

Die Bedeutung des caninen Circovirus beim akuten  
hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom des Hundes

von Alexandra Anderson, geb. Rhöse

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

Die Bedeutung des caninen Circovirus beim akuten  
hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom des Hundes

von Alexandra Anderson, geb. Rhöse

aus Leinefelde-Worbis

München 2017

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis

Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

**Tag der Promotion: 29.07.2017**

Meiner Familie

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Genus <i>Circovirus</i>.....</b>	<b>2</b>
1.1.	Morphologie und Klassifikation .....	2
1.2.	Krankheitsbilder .....	4
<b>2.</b>	<b>Das canine <i>Circovirus</i> .....</b>	<b>9</b>
2.1.	Genomorganisation .....	10
2.2.	Krankheitsbild .....	11
2.3.	Histopathologische Veränderungen .....	17
2.4.	Übertragung und Epidemiologie .....	17
2.5.	Diagnostik .....	18
2.5.1.	Nukleinsäurenachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion .....	18
2.5.2.	In-situ-Hybridisierung .....	19
2.5.3.	Virusnachweis mittels Elektronenmikroskopie.....	19
2.5.4.	Virusnachweis mittels Virusisolierung .....	20
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>21</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>27</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>36</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>38</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>40</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>56</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AHDS	Akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom
bzw.	Beziehungsweise
BFDV	<i>Beak and feather disease virus</i> (Erreger der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien)
CaCV	<i>Canary circovirus</i> (Kanarien-Circovirus)
CaCV-1	Canine circovirus genotype 1 (Canines Circovirus Genotyp 1)
CanineCV	<i>Canine circovirus</i> (Canines Circovirus)
CDV	<i>Canine distemper virus</i> (Canines Staupevirus)
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CPV-2	Canine parvovirus type 2 (Canines Parvovirus Typ 2)
Ct	Cycle threshold (Zyklusschwellenwert)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DogCV	<i>Dog circovirus</i> (Hunde-Circovirus)
DuCV	<i>Duck circovirus</i> (Enten-Circovirus)
et al.	Et alii (Und andere)
FiCV	<i>Finch circovirus</i> (Finken-Circovirus)
GoCV	<i>Goose circovirus</i> (Gänse-Circovirus)
GuCV	<i>Gull circovirus</i> (Möwen-Circovirus)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Internationales Komitee

	für Virustaxonomie)
ISH	In-situ-Hybridisierung
IR	Intergenic region (Nicht-translatierte Region)
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
ORF	Open reading frame (Leserahmen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PCV-1	<i>Porcine circovirus 1</i> (Porzines Circovirus 1)
PCV-2	<i>Porcine circovirus 2</i> (Porzines Circovirus 2)
PDNS	Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (Porzines Dermatitis Nephropathie Syndrom)
PiCV	<i>Pigeon circovirus</i> (Tauben-Circovirus)
PMWS	Postweaning multisystemic wasting syndrome (Kümmersyndrom der Absatzferkel)
PPV	<i>Porcine parvovirus</i> (Porzines Parvovirus)
RaCV	<i>Raven circovirus</i> (Raben-Circovirus)
spp.	Species pluralis
ss	Single strand (Einzelstrang)
StCV	<i>Starling circovirus</i> (Star-Circovirus)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
ZfiCV	<i>Zebra finch circovirus</i> (Zebrafinken-Circovirus)

## I. EINLEITUNG

Das Krankheitsbild des akuten, blutigen Durchfalls beim Hund ist ein häufiger Vorstellungsgrund in der tierärztlichen Praxis und kann durch verschiedene infektiöse und nicht-infektiöse Ursachen hervorgerufen werden. Trotz Ausschöpfen diagnostischer Möglichkeiten bleibt die Frage nach dem Auslöser häufig unbeantwortet. Das Krankheitsbild wird in diesem Fall als „Akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom“ (AHDS) bezeichnet (UNTERER et al., 2014). Obwohl das zuvor als „Hämorrhagische Gastroenteritis“ bezeichnete Syndrom bereits in den 1970er Jahren beschrieben wurde (BURROWS, 1977), ist seine Ätiologie bislang unzureichend geklärt. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) am AHDS beteiligt ist (UNTERER et al., 2014). Es ist jedoch unklar, ob die Überwucherung der intestinalen Mikrobiota durch *C. perfringens* den primären Auslöser des Krankheitsgeschehens darstellt. Eine virale Infektion mit sekundärer bakterieller Überwucherung durch *C. perfringens* wäre eine mögliche Erklärung für den akuten Krankheitsverlauf und die beschriebenen Epithelläsionen des Dünndarms beim AHDS.

Das canine Circovirus (CanineCV) wurde im Jahr 2012 erstmals identifiziert (KAPOOR et al., 2012) und als Auslöser von hämorrhagischem Durchfall und Erbrechen bei einem Hund beschrieben (LI et al., 2013). Es folgten weitere Berichte, bei denen ein Zusammenhang zwischen dem CanineCV und akuten gastrointestinalen Störungen beim Hund vermutet wurden (DECARO et al., 2014; HSU et al., 2016; THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016). Im Jahr 2015 wurde das CanineCV offiziell vom International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) als neue Virusspezies beim Hund anerkannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des CanineCV beim AHDS zu untersuchen. Hierzu wurde die Prävalenz des CanineCV in Kotproben von am AHDS erkrankten Hunden, klinisch gesunden Kontrolltieren und Hunden, die an einer Parvovirose litten, verglichen. Ein Vergleich des klinischen Verlaufes zwischen am AHDS erkrankten Hunden mit und ohne Nachweis des CanineCV sollte einen Aufschluss über die klinische Relevanz dieser viralen Infektion geben.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Genus *Circovirus*

Die Familie *Circoviridae* (lat. *circulus*: Kreis) umfasst die zwei vom ICTV anerkannten Gattungen *Circovirus* und *Cyclovirus*. Bis zum Jahre 2016 zählte statt dem *Cyclovirus* die Gattung *Gyrovirus* zur Familie *Circoviridae* (PRINGLE, 1999). Der Genus *Gyrovirus* mit seinem einzigen Vertreter, dem *Chicken anemia virus*, wird nun der Familie *Anelloviridae* zugeordnet (ROSARIO et al., 2017).

#### 1.1. Morphologie und Klassifikation

Der Name *Circovirus* lässt sich vom englischen Begriff „**circular conformation**“ anhand der Genomstruktur ableiten (BIAGINI et al., 2012). Alle Vertreter der *Circoviren* sind unbehüllte Viren, die sich durch ein Genom aus einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (ssDNA) auszeichnen. Das virale Genom der *Circoviren* besitzt eine Größe von 1,7 bis 2,3 Kilobasen (TODD et al., 2005). Die Virionen weisen eine ikosaedrische Symmetrie auf (CROWTHER et al., 2003) und haben einen Durchmesser von circa 12 bis 21 Nanometern (nm) (CROWTHER et al., 2003; BIAGINI et al., 2012). *Circoviren* zählen damit zu den bislang kleinsten, sich autonom in Säugetierzellen vermehrenden Viren (TISCHER et al., 1982; BIAGINI et al., 2012).

Den *Circoviren* werden aktuell 27 Spezies zugeordnet (siehe Tabelle 1) (ROSARIO et al., 2017). Bis zum Jahre 2010 glaubte man, dass lediglich die porzinen *Circoviren* in der Lage sind, Säugetiere zu infizieren (TODD et al., 2005; ROSARIO et al., 2017). Im Jahr 1974 wurde das *Porcine circovirus* erstmals als picornavirus-ähnlicher Kontaminant in unbeimpften Kulturen der Schweinenieren-Zelllinie PK/15 beschrieben (TISCHER et al., 1974). Später wurde es als neues, unbehülltes, kleines, ikosaedrisches Virus mit einer zirkulären ssDNA charakterisiert (TISCHER et al., 1982) und der Familie *Circoviridae* zugeordnet (LUKERT et al., 1995). Das bei kümmernden Ferkeln neu beschriebene Krankheitsbild „postweaning multisystemic wasting syndrome“ (PMWS) wurde mit dem Auftreten von porzinen *Circoviren* in Zusammenhang gebracht (CLARK, 1997; HARDING, 1997). Es kam zu einer Unterteilung zwischen dem *Porcine*

*circovirus 1* (PCV-1), das als apathogen eingestuft wurde (TISCHER et al., 1986; ALLAN et al., 1995) und dem *Porcine circovirus 2* (PCV-2), das verschiedene Krankheitsbilder beim Schwein hervorrufen kann (ALLAN et al., 1998a; MEEHAN et al., 1998).

Die Genomsequenz des CanineCV wurde erstmals in Serumproben verschiedener Hunde im Jahre 2012 entdeckt und als Canine circovirus genotype 1 (CaCV-1) bezeichnet (KAPOOR et al., 2012). Dies bedeutete erstmalig den Nachweis von Circoviren bei einem anderen Säugetier außer dem Schwein (KAPOOR et al., 2012). Zur gleichen Zeit konnte unabhängig von dieser Entdeckung ein canines Circovirus in Gewebeproben eines Hundes nachgewiesen werden, der mit progressivem Erbrechen und Durchfall mit Hämatochezie im Veterinary Medical Teaching Hospital der Universität von Kalifornien in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) vorgestellt wurde (LI et al., 2013). Zudem gelang die Isolierung und die Sequenzierung des CanineCV aus Serum- und Kotproben verschiedener anderer Hunden (LI et al., 2013). Es erfolgte die Benennung zu *Dog circovirus* (DogCV), um eine Verwechslung mit *Canary circovirus*, *Canine calicivirus* und *Capsicum chlorosis virus*, welche durch die Abkürzung „CaCV“ entstehen könnte, zu vermeiden (LI et al., 2013). Im Jahr 2015 wurde das CanineCV vom ICTV als offizielles Mitglied der Familie *Circoviridae* anerkannt. Um die Abkürzungen der Viren innerhalb der Familie zu vereinheitlichen, wurde die Bezeichnung „CanineCV“ festgelegt.

Der Genus *Circovirus* enthält zudem eine Reihe von aviären Spezies, wie das *Beak and feather disease virus* (BFDV) (PASS und PERRY, 1984; RITCHIE et al., 1989), das bei mehr als 60 Papageienarten vorkommt (TODD, 2004). Des Weiteren werden das *Pigeon circovirus* (PiCV) (WOODS et al., 1993; MANKERTZ et al., 2000; TODD et al., 2001a), *Canary circovirus* (CaCV) (GOLDSMITH, 1995; PHENIX et al., 2001; TODD et al., 2001b) und *Goose circovirus* (GoCV) (SOIKE et al., 1999; TODD et al., 2001a) der Gruppe zugeordnet. In den nachfolgenden Jahren kamen das *Starling circovirus* (StCV) (JOHNE et al., 2006), *Duck circovirus* (DuCV) (HATTERMANN et al., 2003; SOIKE et al., 2004), *Swan circovirus* (SwCV) (HALAMI et al., 2008), *Finch circovirus* (FiCV) (MYSORE et al., 1995; SHIVAPRASAD et al., 2004; TODD et al., 2007) und *Gull circovirus* (GuCV) (TWENTYMAN et al., 1999; TODD et al., 2007) hinzu. Im Jahr 2006 gelang STEWART und Mitarbeitern der Nachweis von Circoviren bei Neuhollandkrähen

mit Federveränderungen (STEWART et al., 2006). Es erfolgte eine Benennung zum *Raven circovirus* (RaCV) (BIAGINI et al., 2012). Zudem konnten bei Zebrafinken mit Immunsuppression und erhöhter Mortalitätsrate Circoviren (*Zebra finch circovirus*, ZfiCV) als Pathogen identifiziert werden (RINDER et al., 2015; RINDER et al., 2016).

Auch bei anderen Tierspezies, wie Fischen (Barbe, Katfisch) (LORINCZ et al., 2011; LORINCZ et al., 2012) Fledermäusen (LI et al., 2010a; GE et al., 2011; WU et al., 2012; HE et al., 2013; LIMA et al., 2015; WU et al., 2016) und Nerzen (LIAN et al., 2014), konnten Circoviren nachgewiesen werden. Jedoch war es bislang nicht möglich bei allen neu entdeckten Spezies einen definitiven Wirt nachzuweisen. In diesen Fällen wurde bei der Namensgebung das Wort „associated“ verwendet (ROSARIO et al., 2017).

In den Stuhlproben von Menschen und Schimpansen, wie auch in Muskelfleischproben verschiedener Nutztiere (Ziegen, Schafe, Rinder, Hühner, Kamele) wurden vielfältige zirkuläre DNA-Genome von Viren entschlüsselt. Ein Teil der aufgefundenen Spezies wurde dem Genus *Cyclovirus* zugeordnet (LI et al., 2010b). Aktuell umfasst dieser Genus 43 Spezies (ROSARIO et al., 2017).

Die Beschreibung der neu entdeckten Virusgenome innerhalb der Familie *Circoviridae* verkörpert damit die Weiterentwicklung dieser Viren. Diese wird vermutlich durch eine Anpassung an die Evolution ihrer Wirtsspezies hervorgerufen. Es ist jedoch auch denkbar, dass es aufgrund einer Übertragung zwischen den verschiedenen Wirten zu einer Weiterentwicklung dieser Viren kommt (DELWART und LI, 2012). Möglicherweise geht sogar eine zoonotische Gefahr von Circo- und Cycloviren aus (LI et al., 2010b), da eine Übertragung von PCV-2 zwischen experimentell infizierten und nicht-infizierten Schweinen durch Verzehr von rohem, infiziertem Fleisch nachgewiesen werden konnte (OPRIESSNIG et al., 2009).

## 1.2. Krankheitsbilder

Abhängig von der betroffenen Tierart, kann sich eine Infektion mit Circoviren in verschiedenen Krankheitsbildern äußern (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Krankheitsbilder der verschiedenen Spezies des Genus *Circovirus***

Spezies	Akronym	Wirt	Erstbeschreibung/ Charakterisierung	Symptome
<i>Barbel circovirus</i>	BarCV	Barbe (Fisch)	Lorincz et al., 2011	Erhöhte Mortalität
<i>Bat associated circovirus 1–8</i>	BatACV-1 bis BatACV-8	Fledermaus	Wu et al., 2012; He et al., 2013; Lima et al., 2015; Wu et al., 2016	Unbekannt
<i>Beak and feather disease virus</i>	BFDV	Papageien-artige	Pass & Perry, 1984; Ritchie et al., 1989	Schnabel-und Federkrankheit der Papageien
<i>Canary circovirus</i>	CaCV	Kanarienvogel	Goldsmith, 1995; Phenix et al., 2001; Todd et al., 2001b	Anorexie, Lethargie, erhöhte Mortalität, Federveränderungen, umfangsvermehrtes Abdomen
<i>Canine circovirus</i>	CanineCV	Hund	Kapoor, 2012; Li et al. 2013	Gastrointestinale Störungen, Vaskulitis, Blutungen
<i>Chimpanzee associated circovirus 1</i>	ChimpACV-1	Schimpanse	Li et al., 2010b	Unbekannt
<i>Duck circovirus</i>	DuCV	Ente	Hatterman et al., 2003; Soike et al., 2004	Befiederungsstörungen, Kümern
<i>European catfish circovirus</i>	EcatfishCV	Welsartige	Lorincz et al., 2012	Erhöhte Mortalität, Gastroenteritis, Hautveränderungen
<i>Finch circovirus</i>	FiCV	Fink	Mysore et al., 1995; Shivaprasad et al., 2004	Immunsuppression, Federverlust, Lebernekrose
<i>Goose circovirus</i>	GoCV	Gans	Soike et al., 1999; Todd et al., 2001b	Wachstumsstörungen Federveränderungen, erhöhte Verluste
<i>Gull circovirus</i>	GuCV	Möwe	Twentyman et al., 1999; Todd et al., 2007	Erhöhte Mortalität in Verbindung mit Immunsuppression
<i>Human associated circovirus 1</i>	HuACV-1	Mensch	Li et al., 2010b	Unbekannt
<i>Mink circovirus</i>	MiCV	Nerz	Lian et al., 2014	Durchfall, Anorexie, erhöhte Mortalität
<i>Pigeon circovirus</i>	PiCV	Taube	Woods et al., 1993; Mankertz et al., 2000	Jungtaubenkrankheit
<i>Porcine circovirus 1</i>	PCV-1	Schwein	Tischer et al., 1974; Tischer et al., 1982	Apathogen
<i>Porcine circovirus 2</i>	PCV-2	Schwein	Ellis et al., 1998; Hamel et al., 1998	PCVD
<i>Raven circovirus</i>	RaCV	Krähen	Stewart et al., 2006	Federveränderungen analog zu BFDV
<i>Starling circovirus</i>	StCV	Star	Johne et al., 2006	Unbekannt
<i>Swan circovirus</i>	SwCV	(Höcker-) Schwan	Halami et al., 2008	Akutes Versterben
<i>Zebra finch circovirus</i>	ZfiCV	Zebrafink	Rinder et al., 2015; Rinder et al., 2016	Immunsuppression, erhöhte Mortalität

Aufgrund ihres sehr kleinen Genoms und ihrem eingeschränkten Vermögen Proteine selber zu codieren, sind Circoviren stark auf die Maschinerie der DNA-Replikation ihres Wirtes angewiesen, weswegen sie sich am besten in sich schnell teilenden Zellen vermehren können (TODD, 2000).

Bei Infektionen mit dem PCV-2, dem BFDV, dem PiCV und anderen aviären Circoviren kommt es zu einer Zerstörung lymphatischen Gewebes, die zu einer ausgedehnten lymphozytären Depletion führt (TODD, 2000). Zentrales Charakteristikum ist die daraus resultierende Immunsuppression und die einhergehende Erhöhung der Anfälligkeit für Sekundärinfektionen mit Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen, die das Krankheitsbild entscheidend beeinflussen (TODD, 2000).

