

Untersuchungen zur Rolle des caninen Herpesvirus und des Parvovirus Minute virus of canines bei Fruchtbarkeitsstörungen des Hundes

Uwe Truyen und Jill Manteufel, Leipzig

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

Fünfund- bis siebenzig Prozent der Welpenverluste werden durch infektiöse Ursachen hervorgerufen. Welchen Anteil virale Infektionen daran haben ist weitgehend unbekannt. Zwei Virusinfektionen scheinen bei Welpensterblichkeit und Fruchtbarkeitsstörungen eine wesentliche Rolle zu spielen: das canine Herpesvirus Typ 1 (CHV-1) und das Canine Minute Virus (CnMV, synonym canines Parvovirus Typ 1).

Das klinische Erkrankungsbild ist bei beiden Viren sehr ähnlich. Bei erwachsenen Tieren verläuft die Infektion meist unauffällig. Infektionen während der Trächtigkeit können zu Fruchtresorption, Aborten, Missbildungen

und Welpensterblichkeit führen. Infizierte Welpen erkranken meist in den ersten drei Lebenswochen und sind apathisch, zeigen Saugunlust, haben Atemwegsprobleme, Erbrechen und leiden oft auch unter Durchfall. Die Mortalität ist hoch. Anhand der klinischen Symptome lässt sich nur eine Verdachtsdiagnose stellen. Die endgültige Diagnose beider Virusinfektionen kann nur im Labor mittels virologischer und molekularbiologischer Techniken erfolgen.

Canine Herpesviren werden wie andere Herpesviren auch, nicht vollständig vom Immunsystem eliminiert und verbleiben lebenslang im Körper des Hundes. Diese Tiere können jederzeit, ohne äußerlich sichtbare Hinweise für den Besitzer oder Tierarzt, das Virus ausscheiden und damit andere Hunde infizieren.

Das Canine Minute Virus wurde 1967 als erstes Parvovirus des Hundes aus dem Kot eines gesunden Schäferhundes, der auf einer amerikanischen Militärbasis in Deutschland stationiert war, isoliert. Durch experimentelle Infektionen in den späten 80er Jahren wissen wir, dass eine Infektion zu Fruchtresorptionen, Aborten, der Geburt lebensschwache

cher Welpen und Welpensterblichkeit in den ersten drei Lebenswochen führen kann. 1996 gelang es TRUYEN und Mitarbeitern das Canine Minute Virus erstmals in Deutschland beim Abort einer Yorkshireterrierhündin nachzuweisen. Hunde, die im Rahmen einer jährlichen Impfung gegen die Parvovirose (CPV-2) geimpft werden, sind gegen CnMV aufgrund fehlender Kreuzimmunität nicht geschützt.

Ziel der Arbeit war es, die Verbreitung dieser beiden Viren in Deutschland zu untersuchen. Um herauszufinden, wie hoch der Anteil der Hunde ist, die schon einmal Kontakt mit besagten Viren hatten, wurden Seren auf den Gehalt virusspezifischer Antikörper getestet und daraus die Seroprävalenz ermittelt. Fälle von akuter Welpensterblichkeit in den ersten drei Lebenswochen sowie Totgeburten wurden mittels PCR und Virusisolierung auf CHV-1 und CnMV direkt untersucht.

Durch Veröffentlichungen über das infektiöse Welpensterben und deren virale und einer speziell eingerichteten Homepage mit der URL <http://www.herpes-beim-hund.de> wurden Züchter aufgerufen an der Studie teilzunehmen. Zusätzlich konnten 40 Seren der Serumbank aus München, die 1998 im Rahmen einer von der GKF geförderten seroepidemiologischen Studie von Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen zur Wirksamkeit verschiedener Impfschemata und Impfstoffe bei Hunden angelegt wurde, mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Von Frau Prof. Günzel-Apel aus dem Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover wur-

den 31 Spermaproben und 26 Serumproben aus dem Patientengut der Klinik in Hannover zur Verfügung gestellt. Zwischen März 2004 und Oktober 2005 konnten so insgesamt 429 Serumproben, 37 Welpen aus 14 Würfen, 34 Spermaproben, 37 Tupferabstriche und 16 Kotproben gesammelt werden.

