen Seiten gewährte Unterstützung wäre sie nicht möglich gewesen. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Professor Katrin Hartmann. Sie hat nie den Glauben und Enthusiasmus in die vorliegende Arbeit und in mich verloren und mir besonders bei der Verfassung des schriftlichen Werks ein Arbeitsumfeld geschaffen, das das Schreiben unglaublich effektiv gemacht und sogar mit Freude verbunden hat. Ein ganz großes Dankeschön geht außerdem an Professor Ralf Müller, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir bei der statistischen Auswertung immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ebenso bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Karin Weber, die mir wertvolle Tipps für die Laborarbeit gegeben hat. Bei Frau Dr. Stephanie Speck vom Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig möchte ich mich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Ihr Zutun kam einem Katalysator gleich. Danke auch an Professor Uwe Truyen für die Zusammenarbeit im Labor (Leipzig).

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Kollegen an der „MTK“; in diesem familiären Arbeitsklima war es trotz intensivster Arbeit tatsächlich ein Vergnügen, „meine“ Welpen rund um die Uhr zu versorgen und nach schwerer Krankheit gesund in ihr hoffentlich langes und schönes Vierbeinerleben zu entlassen. Hierbei möchte ich mich besonders bei Max Einöder, Michel Hauswurz, Imre Greff und Norbert Klaus für die Unterstützung bei der Pflege der Welpen bedanken. Mein großer Dank gilt außerdem all meinen Oberärzten für ihre fachliche Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich hier Dr. Stefan Unterer, der ein wunderbarer Oberarzt ist. Eine wichtige moralische Stütze in Freud und Leid bei dieser Arbeit waren außerdem meine Freundinnen und damaligen Kolleginnen Dr. Bianca Stützer, Dr. Nina Justa und Dr. Marlene Rost, die immer für mich da waren und sind.

Der größte Dank gebührt jedoch meiner Familie, meiner Schwester Tina und ganz besonders meinen Eltern. Sie haben mit mir gelitten und mit mir gejubelt. Sie haben mich vor, während und nach der Doktorarbeit auf jegliche Art unterstützt, mir Mut gemacht und den Rücken gestärkt. Sie stehen immer zu 100 % hinter mir und sind immer für mich da. Sie sind wunderbar.