Eine Infektion mit dem PCV-2 kann zu verschiedenen Krankheitsbildern führen, die als „porcine circovirus diseases“ zusammengefasst werden (SEGALES, 2012). Obwohl serologische Studien zeigen, dass das PCV-2 weltweit bei Schweinen nachgewiesen werden kann, ist die Prävalenz der klinisch manifesten Erkrankung verhältnismäßig gering (SEGALES et al., 2005; SEGALES, 2012). Somit scheint die subklinische Verlaufsform, „PCV-2 subclinical infection“, die häufigste Manifestation einer Infektion mit dem PCV-2 darzustellen (SEGALES, 2012). Die betroffenen Tiere können zwar subtile Symptome wie eine verminderte Gewichtszunahme zeigen, in der Regel sind jedoch keinerlei andere klinische Anzeichen festzustellen (SEGALES, 2012). Die Symptome der „PCV-2 systemic disease“ (auch als PMWS bezeichnet) sind unspezifisch und sehr variabel (CHAE, 2004). Am häufigsten betroffen sind Jungtiere im Alter von fünf bis zwölf Wochen (ALLAN und ELLIS, 2000). Sie zeigen Kümern, Dyspnoe, vergrößerte Lymphknoten, Blässe, Ikterus und profus wässrigen Durchfall (HARDING und CLARK, 1997). Schlechte Haltungsbedingungen und Stress können die Schwere der Erkrankung negativ beeinflussen (HARDING und CLARK, 1997). Zudem führen Koinfektionen mit Bakterien und Viren zu einer Erhöhung der Mortalitätsrate (CHAE, 2004).

Das „porcine dermatitis and nephropathy syndrome“ (PDNS) äußert sich vor allem in roten bis lilafarbenen Flecken und Papeln auf der Haut betroffener Tiere, die besonders in der Perinealregion und an den Hintergliedmaßen zu finden sind (THIBAUT et al., 1998). Histologisch stellen sich diese Veränderungen als Hauteinblutungen dar, die Folge einer nekrotisierenden und leukozytoklastischen

Vaskulitis der kleinen Blutgefäße sind (THIBAULT et al., 1998). Es zeigen sich subkutane Ödeme, Lymphknotenschwellungen und nekrotisierende Vaskulitiden im Bereich des Nierenbeckens (THIBAULT et al., 1998), des Nierenmarks, des Magens, der Milz, der Leber, der Dermis und der Subkutis (CHOI und CHAE, 2001). Die Nieren erscheinen vergrößert und mit einer blassen Rinde, die multiple rötliche, runde Einblutungen mit einem Durchmesser von 2 bis 4 Millimetern aufweisen können (CHOI und CHAE, 2001). Die Namensgebung des PDNS wird wegen der weitreichenden Einbeziehung verschiedener anderer Organe neben der Haut und den Nieren kritisiert. Ferner müssen die Nieren bei dem Krankheitsgeschehen nicht immer in Mitleidenschaft gezogen sein (THIBAULT et al., 1998). Die genaue Pathogenese des PDNS, wie auch die Fragestellung, ob das PCV-2 tatsächlich der alleinige Auslöser für das PDNS ist, sind bislang unklar (CHAE, 2005). Möglicherweise ist eine Koinfektion vom PCV-2 und dem *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* notwendig (THIBAULT et al., 1998; CHOI und CHAE, 2001). Es ist wahrscheinlich, dass zusätzliche Faktoren wie Überbelegung der Ställe, Stress, schlechte Luftqualität und bakterielle oder virale Koinfektionen vorliegen müssen um das PDNS auszulösen (CHAE, 2005).

Weitere Formen einer Infektion mit dem PCV-2 sind die „PCV-2 lung disease“, die „PCV-2 enteric disease“ sowie die „PCV-2 reproductive disease“ (SEGALES, 2012). Die „PCV-2 enteric disease“ ist durch Diarrhö und eine granulomatöse Enteritis gekennzeichnet (KIM et al., 2004). Zudem kann eine lymphatische Depletion im Dün- und Dickdarm festgestellt werden (KIM et al., 2004). An „PCV-2 lung disease“ leidende Tiere zeigen eine peribronchiale und peribronchioläre Fibrose (KIM et al., 2003) sowie bronchointerstitielle Pneumonie (ELLIS et al., 1998). Das PCV-2 scheint eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des „porcine respiratory disease complex“ zu spielen (KIM et al., 2003). Aborte, Totgeburten, Mumifikationen sowie das Vorliegen einer Myokarditis bei den Feten sind bedeutende Symptome der „PCV-2 reproductive disease“ (WEST et al., 1999; BRUNBORG et al., 2007).

Bei einer Infektion mit dem PCV-2 fallen makroskopisch vor allem eine Vergrößerung der Lymphknoten, vorwiegend der Inguinal-, Mesenterial-, Bronchial- und Mediastinallymphknoten, auf (HARDING und CLARK, 1997). Die Lungen stellen sich nicht-kollabiert dar (HARDING und CLARK, 1997; ROSELL et al., 1999). Die Därme sind flüssigkeitsgefüllt, teils dünnwandig oder auch

ödematisiert (HARDING und CLARK, 1997). Im Magen können Ulzerationen festgestellt werden (HARDING und CLARK, 1997; ROSELL et al., 1999). Ein weiterer möglicher Befund ist eine Hepatomegalie (KENNEDY et al., 2000). Jedoch kann sich die Leber auch gelblich-orangefarben, marmoriert und teils diffus atrophiert darstellen (HARDING und CLARK, 1997). Die Nieren können ohne Läsionen, vergrößert und ödematös sein oder weiße, diffus verteilte Herden auf der subkapsulären Oberfläche aufweisen (HARDING und CLARK, 1997; KENNEDY et al., 2000). Zudem kann eine Splenomegalie auftreten (HARDING und CLARK, 1997). Die Haut ist blass oder ikterisch und weist bei manchen Tieren Einblutungen und Nekroseherde, wie beim PDNS beschrieben, auf (HARDING und CLARK, 1997; ROSELL et al., 1999). Zu den klassischen histologischen Nachweisen einer Infektion mit dem PCV-2 zählen mehrkernige Riesenzellen, granulomatöse Entzündungen der lymphatischen Organe und intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen (HARDING und CLARK, 1997; ROSELL et al., 1999; ALLAN und ELLIS, 2000; SEGALES und DOMINGO, 2002). Das PCV-2 kann zu einer chronischen Vaskulitis führen (LANGOHR et al., 2010). Möglicherweise haben bislang unbekannte, genetische Prädispositionen einen Einfluss darauf, ob und in welcher Intensität sich Gefäßläsionen bedingt durch eine Infektion mit dem PCV-2 entwickeln (LANGOHR et al., 2010).

Aviäre Circoviren werden vor allem mit immunsupprimierenden Erkrankungen und Befiederungsstörungen in Zusammenhang gebracht (TODD, 2000). Hierbei scheint ihr Tropismus zu Geweben des Immunsystems, wie der Bursa Fabricii und dem Thymus, eine wichtige Rolle zu spielen (JOHNE et al., 2006). Jedoch ist der Nachweis von Circoviren auch bei klinisch gesunden Vögeln möglich. Dies erschwert die Interpretation hinsichtlich ihrer Pathogenität (TODD, 2004; RAUE et al., 2005). Das BFDV verursacht Federveränderungen und Schnabeldeformationen bei zahlreichen Papageienarten. Hierzu gehören persistierende Federhülsen, Federverlust, kurze und gelockerte Federn, Einblutungen in den Federschaft, ringförmige Einschnürungen der Federn und sogenannte Grimmale (Hungermale) in der Federfahne. Des Weiteren kann eine Verlängerung des Krallen- und Schnabelhorns auftreten (PASS und PERRY, 1984; GERLACH und LEIPOLD, 1986). Betroffene Tiere können monate- bis jahrelang mit dieser Erkrankung leben und versterben in der Regel an zusätzlichen Infektionen mit Bakterien, Chlamydien oder Pilzen (TODD, 2000). Eine Infektion mit dem RaCV

führt zu ähnlichen Federveränderungen wie jene des BFDV (STEWART et al., 2006). Die Jungtaubenkrankheit ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der das PiCV eine zentrale Rolle spielt (RAUE et al., 2005). Die Infektion scheint eine Immunsuppression auszulösen. Durch zusätzliche Faktoren, wie Stress und Sekundärinfektionen, kommt es dann zur Erkrankung der betroffenen Tiere (RAUE et al., 2005). Die Symptome der Jungtaubenkrankheit sind unspezifisch und betreffen vor allem vier bis zwölf Wochen alte Tiere (REITZ et al., 2003). Auch Infektionen mit dem ZfiCV und dem GuCV lösen vor allem eine Immunsuppression aus und führen zu einer erhöhten Mortalität (TODD et al., 2007; RINDER et al., 2016). Infektionen mit dem FiCV, DuCV und GoCV verursachen zudem Befiederungsstörungen und teilweise auch Kümern (TODD et al., 2001a; SHIVAPRASAD et al., 2004; SOIKE et al., 2004). Bei Kanarienvögeln führt eine Circovirus-Infektion zu Mattheit, Anorexie, Federveränderungen und einer erhöhten Mortalität (TODD et al., 2001b). Zudem wurde eine Vergrößerung des Abdomens, eine Kongestion der Gallenblase und das Kümern betroffener Tiere beschrieben (GOLDSMITH, 1995; TODD, 2000).

Eine Infektion mit dem *Mink circovirus* oder dem *Barbel circovirus* führt zu gastrointestinalen Störungen und einer erhöhten Mortalität (LORINCZ et al., 2011; LIAN et al., 2014), jene mit dem *European catfish circovirus* zusätzlich zu Hautveränderungen (LORINCZ et al., 2012). Unklar bleibt die genaue Symptomatik bislang bei Fledermäusen, Menschen, Schimpansen, Schwänen und Staren (JOHNE et al., 2006; HALAMI et al., 2008; LI et al., 2010b; WU et al., 2012; HE et al., 2013).

## 2. Das canine Circovirus

Das CanineCV gehört zur Familie der *Circoviridae* (Genus *Circovirus*). Nach seiner Erstbeschreibung im Jahr 2012 (KAPOOR et al., 2012) folgten verschiedene Veröffentlichungen, bei denen das CanineCV als Erreger bei domestizierten und wildlebenden Caniden nachgewiesen wurde (LI et al., 2013; DECARO et al., 2014; HSU et al., 2016; THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016). Jedoch ist bislang nicht eindeutig geklärt, welche Rolle diesem Virus in der Tiermedizin zuzuschreiben ist.

## 2.1. Genomorganisation

Es wurden insgesamt 22 Stämme des CanineCV identifiziert, die bereits in der GenBank® katalogisiert wurden (KAPOOR et al., 2012; LI et al., 2013; DECARO et al., 2014; ZACCARIA et al., 2016). Zwei weitere Virusstämme wurden beschrieben (HSU et al., 2016).

Alle Virusstämme des CanineCV scheinen eine einheitliche Genomorganisation aufzuweisen. Sie haben eine Größe von 2063 Nukleotiden (nt) mit einer zirkulären, kovalent geschlossenen ssDNA (KAPOOR et al., 2012). Das Genom des CanineCV besitzt, wie andere Spezies der Circoviren auch, zwei offene Leserahmen, open reading frames (ORF), die in entgegengesetzter Richtung auf dem Komplementärstrang angeordnet sind. Sie codieren für das virale Replikase- (303 Aminosäuren) und das Kapsid-Protein (270 Aminosäuren) (KAPOOR et al., 2012; LI et al., 2013). Dadurch, dass die ORFs in zueinander gegensätzlicher Richtung auf dem DNA-Strang angeordnet sind, entsteht eine ambisense Polarität in der Genomorganisation und es werden zwei nicht-translatierte Regionen (englisch „intergenic region“, IR) kreiert (MANKERTZ, 2008). Die beiden IRs sind 135 und 203 nt lang (KAPOOR et al., 2012). Die 5'-IR, welche zwischen den Startcodons der beiden Haupt-ORFs liegt, enthält die typische Haarnadelstruktur, die für die Initiierung der Replikation wichtig ist (KAPOOR et al., 2012). Sie enthält das für Circoviren charakteristische Nonanukleotid mit der Abfolge 5'-TAGTATTAC-3'. Die 3'-IR liegt zwischen den Stopcodons der beiden Haupt-ORFs (KAPOOR et al., 2012; LI et al., 2013). Das Kapsid- beziehungsweise (bzw.) Replikase-Protein des CanineCV zeigt weniger als 25 % bzw. 50 % Übereinstimmung mit anderen Circoviren bei Tieren. Laut dem ICTV müssen Circoviren derselben Spezies mehr als 75 % bzw. 70 % Nukleotidübereinstimmung im Gesamtgenom und in der Kapsid-Proteinsequenz aufweisen. Aus diesem Grund wurde das CanineCV als neue Spezies des Genus *Circovirus* der Familie *Circoviridae* vorgeschlagen (KAPOOR et al., 2012). Die meiste Übereinstimmung an Aminosäuren besitzt das Replikase-Protein des CanineCV mit dem des PCV-1 (LI et al., 2013). Die phylogenetische Analyse des vollständigen Replikase-Proteins des CanineCV zeigt eine monophyletische Gruppenbildung mit dem PCV-1 und dem PCV-2, in Abgrenzung zu den aviären Circoviren (LI et al., 2013). Beim CanineCV liegt eine 91%ige Nukleotidübereinstimmung über 150 nt der Sequenz des *Pine marten torque teno virus* vor, welches zur Familie der *Anelloviridae* gehört und im Kot von

Mardern und Dachsen nachgewiesen wurde (VAN DEN BRAND et al., 2012). Dies stellt die erste nachgewiesene evolutionäre Verwandtschaft zweier Virusfamilien mit zirkulären ssDNA Genomen dar (KAPOOR et al., 2012).

## 2.2. Krankheitsbild

Anhand der aktuellen Forschungsergebnisse lässt sich derzeit nicht eindeutig klären, welche Symptome eine alleinige CanineCV-Infektion verursachen kann (LI et al., 2013). Die Darstellung der bisher veröffentlichten Fälle soll eine Übersicht über mögliche Krankheitssymptome liefern (siehe Tabelle 2):

Der erste Nachweis vom CanineCV im Zusammenhang mit klinischen Veränderungen erfolgte im Jahr 2012 in den USA bei einem Hund, der mit progressivem Erbrechen sowie Durchfall mit Hämatochezie vorgestellt wurde. Wegen des Verdachts auf das Vorliegen einer disseminierten intravasalen Koagulopathie und aufgrund des fehlenden Ansprechens auf die symptomatische Therapie kam es zur Euthanasie des betroffenen Hundes. Dieser wurde nachfolgend histopathologisch untersucht. Das CanineCV wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) im Lebergewebe detektiert. Es konnten keine anderen infektiösen Ursachen, wie canine Parvoviren (canines Parvovirus Typ 2, CPV-2), *Canine enteric coronavirus*, *Salmonella* spp., canine Staupeviren (*Canine distemper virus*, CDV), *Campylobacter* spp., *C. perfringens* codierend für Enterotoxin A, *Cryptosporidium* spp. oder *Giardia* spp. nachgewiesen werden, die verantwortlich für die gastrointestinalen Symptome sein könnten (LI et al., 2013).

In der Studie von LI und Mitarbeitern (2013) wurden zudem Gewebeproben von 21 Hunden, die ähnliche Symptome und mikroskopische Läsionen wie der oben beschriebene Hund aufwiesen, retrospektiv auf eine Infektion mit dem CanineCV untersucht. Vorberichtlich zeigten diese Hunde mindestens zwei der drei folgenden Veränderungen: blutigen Durchfall, Vaskulitis und/oder granulomatöse Entzündungen in verschiedenen Organen. Als Kontrollgruppe dienten fünf weitere histopathologisch untersuchte Hunde, die keine der oben genannten Krankheitsanzeichen aufwiesen. Die Wahl der Gewebeprobe war im Einzelfall abhängig von den vorhandenen Läsionen. Bei allen Tieren wurden Milz, Lymphknoten, Jejunum und Ileum beprobt. Das CanineCV konnte bei drei der 21

symptomatischen und bei keinem Kontrollhund mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) nachgewiesen werden. Die positiv getesteten Hunde zeigten Erbrechen und Durchfall, Lahmheit und progressive Tetraparese oder bikavitäre Blutungen und plötzliches Versterben (LI et al., 2013).

Auch bei einem an einer schweren Gastroenteritis verstorbenen Hund in Italien wurde das CanineCV als alleiniger Erreger ermittelt. Der Nachweis erfolgte aus Gewebeproben von Leber und Darm mittels real-time PCR. Das betroffene Tier stammte aus einem Wurf von insgesamt sechs erkrankten Hunden, die zum Zeitpunkt der Symptomatik circa sechs Monate alt waren. Zuvor erfolgte eine vollständige Grundimmunisierung der Tiere gegen CPV-2, CDV, Hepatitis contagiosa canis (canines Adenovirus Typ 1), canines Adenovirus Typ 2 und *Leptospira* spp. Alle Hunde dieses Wurfs litten an hämorrhagischem Durchfall, Erbrechen, und zwei der betroffenen Tiere verstarben nach einer Woche. Einer der verstorbenen Tiere wurde nachfolgend zur Untersuchung freigegeben. Die überlebenden Welpen erholten sich vollständig nach 12 bis 15 Tagen (DECARO et al., 2014).