Ergebnisse des direkten Virusnachweises

Die Proben wurden aufgearbeitet und anschließend mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf CHV-1 und CnMV untersucht. Diese Methode ist sehr sensitiv und erlaubt den Nachweis viraler DNA. Gleichzeitig wurde versucht die Viren in Zellkultur zu isolieren. Das Testergebnis aller untersuchten Proben war sowohl in der Virusisolierung als auch in der PCR negativ. In keinem Fall konnten wir CHV-1 oder CnMV nachweisen.

In sechs der 14 Fälle wurden die Welpen auf Wunsch des Besitzers zur Abklärung der Todesursache pathologisch untersucht. Davon wurde in drei Fällen kein Hinweis auf ein infektiöses Geschehen gefunden. Bei den anderen drei Fällen konnten bei der bakteriologischen Untersuchung E.coli und Staphylococcus intermedius nachgewiesen werden. Die Anzahl der untersuchten Fälle von Welpensterblichkeit ist insgesamt zu gering, um eine Beurteilung über die Verbreitung und die Häufigkeit einer ursächlichen Beteiligung von CHV-1 und CnMV an Fällen von Welpensterblichkeit treffen zu können. So dass aus der Tatsache, dass wir die Viren in den untersuchten Fällen nicht nachweisen konnten nicht geschlossen werden kann, dass CHV-1 und CnMV keine Rolle in Deutschland spielen.

Nachweis spezifischer Antikörper

Insgesamt standen 429 Seren für diese Untersuchungen zur Verfügung. Es wurde unter Anwendung des Serumneutralisationstestes eine Seroprävalenz für CHV-1 von 27,7 % und für CnMV von 5,6 % ermittelt. Bezogen auf die auswertbaren Seren steigt der Anteil seropositiver Seren auf 28,1 % und 5,7 %. Von den Seren, die von Frau Prof. Günzel-Apel aus dem Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt wurden, konnten bei 15,4 % CHV-1-spezifische Antikörper auf, wohingegen keine Probe seropositiv für CnMV war. Aus der Serumbank der Münchener Studie aus dem Jahre 1998 war der Anteil der CHV-1-positiven Seren im Vergleich zur Gesamtprävalenz von nur 27,7 % mit 60 % auffallend hoch. Dass es sich dabei um Antikörper nach Impfung handelt, kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da der Impfstoff gegen das infektiöse Welpensterben erst seit 2003 auf dem deutschen Markt

erhältlich ist und die Seren aus dem Jahre 1998 stammen. Die einzige Gemeinsamkeit aller untersuchten Hündinnen besteht darin,

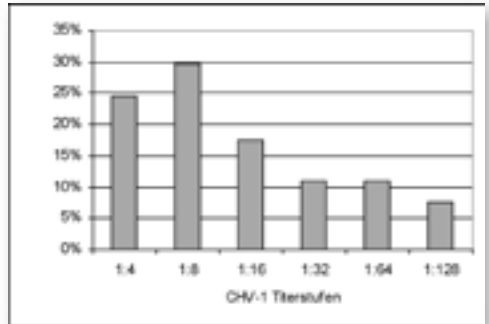


Abbildung 1: Häufigkeit und Verteilung der Antikörpertiter gegen CHV-10

dass die Blutentnahme in einem relativ kurzem Abstand zur Geburt erfolgte. Die Höhe der Antikörpertiter für CHV-1 variierte zwischen 1:4 und 1:128. CHV-1 induziert nur

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

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

Tabelle 2: Seroprävalenz von CnMV unter Zuchthunden in Deutschland

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

eine schwache Antikörperbildung. Die absolute Höhe der Antikörper ermöglicht nur eine begrenzte Aussage darüber, ob der Hund vor einer erneuten Infektion geschützt ist, da die zellulären Abwehrmechanismen des Immunsystems wahrscheinlich eine größere Bedeutung in der Bekämpfung einer Herpesvirusinfektion besitzen.