Ein zweimaliger Ausbruch von schweren gastrointestinalen Störungen, gekennzeichnet durch Erbrechen, hämorrhagischen Durchfall und Anorexie, mit gehäuften Todesfällen wurde in der Studie von THAIWONG und Mitarbeitern (2016) beschrieben. In der betroffenen Papillonzucht wurde bei beiden Ausbrüchen eine Mischinfektion mit dem CPV-2 und dem CanineCV mittels PCR nachgewiesen. Während des ersten Ausbruchs erkrankten zwei von 16 erwachsenen Hunden, wovon einer verstarb, und alle drei Welpen im Alter von acht Monaten. Zwei der erkrankten Welpen verstarben. Bei dem zweiten Ausbruch erkrankten drei von insgesamt vier jeweils zehn Wochen alten Welpen, aber keiner der elf adulten Hunde der Zucht. Zwei der erkrankten Welpen verstarben und wurden zusammen mit einem der im ersten Ausbruch verstorbenen Welpen histopathologisch untersucht. Obwohl die adulten und acht Monate alten betroffenen Hunde aktuell geimpft waren, konnte bei allen drei sezierten und nachfolgend histopathologisch untersuchten Tieren der Nachweis von Erregermaterial und klassischen histologischen Veränderungen einer Parvovirusinfektion erfolgen. Ein Jahr nach dem ersten bzw. einen Monat nach dem zweiten Ausbruch wurden Kot-, Vollblut- und Serumproben von den drei erkrankten Hunden, die den Ausbruch überlebten, gesammelt und labordiagnostisch untersucht. Mittels PCR konnte das CPV-2 aus

den Kot- und Blutproben der überlebenden Hunde detektiert werden. Sehr niedrige cycle threshold Werte (Ct-Werte, Zyklusschwellenwerte) für das CanineCV konnten in den Blutproben ermittelt werden, was für einen hohen Virusgehalt spricht. In den Kotproben dieser Hunde war es jedoch nicht möglich das CanineCV mittels PCR nachzuweisen (THAIWONG et al., 2016).

Eine in den USA durchgeführte Prävalenzstudie zeigte eine Häufigkeit von 11,3 % einer Infektion mit dem CanineCV bei an Durchfall leidenden Hunden. Die Kotproben wurden mittels real-time PCR untersucht (LI et al., 2013). In Taiwan konnte das Virus mit einer Häufigkeit von 28,0 % bei Hunden mit Durchfall ermittelt werden (HSU et al., 2016). In der Studie von HSU und Mitarbeitern (2016) zeigte sich das CanineCV als der am häufigsten nachgewiesene Erreger unter den getesteten gastrointestinalen Pathogenen. So konnte es bei 78,4 % der positiv auf mindestens einen gastrointestinalen Erreger getesteten Hunde mit Durchfall gefunden werden. Die ermittelte Prävalenz lag deutlich über der des CPV-2 (29,7 %), von *Giardia* spp. (10,8 %), des *Canine coronavirus* (5,4 %) sowie des CDV (4,1 %). Nach Erkenntnissen von HSU und Mitarbeitern (2016) schien die Wahrscheinlichkeit mit dem CanineCV infiziert zu sein bei Hunden mit Durchfall dreimal höher als bei gesunden Hunden. Eine Korrelation zwischen dem Schweregrad des Durchfalls und der Prävalenz des CanineCV war nicht nachzuweisen (HSU et al., 2016).

Im Jahr 2016 wurden in Italien Hunde und wildlebende Wölfe, Dachse und Füchse auf das Vorhandensein einer CanineCV-Infektion untersucht (ZACCARIA et al., 2016). Hierzu wurden von 277 Tieren (209 Hunde, 34 Wölfe, 24 Füchse, 10 Dachse) insgesamt 389 Gewebeproben verschiedener Organe mittels real-time PCR analysiert. In 32 Proben, welche von 18 verschiedenen Tieren stammten, konnte das CanineCV nachgewiesen werden (18/277; 6,5 %). Es waren 8/209 Hunden, 9/34 Wölfen, 1/10 Dachsen und 0/24 Füchsen infiziert (ZACCARIA et al., 2016). Die bei den Hunden festgestellte Prävalenz von 3,8 % (ZACCARIA et al., 2016) deckt sich in etwa mit der in Serumproben von verschiedenen Hunden detektierten Häufigkeit von 2,9 % (KAPOOR et al., 2012). Zudem entspricht sie der in 3,3 % der Blutproben von Hunden mit Thrombozytopenie und Neutropenie, Fieber unbekannter Ursache oder „past tick bite“ (nach einem Zeckenbiss) nachgewiesenen Prävalenz des CanineCV (LI et al., 2013). Bei den infizierten Hunden konnten gastrointestinale, respiratorische und/oder neurologische

Symptome festgestellt werden. Drei der acht infizierten Hunde wurden tot aufgefunden. Bei den betroffenen wildlebenden Carnivoren wurde anamnestisch am häufigsten ein Trauma berichtet. Ein Wolf wurde wegen neurologischen Ausfällen eingeschläfert und drei weitere wurden tot aufgefunden (ZACCARIA et al., 2016).

Von ZACCARIA und Mitarbeitern (2016) wurde die Rolle als opportunistischer Erreger diskutiert, da in dieser Studie das CanineCV häufig in Form einer Mischinfektion mit anderen Erregern gefunden werden konnte (ZACCARIA et al., 2016). Bei insgesamt 68,4 % der Stuhlproben der mit dem CanineCV infizierten Hunde in den USA, die an Durchfall litten, konnte eine zusätzliche Infektion mit mindestens einem der folgenden Erreger mittels PCR detektiert werden: *Canine enteric coronavirus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *C. perfringens* Typ A, *Cryptosporidium* spp. und *Giardia* spp. (LI et al., 2013). Zudem wurde ein gehäuftes Auftreten einer Koinfektion mit dem CPV-2 beobachtet (THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016). Gegensätzliche Beobachtungen wurden von HSU und Mitarbeitern (2016) beschrieben. Sie konnten bei 74,1 % der an Durchfall leidenden Hunde eine Einzelinfektion mit dem CanineCV nachweisen (HSU et al., 2016).

Interessanterweise konnte das CanineCV auch bei 6,9 % der Stuhlproben gesunder Hunde detektiert werden (LI et al., 2013). In Taiwan lag die Rate der mit dem CanineCV infizierten, asymptomatischen Hunde bei 11,9 % (HSU et al., 2016).

In der Studie von HSU und Mitarbeitern (2016) wurde das Alter der mit dem CanineCV-infizierten, gesunden und an Durchfall erkrankten Hunde ausgewertet. Jene Hunde, die an Durchfall litten und bei denen eine Infektion mit dem CanineCV nachgewiesen werden konnte, schienen signifikant jünger zu sein als gesunde Hunde mit einer CanineCV-Infektion. Bei den mit dem CanineCV infizierten Hunden mit Durchfall lag das mediane Alter bei einem Jahr. Bei gesunden Hunden mit einem positiven Testergebnis betrug das mediane Alter hingegen fünf Jahre (HSU et al., 2016). Auch in der Untersuchung von ZACCARIA und Mitarbeitern (2016) zeigte sich, dass ein Großteil der betroffenen Tiere, insbesondere der Hunde, unter einem Jahr alt waren (ZACCARIA et al., 2016).

**Tabelle 2: Übersicht von Signalement, Stamm, Probenmaterial, klinischen Symptomen und Koinfektionen bei einer Infektion mit dem *Canine circovirus***

Signalement	Stamm; GenBank® Nummer	Probenmaterial	Klinische Symptome	Koinfektion	Autor
Hunde, verschiedene	CaCV-1 strain NY214; JQ821392	Serum	Unbekannt	Unbekannt	KAPOOR et al., 2012
Beagle, 1 Jahr, männlich	DogCV-UCD1; KC241982	Gewebe (Leber)	Akutes Erbrechen, hämorrhagischer Durchfall	Keine	LI et al., 2013
Boston Terrier, 5 Jahre, weiblich kastriert		Gewebe (Milz, Lymphknoten, Darm)	Durchfall, Erbrechen	Keine Angabe	
Boxer, 1 Jahr, weiblich kastriert		Gewebe (Milz, Lymphknoten, Darm)	Lahmheit, progressive Tetraparese	Keine Angabe	
Greyhound, 2 Jahre, Geschlecht unbekannt		Gewebe (Milz, Lymphknoten, Darm)	Bikavitäre Blutung, tot aufgefunden	Babesia conradae	
Hunde, verschiedene	DogCV-UCD2; KC241984	Kot	Durchfall oder klinisch gesund	Unbekannt	
Hunde, verschiedene	DogCV-UCD3; KC241983	Blut	Thrombozytopenie und Neutropenie, Fieber unbekannter Genese oder vorberichtlicher Zeckenbiss	Unbekannt	
Dackel, circa 5-6 Monate, Geschlecht unbekannt	Bari/411-13; KJ530972	Gewebe (Darm, Leber)	Erbrechen, hämorrhagischer Durchfall	Keine	DECARO et al., 2014
Rasse unbekannt, < 1 Jahr, männlich	KT734813	Gewebe (Darm)	Gastrointestinale und respiratorische Symptome	CPV-2, Aspergillose	ZACCARIA et al., 2016
Rasse unbekannt, < 1 Jahr, männlich	Nicht bestimmt	Gewebe (Darm, Lymphknoten)	Gastrointestinale und respiratorische Symptome	CPV-2	
Rasse unbekannt, 3 Monate, weiblich	Nicht bestimmt	Gewebe (Darm)	Tot aufgefunden	CPV-2	

**Fortsetzung Tabelle 2: Übersicht von Signalement, Stamm, Probenmaterial, klinischen Symptomen und Koinfektionen bei einer Infektion mit dem *Canine circovirus***

Signalement	Stamm; GenBank® Nummer	Probenmaterial	Klinische Symptome	Koinfektion	Autor
Rasse unbekannt, < 1 Jahr, weiblich	KT734825, KT734821	Gewebe (Lunge, Gehirn)	Gastrointestinale und neurologische Symptome	CDV	
Rasse unbekannt, < 1 Jahr, weiblich	KT734826, KT734823	Gewebe (Darm, Lymphknoten)	Tot aufgefunden	CPV-2	
Rasse unbekannt, 6 Monate, Geschlecht unbekannt	Nicht bestimmt	Gewebe (Darm)	Gastrointestinale Symptome	CPV-2	
Rasse unbekannt, 3 Monate, männlich	Nicht bestimmt	Gewebe (Darm)	Gastrointestinale Symptome	CPV-2, CDV, <i>Coccidia</i> spp.	
Rasse unbekannt, > 1 Jahr, Geschlecht unbekannt	KT734817, KT734818	Gewebe (Leber, Lunge)	Tot aufgefunden	CPV-2, <i>Klebsiella</i> <i>oxytoca</i>	
Zwei Papillons, 8 Monate, Geschlecht unbekannt	CaCV-1 strain NY214; JQ821392	Gewebe (Lymphknoten, Milz, Leber, Darm)	Anorexie, Erbrechen blutiger Durchfall, Tod	CVP-2	THAIWONG et al., 2016
Papillon, 10 Wochen, Geschlecht unbekannt					
Hunde, verschiedene	DogCV-30, DogCV-103	Kot, Rektalabstrich	Durchfall oder klinisch gesund	Unbekannt	HSU et al., 2016

### **2.3. Histopathologische Veränderungen**

Analog zum PCV-2, ließ sich das CanineCV häufig in primären und sekundären lymphatischen Geweben nachweisen (LI et al., 2013; PESAVENTO und MURPHY, 2014; THAIWONG et al., 2016). Auch bei einer Infektion mit dem CanineCV trat die für Circovirusinfektionen typische granulomatöse Entzündung auf (LI et al., 2013; THAIWONG et al., 2016). Diese betraf vor allem die Peyerschen Platten des Ileums, (Mesenterial-) Lymphknoten und Milz (LI et al., 2013; THAIWONG et al., 2016). Teilweise lag eine stark nekrotische Veränderung des genannten lymphatischen Gewebes vor (LI et al., 2013; THAIWONG et al., 2016). Die Mesenteriallymphknoten präsentierten sich teils gestaut und hämorrhagisch verändert (DECARO et al., 2014). In den Marksinus der Mesenteriallymphknoten ließ sich eine Vielzahl an Histiozyten nachweisen (THAIWONG et al., 2016). Häufig zeigte sich eine fibrinöse, nekrotisierende Vaskulitis, die in sehr unterschiedlicher Ausprägung auftreten kann (LI et al., 2013). Die Vaskulitis konnte in verschiedenen Segmenten des Darms, der Harnblase, der Leber, der Milz, der Lunge, der Nieren, des Herzens und der Meningen nachgewiesen werden. Es konnten verschiedene Schweregrade an mikroskopischen Läsionen im Nierengewebe aufgezeigt werden, die tubuläre Nekrosen mit einhergehender Entzündung, granulomatöse interstitielle Nephritis, multifokale Einblutungen und lymphozytäre, plasmazytäre Nephritis einschlossen (LI et al., 2013). Des Weiteren traten eine Hepatitis, Pankreatitis und/oder Adrenatitis auf (LI et al., 2013; DECARO et al., 2014). Der Darm wies eine hämorrhagische Entzündung auf (DECARO et al., 2014).

Viele der beobachteten histologischen Veränderungen einer Infektion mit dem CanineCV gleichen jenen, die beim PCV-2, insbesondere beim PDNS, auftreten (LI et al., 2013). Mehrkernige Riesenzellen, die typischerweise bei einer PCV-2-Infektion vorkommen, konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (ROSELL et al., 1999; LI et al., 2013).

### **2.4. Übertragung und Epidemiologie**

Bislang ist unklar, wie es zu einer Infektion mit dem CanineCV kommt. Es wird vermutet, dass sich das CanineCV ähnlich wie das PCV-2 verhält (THAIWONG et al., 2016). Die Übertragung vom PCV-2 ist horizontal und vertikal über

respiratorische und digestive Se- und Exkrete, Harn und Sperma (MAGAR et al., 2000; SHIBATA et al., 2003; SCHMOLL et al., 2008; CHIOU et al., 2011; ROSE et al., 2012), Kolostrum (GERBER et al., 2012) sowie diaplazentar (RITZMANN et al., 2005) möglich. Eine Übertragung durch Tiere, die eine persistierende Infektion aufweisen oder bedingt durch eine Reinfektion durch Viren in der Umwelt wird angedacht. Die Virusausscheidung klinisch unauffälliger Tiere könnte eine bedeutende epidemiologische Rolle spielen (THAIWONG et al., 2016). Das Virus scheint auf mehreren Kontinenten vorzukommen, denn sein Auftreten wurde bereits in Nordamerika, Europa und Asien beschrieben (LI et al., 2013; DECARO et al., 2014; HSU et al., 2016; THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016).

## **2.5. Diagnostik**

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten eine Infektionskrankheit zu diagnostizieren: den direkten Erregernachweis oder indirekt über den Nachweis von Antikörpern gegen den Erreger (LAPPIN, 2009). Bisherige Bemühungen das CanineCV *in vitro* anzuzüchten, schlugen fehl (DECARO et al., 2014; ZACCARIA et al., 2016).

### **2.5.1. Nukleinsäurenachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Der Nachweis von Nukleinsäuren des CanineCV kann mit Hilfe der PCR, im Speziellen mittels real-time PCR, erfolgen (LI et al., 2013). Bisherige Studien verwendeten eine real-time TaqMan<sup>®</sup> PCR für den Nachweis einer Infektion mit dem CanineCV (LI et al., 2013).

Die für die PCR benötigte DNA konnte aus zahlreichen Geweben, Kot, Vollblut, Serum und auch aus bereits fixierten histologischen Proben isoliert werden (LI et al., 2013; DECARO et al., 2014; THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016).

In den untersuchten Gewebeproben lagen die ermittelten Ct-Werte für das CanineCV zwischen 19 bis 43 (DECARO et al., 2014; ZACCARIA et al., 2016). In den lymphatischen Geweben, wie Milz und Lymphknoten, wurden verhältnismäßig niedrige Ct-Werte festgestellt (ZACCARIA et al., 2016). In der Studie von THAIWONG und Mitarbeitern (2016) wurden Vollblut-, Serum- und

Kotproben von drei Hunden auf das CanineCV mittels real-time PCR untersucht, die eine Mischinfektion mit dem CanineCV und dem CPV-2 überlebten. Die Proben wurden bei zwei der betroffenen Hunde einen Monat und bei dem dritten Hund zwölf Monate nach dem Ausbruch der Erkrankung gesammelt. In den Vollblut- und Serumproben konnten sehr niedrige Ct-Werte für das CanineCV ermittelt werden, was für einen hohen Gehalt an Virus-DNA spricht. Die Ct-Werte lagen zwischen 13 bis 30. Es konnte nur ein geringer Gehalt an CPV-2-DNA im Vollblut und Serum detektiert werden. In den Kotproben konnte das CanineCV jedoch nicht mittels PCR nachgewiesen werden. Ein hoher Gehalt an CanineCV-DNA schien im Blut unabhängig vom vorherigen Krankheitszustand nachweisbar zu sein (THAIWONG et al., 2016).

### **2.5.2. In-situ-Hybridisierung**

Für die ISH können in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben verwendet werden (THAIWONG et al., 2016). Mittels ISH ließ sich virale Nukleinsäure in Makrophagen, die sich innerhalb von Mesenterial- und Mandibularlymphknoten, Peyerschen Platten des Ileums, Arteriolen der Milz und in Keimzentren der weißen Pulpa der Milz befanden, nachweisen (LI et al., 2013). Das CanineCV konnte zudem in Nuklei der Kupferzellen in der Leber detektiert werden (THAIWONG et al., 2016).

### **2.5.3. Virusnachweis mittels Elektronenmikroskopie**

In der Studie von LI und Mitarbeitern (2013) wurden in Formalin fixierte Gewebeproben von Lymphknoten in 2%igem Glutaraldehyd nachfixiert, weiterverarbeitet und in Epoxidharz eingebettet. Ausgewählte Teile wurden in Toluidinblau getränkt. Mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops konnten mit intrazytoplasmatischen Einschlüssen beladene Makrophagen im Mesentariallymphknoten nachgewiesen werden (LI et al., 2013). Die Einschlusskörperchen besaßen eine rundliche, längliche oder teils irreguläre Form. Sie waren kleiner als 0,5 µm groß und oftmals in gehäufter Anzahl (bis zu 25 pro Zelle) im Zytoplasma zu finden. Die meisten Einschlusskörperchen waren granuliert, elektronendicht und hatten eine scharfe Umrandung ohne von einer Membran umgeben zu sein. Manche Einschlüsse enthielten parakristalline

Strukturen aus ikosaedrischen Virionen, welche 9–11 nm im Durchmesser besaßen (LI et al., 2013).

#### **2.5.4. Virusnachweis mittels Virusisolierung**

In der Untersuchung von DECARO und Mitarbeitern (2014) wurden verschiedene Zelllinien, in denen bereits andere canine Viren angezüchtet werden konnten, mit CanineCV-infizierten Gewebeproben aus Leber und Darm beimpft. Zudem wurde eine Kultur mit frisch trypsinisierten Zellen angelegt. Die infizierten Zellen wurden täglich auf zytopathische Effekte hin untersucht. Nach fünf Tagen erfolgte eine Untersuchung mittels real-time PCR. Eine Subkultur wurde alle sechs bis acht Tage, fünf Zyklen in Folge, angelegt (DECARO et al., 2014). Zudem wurden die infizierten Zellen mit Glucosamin behandelt (DECARO et al., 2014), da bekannt ist, dass dies bei porcinen Circoviren die Replikation *in vitro* initiieren kann (TISCHER et al., 1987).

Auch ZACCARIA und Mitarbeiter (2016) versuchten das CanineCV zu isolieren. Hierzu beimpften sie canine Nieren- und Osteosarkomzelllinien mit infiziertem Lebergewebe eines Hundes und Lymphknotengewebe eines Wolfes (ZACCARIA et al., 2016).

Alle Bemühungen der Virusisolierung schlugen jedoch fehl (DECARO et al., 2014; ZACCARIA et al., 2016). Es konnten keine zytopathischen Effekte festgestellt werden. Zudem konnte ein progressiver Anstieg der Ct-Werte in den beimpften Zellkulturen mittels real-time PCR nachgewiesen werden. Dies deutet auf ein Sinken der Virusmenge hin. Der vierte und fünfte Zyklus der Subkulturen zeigte ein negatives PCR-Ergebnis für das CanineCV (DECARO et al., 2014). Bei der Virusisolierung des PCV-2 konnte bislang ebenfalls kein zytopathischer Effekt nachgewiesen werden (ALLAN et al., 1998b). Die Identifizierung des PCV-2 muss deswegen mit Hilfe einer zusätzlichen Untersuchung der beimpften Zellen, beispielsweise mittels Elektronenmikroskopie, erfolgen (ALLAN et al., 1998b).

### III. PUBLIKATION

#### **Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea**

A. Anderson<sup>1</sup>

K. Hartmann<sup>1</sup>, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

C. M. Leutenegger<sup>2</sup>, Dr. med. vet., PhD, FVH

A. L. Proksch<sup>1</sup>, Dr. med. vet.

R. S. Mueller<sup>1</sup>, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil, Dipl. ECVD, Dipl. ACVD, FANZCVSc

S. Unterer<sup>1</sup>, Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

<sup>1</sup> Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilian-University Munich, Germany

<sup>2</sup> IDEXX Laboratories, Inc., West Sacramento, California, USA

The Veterinary Record, accepted January 31<sup>st</sup>, 2017; published February 27<sup>th</sup>, 2017

doi: 10.1136/vr.103926

# Paper

## Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea

A. Anderson, K. Hartmann, C. M. Leutenegger, A. L. Proksch, R. S. Mueller, S. Unterer

**Canine circovirus (CanineCV) has been detected in some dogs with severe haemorrhagic diarrhoea, but its pathogenic role is unclear. This study evaluated a suspected association between the presence of CanineCV and acute haemorrhagic diarrhoea syndrome (AHDS) in dogs. The prevalence of CanineCV in dogs with AHDS was compared with that in healthy dogs and those infected with canine parvovirus (CPV). Additionally, time to recovery and mortality rate were compared between CanineCV-positive and CanineCV-negative dogs. Faecal samples of dogs with AHDS (n=55), healthy dogs (n=66) and dogs infected with CPV (n=54) were examined by two real-time TaqMan PCR assays targeting the replicase and capsid genes of CanineCV. CanineCV was detected in faecal samples of two dogs with AHDS, three healthy controls and seven dogs infected with CPV. Among the three groups, there was no significant difference in prevalence of CanineCV. CPV-infected animals that were coinfecting with CanineCV had a significantly higher mortality rate compared with those negative for CanineCV. CanineCV does not appear to be the primary causative agent of AHDS in dogs, but might play a role as a negative co-factor in disease outcome in dogs with CPV infection.**

The acute onset of haemorrhagic diarrhoea in dogs can have numerous potential causes, including several infectious and non-infectious agents (Unterer and Hartmann 2009). Despite extensive diagnostic investigations, the inciting cause frequently remains unknown (Burrows 1977, Unterer and others 2011). By ruling out known causes of haemorrhagic diarrhoea, a tentative diagnosis of 'acute haemorrhagic diarrhoea syndrome' (AHDS) can be established (Unterer and others 2014). This syndrome had previously been named canine 'haemorrhagic gastroenteritis' (Burrows 1977) and is characterised by acute onset of haemorrhagic diarrhoea, commonly accompanied by a marked haemocoagulation (Burrows 1977, Mortier and others 2015). Although the exact aetiology has not yet been fully revealed, there is evidence that *Clostridium perfringens* is involved in the pathogenesis of AHDS (Unterer and others 2014). Quantitative PCR showed a significant increase of *C perfringens* in the faeces of dogs with AHDS compared with healthy dogs. In biopsies of the small intestine of dogs with AHDS, dense layers of *C perfringens* could be detected on the surface of necrotic epithelial lesions (Unterer and others 2014). However, these cross-sectional studies were not able to conclusively reveal whether clostridial overgrowth is a cause or a consequence of the intestinal disease

(Unterer and others 2014). It has been discussed that clostridial species proliferate secondarily in response to disruption of the normal gastrointestinal microbiota and might only be able to adhere to the intestinal mucosa after destruction of the intestinal lining by other primary causes such as viral agents (Weese and others 2001).

Circoviruses are small, non-enveloped, icosahedral viruses with a single-stranded circular DNA genome of approximately 2 kb in size. Before 2012, the only known mammalian circoviruses were the two closely related porcine circoviruses type 1 and type 2 (PCV-1 and PCV-2) (Tischer and others 1974, Allan and others 1998, Meehan and others 1998). PCV-1 is generally considered to be non-pathogenic (Tischer and others 1986, Allan and others 1995). In contrast, PCV-2 is linked to a variety of pathological conditions in pigs, such as postweaning multisystemic wasting syndrome (Clark 1997, Harding 1997), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (Allan and others 2000, Rosell and others 2000), pneumonia (Kim and others 2003) and enteritis (Segalés 2012). In 2012, a canine circovirus (canine circovirus genotype 1 (CaCV-1)) was detected in serum samples of dogs (Kapoor and others 2012). Currently, little is known about the exact pathogenic role of this novel canine agent, although some case series suggest that this virus might cause haemorrhagic diarrhoea in dogs (Li and others 2013, Decaro and others 2014). Recently, a closely related variant of CaCV-1 was detected in an outbreak of fatal enteritis in puppies in Italy (Decaro and others 2014). In order to avoid confusion with the CaCV notation that is already used for other viruses (eg, canary circovirus, canine calicivirus), the name 'dog circovirus' was suggested (Li and others 2013). However, to make species names uniform and similar across all members of the family Circoviridae, the acronym 'CanineCV' was now established by the International Committee on Taxonomy of Viruses.<sup>1</sup> CanineCV

Veterinary Record (2017)

doi: 10.1136/vr.103926

**A. Anderson**,  
**K. Hartmann**, Prof. DrMedVet,  
DipECVIM-CA,  
**A. L. Proksch**, DrMedVet,  
**R. S. Mueller**, Prof. DrMedVet,  
DipECVD, FANZCVSc, DipACVD,  
**S. Unterer**, DrMedVet, DipECVIM-CA,  
Clinic of Small Animal Medicine,  
Ludwig-Maximilian-University Munich,  
Veterinärstrasse 13, Munich 80539,  
Germany  
**C. M. Leutenegger**, DrMedVet, PhD,

FVH,  
IDEXX Laboratories, Inc., 2825 KOVR  
Drive, West Sacramento, California  
95605, USA

E-mail for correspondence:  
alexandra\_anderson@web.de  
Provenance: Not commissioned;  
externally peer reviewed.  
Accepted January 31, 2017

<sup>1</sup>[http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode\\_id=20152322&taxa\\_name=Canine%20circovirus](http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20152322&taxa_name=Canine%20circovirus) (accessed November 20, 2016).

**Paper**

was also identified in the liver of a dog presented for progressive vomiting and haemorrhagic diarrhoea. On postmortem examination, the dog showed histological lesions of necrotising vasculitis and haemorrhage throughout the gastrointestinal tract, as well as granulomatous lymphadenitis of the mesenteric lymph nodes (Li and others 2013).

To the authors' knowledge, there are no data available regarding the prevalence of CanineCV in the German dog population. Moreover, the role of CanineCV in dogs with AHDS has not been reported. The aim of this study was to evaluate whether CanineCV might be the primary cause of AHDS in dogs. For this purpose, the prevalence of CanineCV in dogs with AHDS was compared with that in clinically healthy dogs as well as dogs with canine parvovirus (CPV) infection, which served as a second control group. Furthermore, time to recovery and mortality rate were compared between dogs with and without CanineCV infection.

**Materials and methods****Study design**

This study used data and material collected for other studies already published (Unterter and others 2011, 2014; Proksch and others 2014, 2015) in combination with prospective collection of additional material and data. All patients included had been presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany, between 2006 and 2014.

Prospective collection and analysis of canine faecal samples was approved by the Ethical Review Committee of the Centre of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany (approval number 7-20-06-13).

A power analysis showed that a minimal number of 60 patients in each group was determined to be necessary to detect a clinically significant difference of 20 per cent in the prevalence of CanineCV with  $P < 0.05$  and a power of 90 per cent.

**Study population****Patients with AHDS**

The inclusion criterion was presence of acute haemorrhagic diarrhoea for less than three days. Patients diagnosed with any disease known to cause haemorrhagic diarrhoea, such as corticosteroid toxicity, bleeding disorders, hypoadrenocorticism, renal or hepatic failure, pancreatitis, foreign bodies, infection with CPV or endoparasites, were excluded from the study. In order to exclude these causes for haemorrhagic diarrhoea, the following additional laboratory examinations were conducted in all cases: complete blood count, serum biochemistry profile, faecal examinations for nematode parasites (29.5 per cent sodium nitrate flotation solution, Janssen-Cilag, Neuss, Germany) and *Giardia* species by PCR. CPV infection was ruled out by a negative faecal PCR test result. In addition, serum bile acid concentrations ( $n=36$ ), clotting profile ( $n=44$ ) and medical imaging (abdominal ultrasound, radiographs, gastroduodenoscopy or a combination of these;  $n=44$ ) were performed at the discretion of the clinician, depending on clinical presentation and course of disease.

**Healthy controls**

Clinically healthy, client-owned dogs that were presented for routine vaccination to the healthcare service, or belonged to students or employees of the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig-Maximilian-University Munich, were included in the healthy control group. Dogs were excluded if they had any history of gastrointestinal disorders, such as vomiting, diarrhoea or anorexia within the four weeks before sampling. Additionally, detection of nematode parasites by flotation, as described above, or CPV DNA determined by PCR in the examined faecal specimen led to exclusion.

**Patients with CPV infection**

Dogs were included in this group if CPV was diagnosed by faecal PCR and clinical signs were consistent with

parvovirus. Dogs were excluded if they had received modified live CPV vaccines within the three weeks before presentation. Shedding of CPV was assessed by using a qualitative PCR as previously described (Schunck and others 1995). PCR testing was chosen to detect CPV in the faeces because PCR is considered the most reliable method. PCR has a higher sensitivity than immunochromatographic tests (Proksch and others 2015). In addition, PCR is still positive after storage of faecal samples, while immunochromatographic tests might turn falsely negative after storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Kantere and others 2015).

**Sample handling**

Archival faecal samples from previous routine faecal examination or diagnostic workup were examined for CanineCV and CPV by PCR. Samples were filled into Eppendorf tubes for storage right after collection. In dogs with AHDS and clinically healthy dogs, samples were immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  pending analysis. Faecal samples from dogs with CPV infection were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**PCR analysis**

In order to detect CanineCV, two real-time TaqMan PCR assays from a commercial reference laboratory (IDEXX Laboratories, test code 3238; adopted and modified from Li and others 2013) were used targeting the replicase gene and the capsid gene (GenBank accession number KC241982–KC241984). Faecal samples were processed individually. Each sample, approximately 1 g, was diluted with 1 ml of 0.9 per cent sodium nitrate solution. Following vortexing, the mixture was centrifuged for 20 minutes at  $4000\times g$ . The clear supernatant was then filtrated through a  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  filter paper and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until total nucleic acid extraction. Total nucleic acids were extracted from all filtrates with adapted standardised protocols as previously described (Pusterla and others 2007, Mapes and others 2008). Briefly, filtrates were lysed with a chaotropic lysis buffer (DXB, Qiagen, Valencia, California, USA). Lysed filtrates were extracted using established protocols on Whatman filters in a Corbett X-Tractor platform (Qiagen). Nucleic acids were eluted into  $150\ \mu\text{l}$  of PCR-grade nuclease-free water (Fisher) and  $5\ \mu\text{l}$  was used as a template in subsequent real-time PCR reactions. Analysis was performed on a Roche LightCycler 480 (Roche Applied Science, Indianapolis) and raw data analysed using the second derivative maximum method with high-sensitivity settings (software version 1.5.0 (SP3)) to generate the quantification cycle (Cq). Real-time PCR was conducted with six quality controls including (1) quantitative PCR-positive controls using synthetic DNA spanning the PCR product with 10–20 nucleotide overhangs (Ultramer; IDT Technologies, Clearwater, Iowa USA), (2) PCR-negative controls (RNase-free water; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), (3) negative extraction controls (lysis solution only), (4) quantitative DNA preanalytical quality control targeting the host single-stranded rRNA gene complex, (5) an internal positive control (lambda phage DNA) spiked into the lysis solution and (6) an environmental contamination monitoring control (swab-based contamination monitoring of the PCR laboratory). These controls assessed the functionality of the PCR protocol (1 and 5), absence of contamination in the reagents (2) and laboratory (6), absence of cross-contamination during the extraction process (3), quality and integrity of the DNA as a measure of sample quality (4), RT protocol (4) and absence of PCR inhibitory substances as a carryover from the sample matrix (5).

Real-time PCR tests were validated. For the analytical validation, the assay had to pass six validation criteria including amplification efficiency, linearity, reproducibility intra-run and inter-run reproducibility,  $r^2$  value and signal-to-noise ratio of the fluorescent signal. Positive signals from clinical samples were confirmed by resequencing positive results using outside flanking primers at the reference laboratory.

### Postmortem examination

A postmortem examination was performed in one dog diagnosed with CPV infection that had a positive faecal PCR result for CanineCV. Tissue samples of its liver that were formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) were tested for CanineCV by real-time PCR.

The FFPE tissues from the necropsied dog originating from the CPV group with a positive faecal PCR result for CanineCV were extracted after paraffin removal with xylene from three 20- $\mu$ m-thick sections of each sample, proteinase K digested at 56°C overnight and subsequently processed according to the above described protocol.

### Statistical analysis

Dogs of all three patient groups were compared regarding prevalence of CanineCV infection and signalment, including age, sex and breed. A comparison of age was made between all CanineCV-infected and non-infected dogs. CPV-infected patients with and without CanineCV coinfection were compared regarding signalment, mortality rate and time to recovery. Dogs were defined to be clinically recovered when they showed normal general condition, appetite and hydration status, a body temperature within the physiological range (38.0–39.0°C), no vomiting and a faecal consistency equal to or less than five according to the Purina Faecal Scoring System for Dogs.<sup>11</sup> Data to evaluate time to recovery were available in 48 cases of the AHDS group and in all dogs with CPV infection. Dogs that did not survive were excluded from this analysis.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism V6.0 (San Diego, California, USA). Differences in age and time to recovery were analysed by Mann-Whitney U test. Comparison of mortality rate, breed, sex and shedding of CanineCV was performed using chi-squared test. Signalment and prevalence of CanineCV infections between dogs with AHDS, with CPV infection and healthy dogs were compared using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple-comparison test. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

### Results

A total number of 175 dogs were included in the study, 55 patients with AHDS, 54 dogs with CPV infection and 66 clinically healthy dogs.

A retrospective power analysis based on the 55 patients in the AHDS group indicated that the power to detect a 20 per cent difference in prevalence of CanineCV between AHDS and controls was 88.6 per cent with a significance level of 0.05.