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

Für den Nachweis CnMV-spezifischer Antikörper wurden Immunfluoreszenztechniken angewandt. Die ermittelte Seroprävalenz aller untersuchten Serum betrug 5,6 % und zeigt, dass CnMV ebenfalls in Deutschland verbreitet ist. Im Vergleich zu anderen Ländern ist die Prävalenz jedoch gering. In den einzigen beiden untersuchten Ländern in

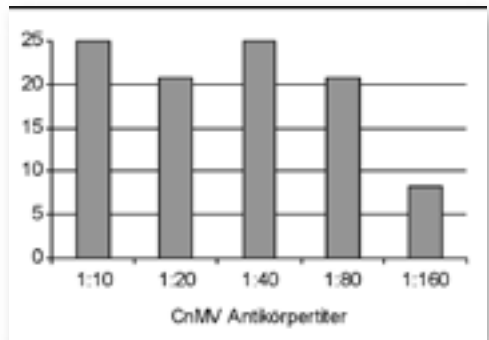


Abbildung 2: Häufigkeit und Verteilung der Antikörper gegen CnMV

Europa, Italien und der Türkei liegen die Prävalenzen zwischen 13,6 % und 24,17 %. In der Teilgruppe der Seren aus der Münchener Impfstudie ließen sich bei 10 % der Tiere spezifische Antikörper nachweisen, wohingegen keines der vom Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover für diese Studie zur Verfügung gestellten Hundeseren seropositiv war. Die Methode der indirekten Immunofluoreszenz zeichnet sich durch eine hohe Spezifität, jedoch nur eine mittelmäßige

Sensitivität aus. Unter Umständen ist das Ergebnis einiger Seren falsch negativ. Der Ersatz der Immunofluoreszenz durch sensitivere Nachweismethoden wie dem ELISA soll langfristig das Ziel sein.

Analyse von Risikofaktoren

Nach der Ermittlung der Seroprävalenz für CHV-1 und CnMV unter Zuchthunden in Deutschland wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich anhand der über die Seren

Tabelle 3: Fruchtbarkeitsstörungen und serologischer Status

	n	CHV-1	CHV-1 %	CnMV	CnMV %
Fruchtbarkeitsstörungen	63	16	25,4 %	6	9,5 %
Welpensterblichkeit	24	9	37,5 %	2	8,3 %
Totgeburten	23	2	8,7 %	2	8,7 %
Leerableiben	17	4	23,5 %	1	5,9 %
lebensschwache Welpen	6	-	-	1	16,6 %
Spätabort	5	-	-	1	20 %
Fruchtresorptionen	5	2	40 %	1	20 %
Anöstrus	2	1	50 %	2	100 %
Ataxie	2	1	50 %	-	-
Missbildungen	1	-	-	-	-
Mumifikation	1	-	-	-	-
vesikuläre Läsionen in der Vagina	1	-	-	-	-
verlängerte Läufigkeit	1	-	-	-	-
Scheinträchtigkeit	1	-	-	-	-
respiratorische Symptome	1	-	-	-	-

zur Verfügung stehenden Daten Risikofaktoren ableiten lassen, die für die Seropositivität signifikant sind. Die statistische Auswertung der für Daten ergab, dass nur das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Serostatus von CHV-1 hat. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Hündin seropositiv ist, ist fast 2,9mal größer als das eines Rüden.

Aufgrund der zu geringen Anzahl der für CnMV seropositiven Seren war die Ableitung von Risikofaktoren für CnMV mittels statistischer Methoden aus den wenigen Daten nicht sinnvoll. So dass nur eine rein deskriptive Analyse erfolgen kann.