### Signalment

The median age of the 55 dogs with AHDS was 4.0 years (range 0.90–16.80 years). The breeds most commonly represented were mixed-breed dogs ( $n=20$ ), Yorkshire terriers and Maltese dogs ( $n=3$  each). In total, 31 dogs were male (7 of them neutered) and 24 were female (11 of them spayed). All dogs of the AHDS group were vaccinated; however, three of them were vaccinated irregularly and one had not completed primary immunisation yet.

The median age of the 66 healthy dogs included in the control group was 4.25 years (range 0.30–16.00 years). The most common breeds were mixed-breed dogs ( $n=32$ ), Labrador retrievers ( $n=7$ ) and beagles ( $n=3$ ). In total, 36 dogs were male (18 of them neutered) and 30 female (21 of them spayed). Sixty-four dogs were vaccinated, two of them irregularly. In two cases, no information on vaccination status was available.

The median age of the 54 CPV-infected dogs was 0.17 years (range 0.11–2.00 years). The most frequently represented breeds were mixed-breed dogs ( $n=22$ ), Labrador retrievers ( $n=8$ ),

Maltese dogs ( $n=5$ ), Yorkshire terriers and Chihuahuas ( $n=3$  each). A total of 33 dogs were male and 21 were female (none neutered/spayed). Thirteen dogs were vaccinated; however, none of them had completed primary immunisation.

Dogs with CPV infection (median 0.17 years; range 0.11–2.00) were significantly younger compared with dogs with AHDS (median 4.0 years; range 0.90–16.80) and clinically healthy dogs (median 4.25 years; range 0.30–16.00) ( $P < 0.001$ ). No significant difference was present between dogs with AHDS and clinically healthy controls regarding age. Breed and gender distribution did not show a significant difference among the three patient groups.

### Prevalence of CanineCV

There was no significant difference between the AHDS, CPV and healthy control group concerning presence of CanineCV (Table 1).

### Comparison of signalment, mortality rate and time to recovery between dogs with and dogs without CanineCV infection

Comparing all dogs with and without CanineCV infection, those with a positive test result were significantly younger (median 0.4 (range 0.1–3.5) vs median 2.5 (range 0.1–16.8);  $P=0.006$ ).

Since only one of 55 dogs with AHDS died and this dog tested negative for CanineCV, no comparison of mortality rate between dogs with and dogs without CanineCV infection in the AHDS group was performed. However, the mortality rate of patients with CPV infection coinfecting with CanineCV was significantly higher compared with dogs without CanineCV coinfection. In contrast, there was no significant difference in time to recovery between dogs with and without coinfection with CanineCV in the CPV group. In addition, age and sex did not differ significantly between CPV-infected dogs with versus without CanineCV coinfection (Table 2).

### CanineCV PCR result in the necropsied dog

CanineCV could be detected by real-time PCR in the tissue sample of the liver of the necropsied dog that had a positive test result for CPV and CanineCV in its faeces. Furthermore, histopathological examination showed multifocal necrotising hepatitis and multifocal ulcerations at the pyloric orifice. Some of the Peyer's patches appeared depressed.

### Discussion

Although AHDS has been recognised as a clinical syndrome for years, the exact aetiology is still unclear. A pathogenic role of *C. perfringens* in dogs with AHDS has been suggested (Unterer and others 2014). Epithelial necrosis could be explained by the influence of clostridial toxins, such as pore-forming toxins, which recently have been detected in dogs with haemorrhagic diarrhoea (Mehdizadeh Gohari and others 2015). However, it is unknown whether clostridia indeed are the primary agent or, alternatively, as discussed by others (Guilford and others 1996), secondary clostridial overgrowth might be a sequel of another underlying disease, such as a viral infection (Turk and others 1992).

Over the past few years new emerging viral agents, which are responsible for severe intestinal lesions, have been detected

TABLE 1: Comparison of prevalence of CanineCV among the AHDS, CPV and healthy control group

Parameter	AHDS group (n=55)	CPV group (n=54)	Healthy control group (n=66)	P value
Prevalence of CanineCV	3.64% (2/55)	12.96% (7/54)	4.55% (3/66)	0.100

AHDS, acute haemorrhagic diarrhoea syndrome; CanineCV, canine circovirus; CPV, canine parvovirus type 2; n, number of dogs

<sup>11</sup><http://www.columbusdogconnection.com/Documents/FecalScoringSystem.pdf> (accessed May 9, 2015).

## Paper

TABLE 2: Comparison of dogs with CPV infection with and without CanineCV coinfection

Parameter	CanineCV (+) (n=7)		CanineCV (-) (n=47)		P value
	Median	Range	Median	Range	
Age (years)	0.2	0.1-0.5	0.2	0.1-2.0	0.854
Time to recovery (days)	6	3-12	6	2-15	0.940
Mortality rate (n; percentage)	3/7 42.86%		4/47 8.51%		0.039

CanineCV (-), dogs that tested negative for canine circovirus; CanineCV (+), dogs that tested positive for canine circovirus; CPV, canine parvovirus type 2; n, number of dogs

(Buonavoglia and others 2006, Martella and others 2008, Bodevics and others 2014). A novel circovirus suspected to cause fatal haemorrhagic diarrhoea in dogs was recently described (Li and others 2013, Decaro and others 2014). Aside from directly damaging enterocytes, viral infections might predispose to an overgrowth of clostridial bacteria, which might contribute to the pathogenesis of the disease (Turk and others 1992). Thus, the aim of the present study was to evaluate whether CanineCV might potentially play a role in AHDS in dogs.

By detecting CanineCV in faecal samples of 12/175 dogs, its existence in the German dog population was proven. However, the prevalence of CanineCV detected in faecal samples of dogs diagnosed with AHDS was low and not significantly different compared with that of healthy dogs. Therefore, it could be assumed that it is unlikely that CanineCV is either the primary pathogen of AHDS or the inciting cause of secondary clostridial overgrowth in these patients. However, there is a small chance that in some instances CanineCV infection could be a predisposing factor for secondary bacterial overgrowth. If CanineCV had a very acute disease course, the virus might cause damage to the intestinal barrier, but might be eliminated early after infection and thus, not be detectable by the time the dog shows clinical signs. To clarify this theory, additional antibody measurements in dogs with AHDS and controls might be helpful.

The pathogenicity of CanineCV infection has not yet been clarified. Although several articles reported CanineCV DNA in a subset of dogs with vasculitis, haemorrhage and haemorrhagic enteritis (Li and others 2013, Decaro and others 2014), enteric shedding of CanineCV was also present in a relatively high number of healthy dogs. In a study from the USA, faecal samples from 6.9 per cent of healthy dogs were PCR-positive for CanineCV (Li and others 2013). In the present study, a prevalence of 4.6 per cent in the healthy dog population was determined. Thus, CanineCV might be an incidental finding and represent a non-pathogenic inhabitant of the intestinal microflora. This is supported by the fact that in pigs PCV-1 is also present in asymptomatic animals and generally accepted to be non-pathogenic in that species (Tischer and others 1986, Allan and others 1995). Thus, the detection of CanineCV DNA in the faeces of dogs with diarrhoea does not necessarily implicate that this viral agent is responsible for the clinical signs observed. In addition, not all dogs with haemorrhagic diarrhoea and concomitant CanineCV infection have a fatal outcome. As demonstrated, they can recover from the disease as well.

Dogs with a positive faecal PCR result for CanineCV were significantly younger compared with dogs with a negative test result. This finding can be explained by the fact that most CanineCV-positive dogs originated from the CPV group, which primarily consisted of young patients. The most striking finding of the present study was the detection of an increased mortality rate of dogs suffering from CPV infection that were coinfecting with CanineCV. There are previous reports of enhanced susceptibility to viral infections or increased disease severity in CPV-affected dogs coinfecting with other pathogens (Appel 1988, Pratelli and others 1999). For example, canine enteric coronavirus (CCoV) infection is regarded as a generally mild, self-limiting

infection of the intestinal tract (Tennant and others 1991). However, CCoV can complicate the clinical course of a CPV infection. This could be demonstrated by the fact that the severity of clinical and haematological changes was more pronounced in puppies with concurrent CCoV/CPV infection than in CPV or CCoV mono-infected puppies (Castro and others 2013). The results of the present study suggest that the same phenomenon might occur in CPV-infected patients coinfecting with CanineCV. It is possible that CanineCV is harmless as long as it stays in the gastrointestinal tract, but might become a complicating factor after systemic spread. Viral translocation from the gastrointestinal tract might be enhanced by mucosal damage, which is typically present in CPV enteritis (Goddard and Leisewitz 2010). CanineCV might be able to cause vasculitis, and vascular damage can lead to haemorrhage and lesions in different organs as previously described in dogs with systemic CanineCV infection (Li and others 2013). Although only one dog from the CPV group coinfecting with CanineCV was necropsied in the present study, in this case, CanineCV was detected in its liver. This is in accordance with previous published cases (Li and others 2013, Decaro and others 2014) and shows that CanineCV is able to spread systemically and might have contributed to clinical disease observed in the affected dog.

Moreover, the hypothesis of potentiation of clinical signs by viral coinfections is supported by the fact that in pigs concurrent viral and bacterial infections are important for the expression of PCV-associated disease (Opriessnig and Halbur 2012). In particular, a combined infection of piglets with porcine parvovirus and PCV-2 leads to a disease more severe than that caused by PCV-2 alone (Allan and others 1999, Krakowka and others 2000). Just recently, it was shown that in CanineCV-infected domestic and wild carnivores, coinfections are a frequent finding. More specifically, CanineCV was most frequently detected in CPV-infected dogs (Zaccaria and others 2016). Even though the number of dogs with concurrent CanineCV/CPV infection in this study was small and therefore statistical analysis has to be interpreted with caution, the results of this study suggest that in some dogs with concurrent CanineCV/CPV infection the clinical outcome is worse compared with infection with each individual virus. This hypothesis is supported by just recently published data also suggesting that CPV infection is able to predispose for infection with CanineCV resulting in a more severe clinical course of disease (Thaiwong and others 2016). Since some parameters, such as age, breed, immunity to CPV, duration of illness before being presented to the hospital and treatment, might also have affected the clinical outcome in the present study, further studies are required to understand the exact role of CanineCV in dogs with CPV infection.

In conclusion, CanineCV was detected in the faeces of healthy dogs and dogs with haemorrhagic diarrhoea with a similar frequency. CanineCV does not seem to be involved as a primary causative agent of AHDS in dogs. However, CanineCV might influence the mortality rate in dogs with destruction of the intestinal mucosal barrier, such as in dogs with CPV infection. Further studies are needed to show whether specific environmental factors and/or infectious agents are able and necessary to facilitate systemic viral spreading and development of clinical disease of CanineCV infection.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr Ariel Grubb for her helpful comments on the manuscript.

#### References

- ALLAN, G. M., MEEHAN, B., TODD, D., KENNEDY, S., MCNEILLY, E., ELLIS, J., CLARK, E. G., HARDING, J., ESPUNA, E., BOTNER, A. & CHARREYRE, C. (1998) Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *The Veterinary Record* **142**, 467-468.
- ALLAN, G. M., KENNEDY, S., MCNEILLY, E., FOSTER, J. C., ELLIS, J. A., KRAKOWKA, S. J., MEEHAN, B. M. & ADAIR, B. M. (1999) Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology* **121**, 1-11.

- ALLAN, G. M., MCNEILLY, E., CASSIDY, J. P., REILLY, G. A., ADAIR, B., ELLIS, W. A. & MCNULTY, M. S. (1995) Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology* **44**, 49–64
- ALLAN, G. M., MCNEILLY, E., KENNEDY, S., MEEHAN, B., MOFFETT, D., MALONE, E., ELLIS, J. & KRAKOWKA, S. (2000) PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record* **146**, 711–712
- APPEL, M. J. (1988) Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection? *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician* **83**, 360
- BODEWES, R., LAFÉ, S., HAHN, K., HABIERSKI, A., FORSTER, C., KONIG, M., WOHLSEIN, P., OSTERHAUS, A. D. & BAUMGARTNER, W. (2014) Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. *Veterinary Microbiology* **174**, 1–8
- BUONAVOGLIA, C., DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., CAMPOLO, M., DESARIO, C., CASTAGNARO, M. & TEMPESTA, M. (2006) Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 492–494
- BURROWS, C. (1977) Canine hemorrhagic gastroenteritis. *Journal of the American Animal Hospital Association* **13**, 451–458
- CASTRO, T. X., CUBEL GARCIA RDE, C., GONÇAVES, L. P., COSTA, E. M., MARCELLO, G. C., LABARTHE, N. V. & MENDES-DE-ALMEIDA, F. (2013) Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis. *The Canadian Veterinary Journal = La revue Veterinaire Canadienne* **54**, 885–888
- CLARK, E. G. (1997) Post-weaning wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* **28**, 499–501
- DECARO, N., MARTELLA, V., DESARIO, C., LANAVE, G., CIRCELLA, E., CAVALLI, A., ELIA, G., CAMERO, M. & BUONAVOGLIA, C. (2014) Genomic characterization of a circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. *PLoS ONE* **9**, e105909
- GODDARD, A. & LEISEWITZ, A. L. (2010) Canine parvovirus. *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* **40**, 1041–1053
- GUILFORD, W. G., CENTER, S. A., STROMBECK, D. R., DAVID, A. W. & MEYER, D. (1996) Acute hemorrhagic enteropathy (Hemorrhagic Gastroenteritis: HGE). In *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*, 3 edn. Eds G. W. GRANT, S. D. R. PHILADELPHIA, WB. Saunders. pp 433–435
- HARDING, J. C. (1997) Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): Preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* **28**, 508
- KANTERE, M. C., ATHANASIOU, L. V., SPYROU, V., KYRIAKIS, C. S., KONTOS, V., CHATZOPOULOS, D. C., TSOKANA, C. N. & BILLINIS, C. (2015) Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of Canine Parvovirus under different storage conditions and vaccination status. *Journal of Virological Methods* **215–216**, 52–55
- KAPOOR, A., DUBOVI, E. J., HENRIQUEZ-RIVERA, J. A. & LIPKIN, W. I. (2012) Complete genome sequence of the first canine circovirus. *Journal of Virology* **86**, 7018
- KIM, J., CHUNG, H. K. & CHAE, C. (2003) Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Veterinary Journal (London, England: 1997)* **166**, 251–256
- KRAKOWKA, S., ELLIS, J. A., MEEHAN, B., KENNEDY, S., MCNEILLY, E. & ALLAN, G. (2000) Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology* **37**, 254–263
- LI, L., MCGRAW, S., ZHU, K., LEUTENEGER, C. M., MARKS, S. L., KUBISKI, S., GAFFNEY, P., DELA CRUZ, E. N. JR, WANG, C., DEIDWART, E. & PESAVENTO, P. A. (2013) Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 534–541
- MAPES, S., LEUTENEGER, C. M. & PUSTERLA, N. (2008) Nucleic acid extraction methods for detection of EHV-1 from blood and nasopharyngeal secretions. *The Veterinary Record* **162**, 857–859
- MARTELLA, V., LORUSSO, E., DECARO, N., ELIA, G., RADOGNA, A., D'ARRAMO, M., DESARIO, C., CAVALLI, A., CORRENTE, M., CAMERO, M., GERMINARIO, C. A., Bányai, K., DI MARTINO, B., MARSILIO, F., CARMICHAEL, L. E. & BUONAVOGLIA, C. (2008) Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerging Infectious Diseases* **14**, 1306–1308
- MEEHAN, B. M., MCNEILLY, E., TODD, D., KENNEDY, S., JEWHRIST, V. A., ELLIS, J. A., HASSARD, L. E., CLARK, E. G., HAINES, D. M. & ALLAN, G. M. (1998) Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *The Journal of General Virology* **79**, 2171–2179
- MEHDIZADEH GOHARI, I., PARREIRA, V. R., NOWELL, V. J., NICHOLSON, V. M., OLIPHANT, K. & PRESCOTT, J. F. (2015) A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE* **10**, e0122684
- MORTIER, F., STROHMEYER, K., HARTMANN, K. & UNTERER, S. (2015) Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. *The Veterinary Record* **176**, 627
- OPRIESSNIG, T. & HALBUR, P. G. (2012) Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Research* **164**, 20–32
- PRATELLI, A., TEMPESTA, M., ROPERTO, F. P., SAGAZIO, P., CARMICHAEL, L. & BUONAVOGLIA, C. (1999) Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* **11**, 550–553
- PROKSCH, A. L., UNTERER, S., SPECK, S., TRUYEN, U. & HARTMANN, K. (2015) Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. *Veterinary Journal (London, England: 1997)* **204**, 304–308
- PROKSCH, A. L., UNTERER, S., TRUYEN, U. & HARTMANN, K. (2014) Efficacy of the paramunity inducer PIND-ORF in the treatment of canine parvovirus infection. *Veterinary Journal* **202**, 340–347
- PUSTERLA, N., WILSON, W. D., MAPES, S. & LEUTENEGER, C. M. (2007) Diagnostic evaluation of real-time PCR in the detection of *Rhodococcus equi* in faeces and nasopharyngeal swabs from foals with pneumonia. *The Veterinary Record* **161**, 272–275
- ROSELL, C., SEGALÉS, J., RAMOS-VARA, J. A., FOLCH, J. M., RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M., DURAN, C. O., BALASCH, M., PLANA-DURÁN, J. & DOMINGO, M. (2000) Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record* **146**, 40–43
- 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
- SEGALÉS, J. (2012) Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research* **164**, 10–19
- TENNANT, B. J., GASKELL, R. M., KELLY, D. E., CARTER, S. D. & GASKELL, C. J. (1991) Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Research in Veterinary Science* **51**, 11–18
- THAIWONG, T., WISE, A. G., MAES, R. K., MULLANEY, T. & KIPEL, M. (2016) Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual Infections in a Papillon Breeding Colony. *Veterinary Pathology* **53**, 1204–1209
- TISCHER, I., MIELDS, W., WOLFE D., VAGT, M. & GRIEM, W. (1986) Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology* **91**, 271–276
- TISCHER, I., RASCH, R. & TOCHTERMANN, G. (1974) Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Series A* **226**, 153–167
- TURK, J., FALES, W., MILLER, M., PACE, L., FISCHER, J., JOHNSON, G., KREEGER, J., TURNQUIST, S., PITTMAN, L., ROTTINGHAUS, A. & GOSSER, H. (1992) Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987–1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **200**, 991–994
- UNTERER, S., BUSCH, K., LEIPIG, M., HERMANN, W., WOLF, G., STRAUBINGER, R. K., MUELLER, R. S. & HARTMANN, K. (2014) Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **28**, 52–58
- UNTERER, S. & HARTMANN, K. (2009) Akuter blutiger Durchfall beim Hund – Ursachen und diagnostische Aufarbeitung. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* **37**, 261–268
- UNTERER, S., STROHMEYER, K., KRUSE, B. D., SAUTER-LOUIS, C. & HARTMANN, K. (2011) Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **25**, 973–979
- WEESE, J. S., STAEMPELLI, H. R., PRESCOTT, J. F., KRUTH, S. A., GREENWOOD, S. J. & WEESE, H. E. (2001) The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **15**, 374–378
- ZACCARIA, G., MALATESTA, D., SCIPIONI, G., DI FELICE, E., CAMPOLO, M., CASACCIA, C., SAVINI, G., DI SABATINO, D. & LORUSSO, A. (2016) Circovirus in domestic and wild carnivores: an important opportunistic agent? *Virology* **490**, 69–74



## IV. DISKUSSION

Obwohl das AHDS bereits seit langem als klinisches Syndrom bekannt ist, wurde sein Auslöser bis heute nicht eindeutig identifiziert. Bekannt ist, dass Hunde mit AHDS eine Dysbiose der intestinalen Mikrobiota aufweisen (SUCHODOLSKI et al., 2012). Besonders das Wachstum von *C. perfringens* ist bei Hunden mit AHDS im Vergleich zu gesunden Hunden deutlich erhöht (SUCHODOLSKI et al., 2012). Die Beteiligung von *C. perfringens* am Krankheitsgeschehen des AHDS und die bakterielle Überwucherung in allen Darmabschnitten konnte in der Endoskopiestudie von UNTERER und Mitarbeitern (2014) aufgezeigt werden (UNTERER et al., 2014). Die betroffenen Hunde wiesen eine akute Schleimhautnekrose und neutrophile Infiltration der Darmschleimhaut auf. Die entnommenen Gewebeproben der AHDS-Patienten und gesunden Kontrollhunde wurden histologisch, immunhistochemisch und kulturell untersucht. Alle Hunde mit AHDS wiesen eine Überwucherung mit *Clostridium* spp. auf. Bei sechs von neun Hunden wurden diese als *C. perfringens* spezifiziert. Hingegen konnte lediglich bei einem der elf Kontrollhunde *C. perfringens* mittels Kultur nachgewiesen werden. Histologisch konnten bei diesen Hunden keine Bakterienrasen auf der Schleimhautoberfläche festgestellt werden (UNTERER et al., 2014). Vor kurzem konnten *C. perfringens* Stämme vom Typ A bei einem Hund mit AHDS identifiziert werden, welche für porenformende Toxine codieren. Diese porenformenden Toxine, die als NetE und NetF bezeichnet werden, sind in der Lage Zellen zu schädigen und werden als Ursache für die Epithelschädigung, die im Rahmen des AHDS auftreten, diskutiert (MEHDIZADEH GOHARI et al., 2015). Ob die Überwucherung mit *C. perfringens* den Auslöser oder die Folge der Erkrankung darstellt (UNTERER et al., 2014), beispielsweise durch virale Vorschädigung und sekundäre bakterielle Überwucherung, bleibt ungeklärt. Bei an Parvovirose verstorbenen, obduzierten Welpen konnten in 98,0 % der Fälle bakteriologisch Clostridien nachgewiesen werden (TURK et al., 1992). Eine Sekundärbesiedlung durch virale Vorschädigung sollte deswegen in Betracht gezogen werden.

Erst kürzlich wurde das neu entdeckte CanineCV als Mitglied der Familie *Circoviridae* vom ICTV anerkannt (ROSARIO et al., 2017). Nach seiner

Entdeckung im Jahre 2012 (KAPOOR et al., 2012) konnte es bei einzelnen Individuen, aber auch bei Ausbrüchen mit mehreren betroffenen Hunden, mit teils schweren gastrointestinalen Störungen detektiert werden (LI et al., 2013; DECARO et al., 2014; HSU et al., 2016; THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016). Trotz der Forschungsergebnisse der letzten Jahre bleibt bislang unklar, welche Bedeutung das CanineCV als Pathogen in der Tiermedizin, insbesondere beim Hund, besitzt.

Ziel dieser Studie war es deshalb herauszufinden, ob das CanineCV am Krankheitsgeschehen des AHDS bei Hunden beteiligt sein könnte. Hierzu wurden Kotproben von 55 Hunden mit AHDS, 66 gesunden Kontrollhunden und 54 Hunden mit Parvovirose, die als zweite Kontrollgruppe dienten, auf das Vorhandensein des CanineCV mittels real-time TaqMan<sup>®</sup> PCR untersucht. Außerdem erfolgte eine Auswertung von Signalement, Mortalitätsrate und Zeit bis zur vollständigen Genesung. Diese Daten sollten Aufschluss über die klinische Relevanz einer Infektion mit diesem Virus geben.

Die Ausbreitung des CanineCV konnte bereits in verschiedenen Kontinenten, wie Nordamerika, Europa und Asien, aufgezeigt werden (LI et al., 2013; DECARO et al., 2014; HSU et al., 2016). In Europa beschränken sich die Berichte bislang auf Italien (DECARO et al., 2014; ZACCARIA et al., 2016). In Italien konnte das Virus auch bei wildlebenden Caniden, im Speziellen bei Wölfen und Dachsen, nachgewiesen werden (ZACCARIA et al., 2016). Anhand der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass dieses Virus auch in der deutschen Hundepopulation vorkommt. In der Studienpopulation befanden sich positiv auf das CanineCV getestete Hunde, bei denen anamnestisch ausgeschlossen werden konnte, dass sie Deutschland zuvor verlassen hatten. Einige Hunde mit einem positiven Testergebnis stammten jedoch nicht aus Deutschland, hatten bereits einen Aufenthalt im Ausland oder wiesen eine unbekanntere Herkunft auf. Rumänien, Polen, Ungarn und Spanien zählten zu den von den Besitzern im Vorbericht genannten Ländern. Die Möglichkeit einer bestehenden Infektionsgefahr für das CanineCV in anderen europäischen Ländern, außer Italien und Deutschland, erscheint sehr wahrscheinlich.

Um die Fragestellung nach einer möglichen Beteiligung des CanineCV bei Hunden mit AHDS beantworten zu können, erfolgte ein Vergleich der Prävalenz zwischen den drei Patientengruppen. Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten darauf

hin, dass das CanineCV nicht der primäre Erreger des AHDS bei Hunden ist. Die Häufigkeit, mit der es bei am AHDS leidenden Hunden detektiert werden konnte, war gering und nicht signifikant höher als jene von gesunden Kontrolltieren oder Hunden mit Parvovirose. Diese Aussage ist jedoch dadurch limitiert, dass nicht genau bekannt ist, wie lange das CanineCV nach einer Infektion im Kot von Patienten mit Durchfall nachgewiesen werden kann. Es wäre denkbar, dass es bei einer akut verlaufenden Infektion möglicherweise zu einem falsch negativen Testergebnis kommen könnte, wenn bis zum Auftreten klinischer Symptome bzw. bis zur Vorstellung des Hundes beim Tierarzt das Virus bereits wieder eliminiert worden ist.

Die Resultate dieser Studie lassen vermuten, dass das CanineCV nicht generell der Wegbereiter für eine Überbesiedelung mit *C. perfringens* im Rahmen des AHDS ist. Jedoch ist nicht gänzlich auszuschließen, dass in den wenigen Fällen, bei denen eine Infektion mit dem CanineCV vorliegt, es zu einer Veränderung der intestinalen Mikrobiota mit einer sekundär bakteriellen Überwucherung durch Clostridien kommen kann. Diese Fragestellung kann mit dem gewählten Design dieser Studie derzeit nicht beantwortet werden.

Das CanineCV ist in der Vergangenheit bei verschiedenen Ausbrüchen von teils schweren gastrointestinalen Störungen beim Hund als alleiniges Pathogen nachgewiesen worden (LI et al., 2013; DECARO et al., 2014). Die ermittelte Prävalenz einer CanineCV-Infektion bei Hunden mit Durchfall lag zwischen 11,3 % (LI et al., 2013) und 28,0 % (HSU et al., 2016), bei jenen mit AHDS hingegen nur bei 3,6 %. In Taiwan konnte bei Hunden mit Durchfall, die nachweislich mindestens ein gastrointestinales Pathogen aufwiesen, das CanineCV als der häufigste Erreger identifiziert werden (HSU et al., 2016). Diese Hunde hatten häufiger eine alleinige Infektion mit dem CanineCV als Mischinfektionen mit zusätzlichen Erregern (HSU et al., 2016). Diese Beobachtungen widersprechen den Ergebnissen vorheriger Studien, bei denen das CanineCV vor allem in Form einer Mischinfektion auftrat (LI et al., 2013; THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016). Die Häufigkeit einer zusätzlichen Infektion mit mindestens einem weiteren Erreger betrug zwischen 68,4 % (LI et al., 2013) und 100 % (ZACCARIA et al., 2016). Besonders oft konnte eine Koinfektion mit dem CPV-2 (THAIWONG et al., 2016; ZACCARIA et al., 2016) und dem CDV (ZACCARIA et al., 2016) festgestellt werden. Bei den von THAIWONG und

Mitarbeitern (2016) beschriebenen Ausbrüchen in einer Papillonzucht konnte bei allen untersuchten Tieren eine Mischinfektion des CanineCV mit dem CPV-2 nachgewiesen werden (THAIWONG et al., 2016). Interessanterweise zeigten sich klinisch wie auch histologisch deutliche Anzeichen einer Parvovirose, obwohl ein Teil der Tiere aktuell gegen das CPV-2 geimpft war. Bei den betroffenen Hunden gelang es, CPV-2-Antigen in den nekrotischen Krypten des Dünndarms zu identifizieren. Es wurde angenommen, dass das CPV-2 und nicht das CanineCV der Auslöser für das Erbrechen und den blutigen Durchfall dieser Hunde darstellte. Jedoch zeigten sich große Mengen an CanineCV-Nukleinsäure in Bereichen mit lymphatischer Nekrose und innerhalb von Makrophagen in herdförmigen, granulomatösen Entzündungen. Diese Läsionen schienen durch die Infektion mit dem CanineCV hervorgerufen zu sein (THAIWONG et al., 2016). Das Auftreten von granulomatösen Entzündungen, nekrotisierender Vaskulitis und Blutungen bei den betroffenen Tieren könnte, wie beim PCV-2, charakteristisch für das CanineCV sein (HARDING und CLARK, 1997; THIBAUT et al., 1998; ROSELL et al., 1999; LI et al., 2013; THAIWONG et al., 2016). Unklar bleibt jedoch, ob eine primäre Infektion mit dem CPV-2 Wegbereiter für eine nachfolgende Vermehrung des CanineCV darstellt. Andererseits könnte auch eine Infektion mit dem CanineCV zu Immunsuppression und sekundärer CPV-2-Infektion führen (THAIWONG et al., 2016).

In der Studie von ZACCARIA und Mitarbeitern (2016) zeigten sieben der insgesamt acht positiv auf das CanineCV getesteten Hunde eine Koinfektion mit dem CPV-2 (ZACCARIA et al., 2016). In der hier vorliegenden Studie lag die Prävalenz des CanineCV bei Hunden mit Parvovirose bei 13,0 %. Bei Schweinen wird einer Koinfektion mit dem *Porcine parvovirus* (PPV) oder einer vorangegangenen Immunstimulation eine mögliche Schlüsselfunktion in der Pathogenese des PMWS zugesprochen (HA et al., 2008). Die Prävalenz einer Mischinfektion vom PCV-2 und dem PPV lag bei etwa 17,0 % (ELLIS et al., 2000). Experimentell mit dem PCV-2 und dem PPV infizierte Schweine zeigten bei Vorliegen einer Mischinfektion mit diesen Erregern eine schwerwiegendere Krankheit als bei einer Einzelinfektionen (ALLAN et al., 1999). Im Allgemeinen gilt, dass das Auftreten und der Ausprägungsgrad von Krankheitszeichen einer PCV-2-Infektion von zusätzlichen viralen Erregern wie dem PPV (KENNEDY et al., 2000; KRAKOWKA et al., 2000), bakteriellen Erregern und Umweltfaktoren

beeinflusst werden (ALLAN und ELLIS, 2000). Auch die Ausprägung histologischer Veränderungen des PMWS nimmt bei einer zusätzlichen viralen Infektion, wie mit dem PPV, zu (ALLAN et al., 1999; KENNEDY et al., 2000).

Die vorliegende Studie beschreibt ähnliche Beobachtungen wie bei einer PCV-2-Infektion, denn es konnte eine signifikant höhere Mortalitätsrate beim Vorliegen einer Koinfektion mit dem CanineCV bei den mit dem CPV-2 infizierten Hunden nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass das CanineCV in der Lage ist eine Infektion mit dem CPV-2 zu verschlimmern. In der Studie von LI und Mitarbeitern (2013) wurde CanineCV-DNA in lymphatischen Geweben, eine Erniedrigung der Lymphozytenzahl und eine Nekrose des lymphatischen Gewebes (Peyersche Platten, Lymphknoten und Milz) in den histologischen Präparaten nachgewiesen (LI et al., 2013). Das könnte auf das Vorliegen einer Immunsuppression der CanineCV-infizierten Hunde hindeuten (HSU et al., 2016). Jedoch ist die Aussagekraft über die Beeinflussung der Mortalitätsrate bei Hunden mit einer CPV-2-Infektion durch eine Koinfektion mit dem CanineCV aufgrund der niedrigen Fallzahl der hiervon betroffenen Hunde dieser Studie limitiert.

Es ist weiterhin auch möglich, dass die Vorschädigung der Darmschleimhaut durch das CPV-2 dazu führt, dass die sonst asymptomatisch oder mild verlaufende CanineCV-Infektion einen schwereren Verlauf nimmt. So verhält es sich beispielsweise auch bei einer CCoV-Infektion. Die Infektion mit dem CCoV führt üblicherweise zu einer milden, selbstlimitierenden Erkrankung des Gastrointestinaltraktes (TENNANT et al., 1991). Bei einer vorherigen Infektion mit dem CPV-2 kann es dann jedoch zu einem letalen Verlauf einer CCoV-Infektion kommen (PRATELLI et al., 1999). Generell gilt, dass das Vorliegen mehrerer potentiell pathogener, gastrointestinaler Erreger bei Hunden mit Durchfall häufiger zu beobachten ist als bei asymptomatischen Hunden. Das Vorliegen einer Mischinfektion impliziert jedoch nicht immer, dass die Mortalitätsrate, die Schwere und die Dauer der Erkrankung im Vergleich zu einer Einzelinfektion zwingenderweise erhöht wären (GIZZI et al., 2014).

In der Studie von THAIWONG und Mitarbeitern (2016) wird trotz der nachgewiesenen histologischen Veränderungen die Hypothese diskutiert, dass die vorliegende Infektion mit dem CPV-2 eventuell eine Replikation des CanineCV in lymphatischen Geweben ermöglicht, ohne dass dies klinische Auswirkungen habe (THAIWONG et al., 2016). Auch von anderer Seite wird die Rolle als

opportunistischer Erreger für das CanineCV diskutiert (ZACCARIA et al., 2016). Ob es bei einer Einzelinfektion zum Ausbleiben von Symptomen und histopathologischen Veränderungen kommt, solange das Virus lediglich im Gastrointestinaltrakt verbleibt, ist bislang unklar. Möglicherweise sind zusätzliche Faktoren notwendig damit es zur Virämie kommen kann. Diese Hypothese wird durch den Nachweis von CanineCV-DNA bei gesunden Hunden untermauert. Die Häufigkeit, mit der das Virus bei asymptomatischen Hunden nachgewiesen werden konnte, lag bei 6,9 % (LI et al., 2013). Eine vergleichbare Prävalenz zeigte die in dieser Arbeit untersuchte Population klinisch gesunder Hunde (4,6 %). Zudem ist die nachgewiesene Apathogenität des PCV-1 zu beachten (TISCHER et al., 1986; ALLAN et al., 1995), das eng mit dem CanineCV verwandt ist (LI et al., 2013). Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Studie ist die fehlende Beeinflussung des CanineCV auf die Dauer des Genesungsprozesses der Patienten mit Parvovirose. Der Medianwert betrug bei den Hunden mit CPV-2-Infektion mit und ohne Koinfektion mit dem CanineCV jeweils sechs Tage. Auf eine Auswertung der Zeit bis zur Genesung zwischen den AHDS-Patienten mit und ohne zusätzlicher CanineCV-Infektion wurde wegen der geringen Anzahl an positiv getesteten Hunden verzichtet.