Zusammenhang zwischen Fruchtbarkeitsstörungen und Antikörpernachweis

Es wurden von 63 Hunden Seren zur Untersuchung eingesandt, bei denen Fruchtbarkeitsstörungen aufgetreten sind. Bei 25,4 % dieser Seren konnten Antikörper gegen CHV-1 nachgewiesen werden. CnMV-spezifische Antikörper waren in 6 Seren (9,5 %) vorhanden. Die Prävalenz von CHV-1 ist bei den Symptomkomplexen Welpensterblichkeit mit 37,5 %, Fruchtresorptionen (40 %), Anöstrus (50%) und Ataxie (40 %) bedeutend höher als die ermittelte Seroprävalenz aller in dieser Arbeit untersuchter Seren von 28,1 %. Von den 63 Seren mit vorberichtlich bekannten Fruchtbarkeitsstörungen waren sechs seropositiv für CnMV (9,5 %). Der Anteil seropositiver Seren für CnMV ist bei Hunden mit Fruchtbarkeitsstörungen im Allgemeinen und bei speziellen klinischen Erscheinungen wie z. B. Totgeburten, lebensschwache Welpen und Fruchtresorptionen deutlich höher als die ermittelte Seroprävalenz aller untersuchten Seren von 5,6 %. Auffallend ist, dass bei den einzigen beiden Seren mit dem

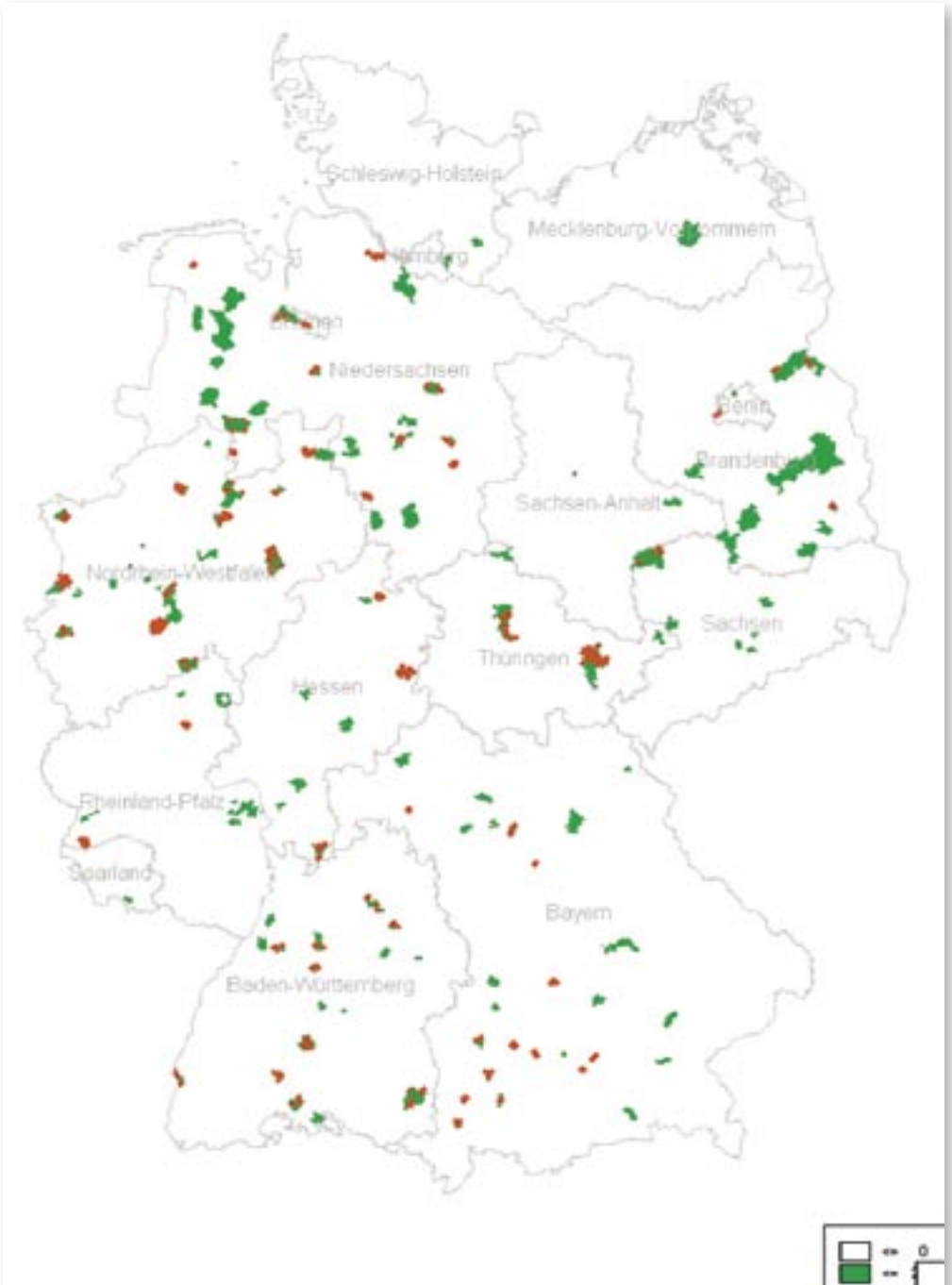
vorberichtlich genannten Problem des Auftretens eines verlängerten Anöstrus, CnMV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Arbeiten zur Genexpression des Hauptoberflächenproteins VP2 von CnMV

In Hinblick auf die begrenzte Verfügbarkeit von CnMV und die für die Isolierung benötigte Zelllinie WRCC war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, das Oberflächenprotein VP2 durch rekombinante Genexpression in E.coli herzustellen und dessen Einsatz als Antigen im ELISA zu testen. In der Studie gelang es nicht VP2 in ausreichender Löslichkeit und Reinheit mittels prokaryotischer Expressionssysteme herzustellen. Das hergestellte Protein erwies sich als stark kreuzreaktiv. Eine Bestimmung von Antikörpern gegen CnMV mit einem auf das synthetisierten VP2 basierenden ELISA gelang nicht. Die Genexpression des VP2 von CnMV in E.coli ist für die Etablierung eines diagnostischen Nachweissystems nicht geeignet. Der Einsatz anderer Expressionssysteme ist empfehlenswert und sollte weiter verfolgt werden.

Geographische Verteilung der untersuchten Serumproben

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



Fazit

Die Ergebnisse der Arbeit bestätigen, dass CnMV weltweit verbreitet ist und im ursächlichen Zusammenhang steht mit Fruchtbarkeitsstörungen beim Hund.

Die Seroprävalenzrate für CHV-1 ist nicht gleichzusetzen mit der Häufigkeit CHV-1-bedingter klinischer Erkrankungen beziehungsweise Welpensterblichkeit. Der in der Praxis geäußerte Verdacht einer CHV-1-Infektion konnte im Rahmen dieser Studie in keinem Fall labordiagnostisch bestätigt werden. Der Anteil bakteriell und nichtinfektiös bedingter Welpensterblichkeit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von weitaus größerer Bedeutung. Der betreuende Tierarzt sollte bei Welpensterblichkeit unbedingt die Todesursache des Welpen bestimmen lassen und die Hündin klinisch untersuchen.

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

Danksagung

Abschließend möchten wir uns ganz herzlich bei der Gesellschaft zur Förderung kynologischer Forschung e.V. für die gute Zusammenarbeit und die gewährte finanzielle Unterstützung bedanken. Weiterhin möchten wir auf diesem Wege allen Züchtern, Zuchtvereinen und Tierärzten danken, die uns so zahlreich und engagiert bei der Durchführung der Studie unterstützt haben.

Prof. Dr. Uwe Truyen und TÄ Jill Manteufel

*Institut für Tierhygiene
und Öffentliches Veterinärwesen,
Veterinärmedizinische Fakultät,
Universität Leipzig*