Verschiedene Studien belegen somit, dass das Vorliegen des CanineCV nicht generell zu Symptomen führen muss. Die vorliegende Arbeit zeigt zudem, dass der Krankheitsverlauf in der Regel durch eine CanineCV-Infektion nicht beeinflusst wird. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Todesrate unter Hunden mit einer Parvovirose höher war, wenn das CanineCV nachgewiesen wurde. Möglicherweise kommt es nur unter bestimmten Bedingungen zu einer systemischen Infektion und dem Auftreten von Krankheitszeichen einer CanineCV-Infektion (ZACCARIA et al., 2016). Es ist denkbar, dass das Virus erst aufgrund einer Schädigung der Darmbarriere in den Blutstrom übertreten kann und zu einer systemischen Erkrankung führt. Ein ähnliches Phänomen wird bei einer Coronavirusinfektion bei Katzen beobachtet. Diese Viruserkrankung verursacht in der Regel keine klinischen Symptome (KIPAR et al., 2010). In manchen Fällen können gastrointestinale Störungen auftreten (KIPAR et al., 1998). Kommt es jedoch zu einer Mutation der Coronaviren, erlangen sie die Fähigkeit eine systemische Entzündungsreaktion im Organismus auszulösen, die vorwiegend durch eine Vaskulitis geprägt ist (KIPAR et al., 2005; PEDERSEN, 2009). Auch bei symptomatischen Hunden, bei denen das

CanineCV in verschiedenen Organen nachgewiesen werden konnte, wurden Gefäßentzündungen gefunden (LI et al., 2013). Weitere Studien sind notwendig, um heraus zu arbeiten, welche Faktoren notwendig sind, damit es zu einer systemischen Erkrankung kommen kann.

In der Studie von THAIWONG und Mitarbeitern (2016) wurden Vollblut-, Serum- und Kotproben von drei Hunden einer Papillonzucht auf das Vorhandensein des CanineCV untersucht. Diese Hunde hatten zuvor einen Krankheitsausbruch einer Mischinfektion mit dem CanineCV und dem CPV-2 überlebt. Die Proben wurden einen Monat bzw. ein Jahr nach dem Ausbruch gesammelt. Während das Virus in den Kotproben nicht nachgewiesen werden konnte, gelang es sehr niedrige Ct-Werte für das CanineCV in den Vollblut- und Serumproben zu ermitteln. Dies deutete auf eine hohe Virusmenge hin. Das Maß der vorhandenen Virusmenge im Blut schien den Schweregrad der Erkrankung des CanineCV nicht direkt wider zu spiegeln (THAIWONG et al., 2016). Beim Schwein hingegen konnte ein Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen Virusmenge an PCV-2 im Blut und der Schwere der klinischen Symptome des PMWS aufgezeigt werden (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004).

Die mit dem CanineCV infizierten Hunde der in dieser Arbeit untersuchten Population waren signifikant jünger als jene mit einem negativen Testergebnis. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass ein Großteil der CanineCV-positiven Hunde aus der Gruppe mit CPV-2-Infektion stammten, welche signifikant jünger waren als jene aus der AHDS- oder gesunden Kontrollgruppe. Es ist bekannt, dass von einer Infektion mit dem CPV-2 besonders Welpen im Alter bis zu sechs Monaten betroffen sind (GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Prädisponierende Faktoren, die eine CPV-2-Infektion bei Welpen begünstigen, sind fehlende schützende Immunität, intestinale Parasiten und überbelegte, unhygienische und stressreiche Umweltbedingungen (GODDARD und LEISEWITZ, 2010). Für die Replikation benötigt das CPV-2 Zellen mit einer hohen Mitoserate (LENGHAUS und STUDDERT, 1984). Gleiches gilt, aufgrund ihrer eingeschränkten Fähigkeit selbstständig Proteine zu codieren, auch für Circoviren (TODD, 2000). Eine ähnliche Erklärung für ihre Beobachtungen hinsichtlich der Altersverteilung diskutierten auch ZACCARIA und Mitarbeiter (2016), bei denen 13 der 18 positiv auf das CanineCV getesteten Tiere (7/8 Hunden, 6/9 Wölfen und 0/1 Dachs) unter einem Jahr alt waren (ZACCARIA et al., 2016). Auch in der Studie von HSU und

Mitarbeitern (2016) konnte das CanineCV häufiger bei jungen Hunden (medianes Alter: 1 Jahr) identifiziert werden, die gastrointestinale Störungen aufwiesen. Damit war das Alter der Hunde mit nachgewiesenem CanineCV und dem Symptom Durchfall signifikant niedriger als das der klinisch gesunden Hunde (medianes Alter: fünf Jahre) (HSU et al., 2016).

Die unterschiedlichen Resultate der bisher ermittelten Prävalenzen von CanineCV-Infektionen gesunder Hunde und solcher mit gastrointestinalen Störungen könnte möglicherweise durch die Wahl des verwendeten Probenmaterials beeinflusst worden sein. In der Studie von THAIWONG und Mitarbeitern (2016) konnte in nachträglich untersuchten Vollblut- und Serumproben von drei Hunden, die bei einem Ausbruch einer schweren Gastroenteritis überlebten, sehr niedrige Ct-Werte für das CanineCV detektiert werden. Hingegen misslang der Nachweis aus den Kotproben dieser Hunde mittels real-time PCR (THAIWONG et al., 2016). Eine Aussage darüber, ob das CanineCV eventuell intermittierend über den Kot ausgeschieden wird, ist bislang nicht zu treffen. Eine Untersuchung aus Vollblut- oder Serumproben bei Verdacht auf das Vorliegen einer CanineCV-Infektion sollte in Erwägung gezogen werden. Die alleinige Untersuchung von Kotproben der in dieser Arbeit untersuchten Studienpopulationen ist somit als mögliche Limitation zu betrachten. Es ist bislang ungewiss, ob eine lange Aufbewahrung oder die Lagerung bei sehr niedrigen Temperaturen die Ergebnisse der verwendeten real-time TaqMan<sup>®</sup> PCR beeinflussen könnten. Jedoch liegen derzeit keine Hinweise hierfür vor. Zudem ist es möglich, dass die Prävalenzen abhängig von der beprobten Population auf den unterschiedlichen Kontinenten variieren.

Anders als bei bisherigen Studien konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Körpergewichtes zwischen den drei Patientengruppen nachgewiesen werden. Frühere Untersuchungen zeigten ein signifikant niedrigeres Körpergewicht der Hunde mit AHDS im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (MORTIER et al., 2015; UNTERER et al., 2015). Dies könnte damit erklärt werden, dass eine Rasseprädisposition besonders kleiner Rassen, wie Yorkshire Terrier, Malteser, Zwergpinscher und –schnauzer, beschrieben wurde (MORTIER et al., 2015). Die Auswertung des Signalements zeigte auch in der hier untersuchten AHDS-Gruppe ein gehäuftes Auftreten kleiner Hunderassen, wie Malteser und Yorkshire Terrier. Jedoch wurden in dieser Studie zudem Hunde mit einer Parvovirose, die in der Regel sehr jung sind und somit noch ein niedriges

Körpergewicht aufweisen, als Kontrollgruppe verwendet. Demnach ist es verständlich, dass kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Körpergewichtes zwischen der AHDS- und CPV-2-Gruppe vorlag.

Die geringe Fallzahl an CanineCV-infizierten Patienten dieser Studie limitiert die Aussagekraft hinsichtlich der klinischen Relevanz dieser Infektionserkrankung. Eine insgesamt höhere Anzahl an CanineCV-infizierten Hunden könnte nähere Erkenntnisse zur Altersverteilung, Mortalitätsrate und Zeit bis zur vollständigen Genesung von Hunden mit und ohne CanineCV-Infektion liefern. Um eine statistisch und auch klinisch wertvolle Aussage über die Bedeutung einer Infektion mit CanineCV treffen zu können, sind weitere Studien notwendig. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf Hunde mit einer CanineCV/CPV-2-Mischinfektion gelegt werden. Die Untersuchung eines möglichen Zusammenspiels dieser beiden Viren wäre wichtig, um die in dieser Studie gesammelten Hinweise zu bestätigen, dass das CanineCV einen Einfluss auf die Mortalitätsrate bei Hunden mit Parvovirose besitzt.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz großer diagnostischer Bemühungen bleibt die Frage nach der Ursache von akuten hämorrhagischen Durchfällen beim Hund häufig unbeantwortet. Bei diesen Patienten wird der Ausdruck „Akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom“ verwendet. Es ist bekannt, dass *Clostridium perfringens* am Krankheitsgeschehen des akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndroms beteiligt ist. Es wird jedoch diskutiert, ob *Clostridium perfringens* erst in Folge einer Beeinträchtigung der normalen Mikrobiota des Darmes fähig ist sich auszubreiten und sich möglicherweise nur an die Darmschleimhaut anheften kann, nachdem diese, beispielsweise durch Viren, eine Vorschädigung erlitten hat. Das canine Circovirus wurde bei Hunden mit starkem hämorrhagischem Durchfall beschrieben. Obwohl die genaue Pathogenität bislang ungeklärt ist, könnte es als primärer Auslöser des akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndroms oder als Wegbereiter für eine sekundäre Überwucherung mit *Clostridium perfringens* bei diesen Patienten in Frage kommen.

Das Ziel dieser Studie war es deshalb herauszufinden, ob das canine Circovirus am Krankheitsgeschehen des akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndroms beteiligt ist. Hierzu sollte die Prävalenz einer Infektion mit dem caninen Circovirus bei Hunden, die am akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom leiden, gesunden Kontrollhunden und Hunden mit einer Parvovirusinfektion, die als zweite Kontrollgruppe dienten, verglichen werden. Zudem sollte ein Vergleich der Zeit bis zur vollständigen Genesung und der Mortalitätsrate zwischen Hunden mit und ohne Nachweis vom caninen Circovirus erfolgen. Alle Hunde dieser Studie wurden in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zwischen 2006 und 2014 vorgestellt. Es wurden 55 Kotproben von Hunden mit akutem hämorrhagischem Diarrhoe-Syndrom inkludiert. Als gesunde Kontrollgruppe dienten 66 Hunde, die in den vier Wochen vor Probennahme keinerlei gastrointestinale Störungen aufwiesen. Insgesamt 54 Hunde mit einer Parvovirusinfektion dienten als zweite Kontrollgruppe. Zum Nachweis des caninen Circovirus wurden alle 175 Kotproben mittels zwei real-time TaqMan® PCR Assays, welche das Kapsid- und Replikase-Gen nachwiesen, und bereits von LI und Mitarbeitern (2013) beschrieben wurden, in einem kommerziellen Labor untersucht. Die Prävalenz des caninen Circovirus wurde zwischen den drei

Patientengruppen verglichen. Zudem erfolgte ein Vergleich hinsichtlich Signalement, Mortalitätsrate und Zeit bis zur Genesung zwischen den Parvovirosepatienten mit und ohne Koinfektion mit dem caninen Circovirus.

Das canine Circovirus wurde in den Kotproben von zwei Hunden mit akutem hämorrhagischem Diarrhoe-Syndrom (3,6 %), drei gesunden Kontrolltieren (4,6 %) und sieben Hunden mit Parvovirose (13,0 %) nachgewiesen. Der Unterschied der Prävalenzen war nicht statistisch signifikant. Diese Studie untermauert somit vorherige Beobachtungen, dass auch bei gesunden Hunden das canine Circovirus im Kot gefunden werden kann. Das bedeutet, dass eine Infektion mit diesem Virus nicht grundsätzlich zu Symptomen führen muss. Da die Prävalenz des caninen Circovirus bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Diarrhoe-Syndrom niedrig und nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren war, ist es wahrscheinlich, dass es weder der Primärerreger des akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndroms, noch der Wegbereiter für eine Überwucherung mit Clostridien bei diesen Patienten ist. Die Mortalitätsrate der Parvovirosepatienten mit Koinfektion mit dem caninen Circovirus war signifikant höher als die der Hunde mit einer Einzelinfektion mit dem caninen Parvovirus. In dieser Studie konnten erstmals Hinweise gesammelt werden, dass das canine Circovirus einen Einfluss auf die Mortalitätsrate von Hunden mit einer gestörten Darmschranke, wie beim Vorliegen einer Parvovirose, zu haben scheint. Da die Anzahl der Hunde mit einer Mischinfektion mit dem caninen Circovirus und Parvovirus nur gering war, ist diese Beurteilung jedoch mit einer gewissen Vorsicht zu interpretieren. Weitere Studien sind erforderlich um herauszufinden, ob spezifische Umweltfaktoren oder Erreger fähig und notwendig sind, um eine systemische Infektion und klinische Symptome einer Infektion mit dem caninen Circovirus hervorzurufen.

Abschließend kann gesagt werden, dass das canine Circovirus auch im Kot von gesunden Hunden in Deutschland vorkommen kann. Die Prävalenz des caninen Circovirus zwischen gesunden Hunden und jenen mit dem akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom war nicht signifikant unterschiedlich. Dieses Virus scheint somit nicht am Krankheitsgeschehen des akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndroms beteiligt zu sein. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine Infektion mit dem caninen Circovirus die Mortalitätsrate bei Hunden mit einer gestörten Darmbarriere, wie beim Vorliegen einer Parvovirose, erhöhen kann.

## VI. SUMMARY

Despite extensive diagnostic investigations, the inciting cause of acute haemorrhagic diarrhoea in dogs frequently remains unknown. In these dogs, a diagnosis of “acute haemorrhagic diarrhoea syndrome” is established. There is strong evidence that *Clostridium perfringens* is involved in the disease process of dogs with acute haemorrhagic diarrhoea syndrome. It has been discussed that clostridial species proliferate secondarily in response to disruption of the normal gastrointestinal microbiota, and might only be able to adhere to the intestinal mucosa after destruction of the intestinal lining by other primary causes such as viral agents. Canine circovirus has been detected in dogs with severe haemorrhagic diarrhoea. Although its pathogenic role is unclear, canine circovirus might represent the primary pathogen of acute haemorrhagic diarrhoea syndrome or the inciting cause of secondary clostridial overgrowth in these patients.

This study aimed to determine whether canine circovirus might be involved in the disease process of acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. For this purpose, the prevalence of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea syndrome was compared to that in healthy dogs and those infected with canine parvovirus, which served as a second control group. Furthermore, time to recovery and mortality rate were compared between dogs with and without canine circovirus infection. All patients included had been presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany between 2006 and 2014. Fifty-five faecal samples from dogs diagnosed with acute haemorrhagic diarrhoea syndrome were included. Sixty-six healthy dogs without any history of gastrointestinal disorders within the four weeks prior to sampling were included in the healthy control group. Fifty-four dogs infected with canine parvovirus served as second control group. In order to detect canine circovirus, a total of 175 faecal samples was examined by two real-time TaqMan<sup>®</sup> PCR assays from a commercial laboratory targeting the replicase gene and the capsid gene as previously described by Li and others (2013). The prevalence of canine circovirus infections was compared between the three patient groups. Additionally, canine parvovirus infected patients with and without canine circovirus co-infection were compared regarding signalment, mortality rate, and time to recovery.

Canine circovirus was detected in faecal samples of two dogs with acute haemorrhagic diarrhoea syndrome (3.6 %), three healthy controls (4.6 %) and seven dogs infected with canine parvovirus (13.0 %). Among the three groups, there was no significant difference in prevalence of canine circovirus. These results are consistent with previous observations and show that canine circovirus can also be found in faeces of healthy dogs. This implicates that an infection with this virus not necessarily leads to clinical disease. The prevalence of canine circovirus detected in faecal samples from dogs diagnosed with acute haemorrhagic diarrhoea syndrome was low and not significantly different compared to that in healthy dogs. Therefore, it is unlikely that canine circovirus is either the primary pathogen of acute haemorrhagic diarrhoea syndrome or the inciting cause of secondary clostridial overgrowth in these patients. The mortality rate of patients with canine parvovirus infection co-infected with canine circovirus was significantly higher compared to canine parvovirus infected dogs without canine circovirus co-infection. There is evidence, that canine circovirus might influence the mortality rate in dogs with destruction of the intestinal mucosal barrier, such as with canine parvovirus infection. Because the number of dogs with concurrent infection with canine circovirus and canine parvovirus in this study was small, statistical analysis has to be interpreted with caution. Further studies are needed to show whether specific environmental factors and/or infectious agents are able and necessary to facilitate systemic viral spreading and development of clinical disease of canine circovirus infection.

In conclusion, canine circovirus can also be found in faeces of healthy dogs in Germany. Canine circovirus was detected in the faeces of healthy dogs and dogs with haemorrhagic diarrhoea with a similar frequency. Therefore, this virus does not seem to be involved as a primary causative agent of acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. However, canine circovirus might influence the mortality rate in dogs with destruction of the intestinal mucosal barrier, such as in dogs with canine parvovirus infection.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, Reilly GA, Adair B, Ellis WA, McNulty MS. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology* 1995; 44: 49-64.

Allan GM, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, Espuna E, Botner A, Charreyre C. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *The Veterinary Record* 1998a; 142: 467-8.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1998b; 10: 3-10.

Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology* 1999; 121: 1-11.

Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12: 3-14.

Allan GM, McNeilly E, Kennedy S, Meehan B, Moffett D, Malone F, Ellis J, Krakowka S. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record* 2000; 146: 711-2.

Appel MJ. Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection? *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician* 1988; 83: 360-66.

Biagini P, Bendinelli M, Hino S, Kakkola L, Mankertz A, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Teo GC, Todd D. Family *Circoviridae*. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International*

Committee on Taxonomy of Viruses: Elsevier 2012: 343-9.

Bodewes R, Lapp S, Hahn K, Habierski A, Forster C, König M, Wohlsein P, Osterhaus AD, Baumgartner W. Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. *Veterinary Microbiology* 2014; 174: 1-8.

Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 2004; 122: 171-8.

Brunborg IM, Jonassen CM, Moldal T, Bratberg B, Lium B, Koenen F, Schonheit J. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2007; 19: 368-75.

Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Desario C, Castagnaro M, Tempesta M. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12: 492-4.

Burrows C. Canine hemorrhagic gastroenteritis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1977; 13: 451-8.

Castro TX, Cubel Garcia Rde C, Goncalves LP, Costa EM, Marcello GC, Labarthe NV, Mendes-de-Almeida F. Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis. *The Canadian Veterinary Journal* 2013; 54: 885-8.

Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Veterinary Journal* 2004; 168: 41-9.

Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Veterinary Journal* 2005; 169: 326-36.

Chiou MT, Yang CY, Chang TC, Chen C, Lin CF, Ye LJ. Shedding pattern and serological profile of porcine circovirus type 2 infection in cesarean-derived, colostrum-deprived and farm-raised pigs. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science* 2011; 73: 521-5.

Choi C, Chae C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. *Veterinary Pathology* 2001; 38: 436-41.

Clark EG. Post-weaning wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* 1997; 28: 499-501.

Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *Journal of Virology* 2003; 77: 13036-41.

Decaro N, Martella V, Desario C, Lanave G, Circella E, Cavalli A, Elia G, Camero M, Buonavoglia C. Genomic characterization of a circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. *PLoS One* 2014; 9: e105909.

Delwart E, Li L. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the *Circoviridae* viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Research* 2012; 164: 114-21.

Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal* 1998; 39: 44-51.

Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, Allan G, Meehan B, Haines DM, Harding J, West KH, Krakowka S, Konoby C, Hassard L, Martin K, McNeilly F. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12: 21-7.

Ge X, Li J, Peng C, Wu L, Yang X, Wu Y, Zhang Y, Shi Z. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *The Journal of General Virology* 2011; 92: 2646-53.

Gerber PF, Garrocho FM, Lana AM, Lobato ZI. Fetal infections and antibody profiles in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Canadian Journal of Veterinary Research* 2012; 76: 38-44.

Gerlach H, Leipold R. [Feather loss syndrome in cockatoos]. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1986; 93: 24-6.

Gizzi AB, Oliveira ST, Leutenegger CM, Estrada M, Kozemjakin DA, Stedile R, Marcondes M, Biondo AW. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Veterinary Research* 2014; 10: 23.

Goddard A, Leisewitz AL. Canine parvovirus. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 2010; 40: 1041-53.

Goldsmith TL. Documentation of passerine circoviral infection [abstract]. *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*, August, Philadelphia, PA, USA 1995: 349-50.

Guilford WG, Center SA, Strombeck DR, David AW, Meyer D. Acute hemorrhagic enteropathy (Hemorrhagic Gastroenteritis: HGE). In: *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*, 3 edn. Guilford WG, Strombeck Donald R., ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1996: 433-35.

Ha Y, Lee YH, Ahn KK, Kim B, Chae C. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Veterinary Pathology* 2008; 45: 842-8.

Halami MY, Nieper H, Muller H, Johne R. Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research* 2008; 132: 208-12.

Harding JC, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health and Production* 1997; 5: 201-3.

Harding JC. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): Preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* 1997; 28: 503.

Hattermann K, Schmitt C, Soike D, Mankertz A. Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Archives of Virology* 2003; 148: 2471-80.

He J, Cao J, Zhou N, Jin Y, Wu J, Zhou J. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Journal of Virology* 2013; 87: 1420-9.

Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, Lin CN. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Veterinary Research* 2016; 12: 116.

Johne R, Fernandez-de-Luco D, Hofle U, Muller H. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *The Journal of General Virology* 2006; 87: 1189-95.

Kantere MC, Athanasiou LV, Spyrou V, Kyriakis CS, Kontos V, Chatzopoulos DC, Tsokana CN, Billinis C. Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of Canine Parvovirus under different storage conditions and vaccination status. *Journal of Virological Methods* 2015; 215-216: 52-5.

Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *Journal of Virology* 2012; 86: 7018.

Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology* 2000; 122: 9-24.

Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Veterinary Journal* 2003; 166: 251-6.

Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Chae C. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2004; 68: 218-21.

Kipar A, Kremendahl J, Addie DD, Leukert W, Grant CK, Reinacher M. Fatal enteritis associated with coronavirus infection in cats. *Journal of Comparative Pathology* 1998; 119: 1-14.

Kipar A, May H, Menger S, Weber M, Leukert W, Reinacher M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Veterinary Pathology* 2005; 42: 321-30.

Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ, Lutz H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *The Journal of General Virology* 2010; 91: 1698-707.

Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology* 2000; 37: 254-63.

Langohr IM, Stevenson GW, Nelson EA, Lenz SD, HogenEsch H, Wei H, Pogranichniy RM. Vascular lesions in pigs experimentally infected with porcine circovirus type 2 serogroup B. *Veterinary Pathology* 2010; 47: 140-7.

Lappin MR. Laboratory diagnosis of infectious disease. In: *Textbook of Veterinary*

Internal Medicine. Ettinger SJ, Feldman EC, eds.: Elsevier Health Sciences 2009: 847-53.

Lenghaus C, Studdert MJ. Acute and chronic viral myocarditis. Acute diffuse nonsuppurative myocarditis and residual myocardial scarring following infection with canine parvovirus. *The American Journal of Pathology* 1984; 115: 316-9.

Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, Delwart E. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of Virology* 2010a; 84: 6955-65.

Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjango JB, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *Journal of Virology* 2010b; 84: 1674-82.

Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, Gaffney P, Dela Cruz FN, Jr., Wang C, Delwart E, Pesavento PA. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerging Infectious Diseases* 2013; 19: 534-41.

Lian H, Liu Y, Li N, Wang Y, Zhang S, Hu R. Novel circovirus from mink, China. *Emerging Infectious Diseases* 2014; 20: 1548-50.

Lima FE, Cibulski SP, Dall Bello AG, Mayer FQ, Witt AA, Roehe PM, d'Azevedo PA. A Novel Chiropteran Circovirus Genome Recovered from a Brazilian Insectivorous Bat Species. *Genome Announcements* 2015; 3: (6).

Lorincz M, Csagola A, Farkas SL, Szekely C, Tuboly T. First detection and analysis of a fish circovirus. *The Journal of General Virology* 2011; 92: 1817-21.

Lorincz M, Dan A, Lang M, Csaba G, Toth AG, Szekely C, Csagola A, Tuboly T. Novel circovirus in European catfish (*Silurus glanis*). *Archives of Virology* 2012;

157: 1173-6.

Lukert P, de Boer GF, Dale JL. The *Circoviridae*. In: Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Vienna and New York: Springer-Verlag 1995: 166-8.

Magar R, Laroche R, Thibault S, Lamontagne L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. Journal of Comparative Pathology 2000; 123: 258-69.

Mankertz A, Hattermann K, Ehlers B, Soike D. Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. Archives of Virology 2000; 145: 2469-79.

Mankertz A. Molecular Biology of Porcine Circoviruses. In: Animal Viruses: Molecular Biology. Editors: Mettenleiter, T.C. & Sobrino, F. Mettenleiter TC, Sobrino F, eds. Norfolk, UK: Caister Academic Press 2008: 355-74.

Mapes S, Leutenegger CM, Pusterla N. Nucleic acid extraction methods for detection of EHV-1 from blood and nasopharyngeal secretions. The Veterinary Record 2008; 162: 857-9.

Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo M, Desario C, Cavalli A, Corrente M, Camero M, Germinario CA, Banyai K, Di Martino B, Marsilio F, Carmichael LE, Buonavoglia C. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. Emerging Infectious Diseases 2008; 14: 1306-8.

Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. The Journal of General Virology 1998; 79: 2171-9.

Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, Nicholson VM, Oliphant K, Prescott JF. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. PLoS One 2015; 10: e0122684.

Mortier F, Strohmeyer K, Hartmann K, Unterer S. Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. The Veterinary Record 2015; 176: 627.

Mysore J, Read D, Daft B. Circovirus-like particles in finches [abstract]. Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Histopathology Section. Reno, NV, USA 1995: 2.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. Journal of Virological Methods 2004; 117: 75-80.

Opriessnig T, Patterson AR, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naive pigs by oral consumption. Veterinary Microbiology 2009; 133: 54-64.

Opriessnig T, Halbur PG. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. Virus Research 2012; 164: 20-32.

Pass DA, Perry RA. The pathology of psittacine beak and feather disease. Australian Veterinary Journal 1984; 61: 69-74.

Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. Journal of Feline Medicine and Surgery 2009; 11: 225-58.

Pesavento PA, Murphy BG. Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. Veterinary Pathology 2014; 51: 478-91.

Phenix KV, Weston JH, Ypelaar I, Lavazza A, Smyth JA, Todd D, Wilcox GE, Raidal SR. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *The Journal of General Virology* 2001; 82: 2805-9.

Pratelli A, Tempesta M, Roperto FP, Sagazio P, Carmichael L, Buonavoglia C. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11: 550-3.

Pringle CR. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Archives of Virology* 1999; 144: 2065-70.

Proksch AL, Unterer S, Truyen U, Hartmann K. Efficacy of the paramunity inducer PIND-ORF in the treatment of canine parvovirus infection. *Veterinary Journal* 2014;

Proksch AL, Unterer S, Speck S, Truyen U, Hartmann K. Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. *Veterinary Journal* 2015; 204: 304-8.

Pusterla N, Wilson WD, Mapes S, Leutenegger CM. Diagnostic evaluation of real-time PCR in the detection of *Rhodococcus equi* in faeces and nasopharyngeal swabs from foals with pneumonia. *The Veterinary Record* 2007; 161: 272-5.

Raue R, Schmidt V, Freick M, Reinhardt B, Johne R, Kamphausen L, Kaleta EF, Muller H, Krautwald-Junghanns ME. A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathology* 2005; 34: 418-25.

Reitz N, Kamphausen L, Krautwald-Junghanns M-E, Makert C, Schmidt V. Fragebogenaktion Jungtauben-Krankheit. . *Die Brieftaube* 2003; 35: 1291-4.

Rinder M, Schmitz A, Peschel A, Korbel R. Complete genome sequence of a novel

circovirus from zebra finch. *Genome Announcements* 2015; 3: (3).

Rinder M, Schmitz A, Peschel A, Worle B, Gerlach H, Korbel R. Molecular characterization of a recently identified circovirus in zebra finches (*Taeniopygia guttata*) associated with immunosuppression and opportunistic infections. *Avian Pathology* 2016: 1-30.

Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD, Steffens WL, 3rd, Latimer KS. Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* 1989; 171: 83-8.

Ritzmann M, Wilhelm S, Zimmermann P, Etschmann B, Bogner KH, Selbitz HJ, Heinritzi K, Truyen U. Prevalence and association of porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2005; 112: 348-51.

Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segales J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Archives of Virology* 2017: (Epub ahead of print).

Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research* 2012; 164: 78-89.

Rosell C, Segales J, Plana-Duran J, Balasch M, Rodriguez-Arrijo GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology* 1999; 120: 59-78.

Rosell C, Segales J, Ramos-Vara JA, Folch JM, Rodriguez-Arrijo GM, Duran CO, Balasch M, Plana-Duran J, Domingo M. Identification of porcine circovirus in

tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record* 2000; 146: 40-3.

Schmoll F, Lang C, Steinrigl AS, Schulze K, Kauffold J. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 2008; 69: 814-21.

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. *Journal of Virological Methods* 1995; 55: 427-33.

Segales J, Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *The Veterinary Quarterly* 2002; 24: 109-24.

Segales J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 2005; 6: 119-42.

Segales J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research* 2012; 164: 10-9.

Shibata I, Okuda Y, Yazawa S, Ono M, Sasaki T, Itagaki M, Nakajima N, Okabe Y, Hidejima I. PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science* 2003; 65: 405-8.

Shivaprasad HL, Hill D, Todd D, Smyth JA. Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Pathology* 2004; 33: 525-9.

Soike D, Kohler B, Albrecht K. A circovirus-like infection in geese related to a runtting syndrome. *Avian Pathology* 1999; 28: 199-202.

Soike D, Albrecht K, Hattermann K, Schmitt C, Mankertz A. Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. *The Veterinary Record* 2004; 154: 792-3.

Stewart ME, Perry R, Raidal SR. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathology* 2006; 35: 86-92.

Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, Unterer S, Heilmann RM, Dowd SE, Kachroo P, Ivanov I, Minamoto Y, Dillman EM, Steiner JM, Cook AK, Toresson L. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012; 7: e51907.

Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, Carter SD, Gaskell CJ. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Research in Veterinary Science* 1991; 51: 11-8.

Thaiwong T, Wise AG, Maes RK, Mullaney T, Kiupel M. Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual Infections in a Papillon Breeding Colony. *Veterinary Pathology* 2016; 53: 1204-9.

Thibault S, Drolet R, Germain MC, D'Allaire S, Larochelle R, Magar R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Veterinary Pathology* 1998; 35: 108-16.

Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie.* 1974; A 226: 153-67.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 1982; 295: 64-6.

Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. Studies on epidemiology and

pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology* 1986; 91: 271-6.

Tischer I, Peters D, Rasch R, Pociuli S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archives of Virology* 1987; 96: 39-57.

Todd D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology* 2000; 29: 373-94.

Todd D, Weston JH, Soike D, Smyth JA. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 2001a; 286: 354-62.

Todd D, Weston J, Ball NW, Borghmans BJ, Smyth JA, Gelmini L, Lavazza A. Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathology* 2001b; 30: 321-5.

Todd D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology* 2004; 98: 169-74.

Todd D, Bendinelli M, Biagini P, Hino S, Mankertz A, Mishiro S, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Ritchie BW, Teo GC. Family *Circoviridae*. In: *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet CM, Mayo A, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. San Diego: Elsevier Academic Press 2005: 327-34.

Todd D, Scott AN, Fringuelli E, Shivraprasad HL, Gavier-Widen D, Smyth JA. Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathology* 2007; 36: 75-81.

Turk J, Fales W, Miller M, Pace L, Fischer J, Johnson G, Kreeger J, Turnquist S, Pittman L, Rottinghaus A, et al. Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; 200: 991-4.

Twentyman CM, Alley MR, Meers J, Cooke MM, Duignan PJ. Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (*Larus dominicanus*). *Avian Pathology* 1999; 28: 513-6.

Unterer S, Hartmann K. Akuter blutiger Durchfall beim Hund – Ursachen und diagnostische Aufarbeitung. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 2009; 37: 261-8.

Unterer S, Strohmeyer K, Kruse BD, Sauter-Louis C, Hartmann K. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 2011; 25: 973-9.

Unterer S, Busch K, Leipzig M, Hermanns W, Wolf G, Straubinger RK, Mueller RS, Hartmann K. Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 2014; 28: 52-8.

Unterer S, Lechner E, Mueller RS, Wolf G, Straubinger RK, Schulz BS, Hartmann K. Prospective study of bacteraemia in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *The Veterinary Record* 2015; 176: 309.

van den Brand JM, van Leeuwen M, Schapendonk CM, Simon JH, Haagmans BL, Osterhaus AD, Smits SL. Metagenomic analysis of the viral flora of pine marten and European badger feces. *Journal of Virology* 2012; 86: 2360-5.

Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 2001; 15: 374-8.

West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with

porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11: 530-2.

Woods LW, Latimer KS, Barr BC, Niagro FD, Campagnoli RP, Nordhausen RW, Castro AE. Circovirus-like infection in a pigeon. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1993; 5: 609-12.

Wu Z, Ren X, Yang L, Hu Y, Yang J, He G, Zhang J, Dong J, Sun L, Du J, Liu L, Xue Y, Wang J, Yang F, Zhang S, Jin Q. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *Journal of Virology* 2012; 86: 10999-1012.

Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, Qian Z, Dong J, Sun L, Zhu Y, Du J, Yang F, Zhang S, Jin Q. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *The ISME Journal* 2016; 10: 609-20.

Zaccaria G, Malatesta D, Scipioni G, Di Felice E, Campolo M, Casaccia C, Savini G, Di Sabatino D, Lorusso A. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology* 2016; 490: 69-74.

## VIII. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer für dieses interessante Dissertationsthema, die Hilfe und gute Zusammenarbeit während und nach meiner Zeit in der Medizinischen Kleintierklinik.

Vielen Dank an Frau Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann für die konstruktive Kritik und die anregenden Ideen bei der Entstehung der Publikation und der Dissertationsschrift.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Ralf Müller möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfestellung bei der Planung und Auswertung der Statistik, sowie für die sprachliche Korrektur der Publikation bedanken.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Christian Leutenegger für die labordiagnostische Analyse der Proben und die stets freundliche Unterstützung bei der Verfassung der Publikation bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, meiner Mutter, meinem Stiefvater, meinem Bruder und meinen Schwiegereltern, die mich immer wieder mit den richtigen Worten und Gesten aufgemuntert und darin bestärkt haben meinen Weg fortzusetzen. Auf diesem Wege möchte ich mich bei meinen Großeltern, meiner Tante Martina und meinem Onkel Bernd für die Unterstützung während meines Studiums bedanken.

In Liebe und Dankbarkeit denke ich auch an unseren Hund Balu, der treue Begleiter, ohne den ich wohl nie diesen Berufsweg eingeschlagen hätte.

Ich möchte allen Freunden und Kollegen für die vielen kleinen Hilfestellungen, die offenen Ohren, Rücksichtnahme und gelungene Aufmunterung danken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Mutter für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit.