

Untersuchungen zur vertikalen Übertragung des Parrot Bornavirus bei Psittaziden



Elisa Maria Wüst

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2017

© 2017 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-379-4

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Lierz

Untersuchungen zur vertikalen Übertragung des Parrot Bornavirus bei Psittaziden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Elisa Maria Wüst
Tierärztin aus Pforzheim

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer
1. Gutachter:	Prof. Dr. Michael Lierz
2. Gutachter:	Prof. Dr. Friedemann Weber
Prüfer:	Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation:	02. Juni 2017
----------------------	---------------

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab als Vortrag auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

Wüst, E; Malberg S; Enderlein,D; Heffels-Redmann U; Herzog S; Herden C; Lierz M (2015): Experimental Infection of Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) Eggs with Avian Bornavirus; In: Proceedings of the 2nd International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine, Paris, 18.-23.April; Seite: 285

Wüst, E; Malberg S; Enderlein,D; Heffels-Redmann U; Herzog S; Herden C; Lierz M (2017): Experimental infection of cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) eggs with PaBV-4 and PaBV-2 via yolk-sac and chorioallantois inoculation; In: Proceedings of the International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine, Venice, 25.-29. März ; Seite: 658-659

Für meine Familie

I. Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Bornaviridae	3
2.2	Bornavirus der Säugetiere (<i>Mammalian 1 bornavirus</i>)	3
2.2.1	Horizontale und vertikale Übertragung des Mammalian 1 bornavirus	8
2.3	Aviäre Bornaviren	10
2.3.1	Pathogenese und Symptome durch aviäre Bornaviren	14
2.3.2	Diagnose der klinischen Erkrankung einer Infektion mit PaBV	15
2.3.3	Molekularbiologische Nachweismethoden einer Infektion mit Aviären Bornaviren	17
2.3.4	Therapie und Prophylaxe	22
2.3.5	Übertragungsweg von aviären Bornaviren	23
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Versuchsaufbau und Versuchsablauf	27
3.1.1	PaBV-Isolate	27
3.1.1.1	Herkunft der PaBV-Isolate	27
3.1.1.2	Herstellung der PaBV-Isolate	28
3.1.2	<i>In vitro</i> Inokulation von PaBV auf embryonalen Nymphensittich Zellkulturen	29
3.1.3	Vorversuch zur Desinfektion der Eischalen	30
3.1.4	<i>In vivo</i> Inokulation von PaBV in Nymphensitticheier	30
3.1.4.1	Herkunft der Eier der Nymphensittiche	30
3.1.4.2	Inkubation der Eier der Nymphensittiche	31
3.1.4.3	Inokulation von PaBV	31
3.1.4.4	<i>In vivo</i> Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	32
3.1.4.5	<i>In vivo</i> Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoisembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	33
3.1.5	Untersuchung von Eiern natürlich PaBV-Infizierter <i>Pyrrhura spp.</i>	35
3.2	Nachweismethoden für PaBV	36
3.2.1	PaBV-RNA Nachweis mittels real-time-Reverse-Transkriptase-TaqMan-PCR (real-time-RT-TaqMan-PCR)	36

3.2.2	RNA-Extraktion	36
3.2.3	Reverse Transkription	37
3.2.4	Real-time –TaqMan-PCR	38
3.2.5	Antikörpernachweis mittels des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT)	39
3.2.6	Histopathologische Untersuchung	40
3.2.7	PaBV-Antigennachweis mittels Immunhistochemie	40
3.2.8	Färbung zur Zellidentifikation	42
3.2.9	Virus-Isolierung	45
3.2.9.1	Virus-Isolierung in CEC-32-Zellen	45
3.2.9.2	Virus-Isolierung in embryonalen Nymphensittichzellen	45
3.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	<i>In vitro</i> Inokulation von PaBV auf embryonalen Nymphensittichzellkulturen	47
4.2	Vorversuch zur Desinfektion der Eischalen	49
4.3	<i>In vivo</i> Inokulation von PaBV in Nymphensitticheiern	49
4.3.1	<i>In vivo</i> Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	49
4.3.1.1	Klinische Beobachtungen von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	49
4.3.1.2	PaBV- RNA Nachweis von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	49
4.3.1.3	Histopathologische Untersuchungen von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	50
4.3.1.4	PaBV-Antigennachweis mittels Immunhistochemie von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	53
4.3.1.5	Virus-Isolierung von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	55
4.3.1.6	Zusammenfassende Ergebnisse von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4	55
4.3.2	<i>In vivo</i> Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	57
4.3.2.1	Klinische Beobachtungen von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	57
4.3.2.2	PaBV-RNA Nachweis von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	57
4.3.2.3	Histologische Untersuchung von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	60
4.3.2.4	PaBV-Antigennachweis mittels Immunhistochemie von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	61
4.3.2.5	Vergleich der Häufigkeiten des PaBV-Nachweises aus RT-PCR und Immunhistochemie mittels zweifaktorieller exakter logistischer Regression	71
4.3.2.6	Färbung zur Zellidentifikation von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	71

4.3.2.7	Virus-Isolierung von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2	71
4.3.3	Untersuchung von Eiern natürlich PaBV-Infizierter <i>Pyrrhura spp.</i>	72
4.3.3.1	PaBV-RNA Nachweis im Dotter und Eiklar der <i>Pyrrhura</i> -Eier	72
5	DISKUSSION	73
5.1	<i>In vitro</i> Inokulation von PaBV auf embryonalen Nymphensittich Zellkulturen	75
5.2	<i>In vivo</i> Inokulation von PaBV in Nymphensitticheiern	77
5.2.1	Eignung der Nymphensittiche	79
5.2.2	Eignung der gewählten Isolate	80
5.2.3	Inokulationsrouten von PaBV	81
5.2.4	Nachweis von PaBV-RNA	83
5.2.5	Histopathologische Befunde	84
5.2.6	Immunhistochemische Befunde	86
5.2.7	Virus-Isolierung	89
5.3	Untersuchung von Eiern natürlich infizierter <i>Pyrrhura spp.</i>	90
5.4	Übergreifende Betrachtung und Schlussfolgerung	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	95
7	SUMMARY	97
8	LITERATURVERZEICHNIS	99
9	DANKSAGUNG	111
10	ERKLÄRUNG	112

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Bornaviren	4
Abbildung 2: Genomstruktur von aviären Bornaviren und Bornaviren der Säugetiere im Vergleich	10
Abbildung 3: Embryonale Nymphensittichgehirnzellen (NEB)	48
Abbildung 4: Mit PaBV-4 Isolat infizierte NEB Zellen	48
Abbildung 5: Großhirn (links) und Kleinhirn (rechts) Versuch 1 Dottersackinokulation	51
Abbildung 6: Leber mit Hepatolipidose (links), juvenile Niere (rechts) Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	52
Abbildung 7: Drüsenmagen (links) und Muskelmagen (rechts) Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	52
Abbildung 8: Juveniles Herz, Klappenanschnitt	52
Abbildung 9: PaBV-Antigennachweis im Großhirn Embryo EI 32 Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	55
Abbildung 10: Juveniles Großhirn (links) und Kleinhirn (rechts)	61
Abbildung 11: Großhirn mit Ventrikelanschnitt Embryo DAB_DO 01 Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	62
Abbildung 12: Kleinhirn Embryo DAB_DO 09 Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	62
Abbildung 13: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	64
Abbildung 14: Kleinhirn Embryo DAB_CA 01 Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4	65
Abbildung 15: Großhirn Embryo DAB_CA 01 Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4	65
Abbildung 16: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn Versuch 2 Gruppe 2	66
Abbildung 17: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2	68
Abbildung 18: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2	69
Abbildung 19: Mittelwerte (links) und Standardabweichung (rechts) der PaBV-Antigenverteilung im Vergleich der Gruppen 1, 2, 3 und 4 aus Versuch 2	70

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der aviären Bornaviren nach der aktuellen Nomenklatur (Afonso et al., 2016)	12
Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse der Elterntiere der natürlich PaBV-infizierten <i>Pyrrhura spp.</i>	35
Tabelle 3: Mastermix Proben für Reverse Transkription	37
Tabelle 4: Mastermix zweite Denaturierung für die Real-time-TaqMan-PCR	38
Tabelle 5: Ct-Werte der PaBV-RNA vor und nach Desinfektion mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung	49
Tabelle 6: Nachweis von PaBV-4-RNA in Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	50
Tabelle 7: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	54
Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse in Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	56
Tabelle 9: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	58
Tabelle 10: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4	59
Tabelle 11: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2	59
Tabelle 12: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2	60
Tabelle 13: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	62
Tabelle 14: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4	63
Tabelle 15: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4	64
Tabelle 16: PaBV-Antigenverteilung in Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4	66
Tabelle 17: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2	67
Tabelle 18: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2	67
Tabelle 19: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2	68
Tabelle 20: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2	69
Tabelle 21: Nachweis von PaBV-RNA in den Eiern der natürlich PaBV-infizierten <i>Pyrrhura spp.</i>	72

IV. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
ABBV	Aquatic bird bornavirus
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
PaBV	Parrot bornavirus
BD	Bornasche Krankheit (Borna disease)
BoDV	Borna disease virus
CA	Chorioallantois
cDNA	Complementary DNA
CEC-32	Wachstefibroblastenzelle
C	Celsius
CnBV	Canary bornavirus
Ct	Cycle threshold
DAB	3,3'-Diamino-benzidin-tetrachlorid Dihydrat, Chromogen-Diaminobenzidin
DEF	Duck embryo fibroblasts
DNA	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
DO	Dottersack
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
d.p.i.	Tage nach Infektion
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
EsBV	Estrildid finch bornavirus
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Normalerdschwerebeschleunigung
G	Gauge
HE	Hämatoxylin Eosin
H ₂ O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
I.U.	Internationale Einheiten (Units)
K oder Kontr.	Kontrolle
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KVRAF	Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
LGSV	Lovergidge's garter snake virus
MDCK	Madin-Darby-Canine-Kidneycells
ml	Milliliter
MM	Mastermix
mM	Millimol

Verzeichnisse

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MuBV	Munia bornavirus
NEB	Embryonale Nymphensittichgehirnzellen
NEF	Embryonale Nymphensittichfibroblasten
neg.	negativ
nm	Nanometer
NSS	negativ unsegmentiert (negative nonsegmented)
Nr.	Nummer
p	probability
PAP	Papanicolau
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PDD	Psittazine Drüsenmagendilatation
pos.	positiv
p.i.	Post infectionem
QM	Quail smooth muscle cells
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungsgeschwindigkeit
RT	Reverse Transkriptase
S	Sekunde
spp.	Species pluralis, mehrere nicht im Einzelnen zu nennende Spezies einer Gattung
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TCID50	Infektiöse Dosis 50 in Tissue Culture
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Die Psittazine Drüsenmagendilatation (PDD) ist eine bedeutende Erkrankung der Papageien, sie ist gekennzeichnet durch gastrointestinale Symptome, meist mit einer starken Dilatation des Drüsenmagens. Erste Beschreibungen der Erkrankung reichen bis in das Jahr 1970 zurück. Seither hat die Erkrankung zu großen Verlusten in Papageienbeständen geführt. Neben den gastrointestinalen Symptomen können darüber hinaus zusätzlich oder isoliert neurologische Symptome auftreten. Nach Ausbruch der Erkrankung führt die Infektion meistens zum Tod des Tieres durch Verhungern (Busche et al., 1985; Graham, 1984; Ridgway and Gallerstein, 1983; Turner, 1984; Woerpel and Rosskopf, 1984). Die klassischen klinischen Symptome einer PDD sind charakterisiert durch das Ausscheiden unverdauter Körner im Kot sowie durch viele unspezifische Auffälligkeiten wie Durchfall, Erbrechen, erhöhte oder verminderte Futtermittelaufnahme sowie einer ganzen Bandbreite an neurologischen Symptomen wie Zittern, Kopfschiefhaltung, Stereotypien und Krampfanfälle. Der Verlauf der Erkrankung ist, je nachdem welches Symptombild im Vordergrund steht, sehr unterschiedlich und kann von wenigen Tagen bis hin zu mehreren Jahren dauern (Gregory et al., 1994; Phalen, 1986). Beobachtungen zeigen, dass am häufigsten Großpapageien betroffen sind. Ganz besonders häufig tritt die Erkrankung bei Aras, Graupapageien und Kakadus auf. Aber auch Amazonen und Felsensittiche können betroffen sein (Gregory et al., 1994; Reavill and Schmidt, 2007). Von den fünfzehn Ara-Arten, die zur Gattung der eigentlichen Aras zählen, sind nur drei von der IUCN Red List¹ als nicht gefährdet gelistet, alle anderen Arten sind bedroht oder gefährdet, eine Art ist bereits ausgestorben. Der Spix-Ara ist in der Natur bereits ausgestorben. Beobachtungen des in Menschenobhut gehaltenen Spix-Ara Bestands zeigen, dass in einem Beobachtungszeitraum von elf Jahren 10 % der Population an PDD verstorben sind (Hammer and Watson, 2012). Auch der Graupapagei zählt inzwischen zu den bedrohten Arten, auch wenn er als Haustier sehr häufig vorkommt. Insgesamt hat die IUCN 50 Papageienarten als bedroht und 102 als gefährdet oder potentiell gefährdet gelistet.

Die Erkrankung kommt fast weltweit vor. Sie wurde bisher für die USA, Kanada, Südamerika, Europa, Australien, Südafrika und Israel beschrieben (Doneley et al.,

¹ www.iucnredlist.org

2007; Gancz et al., 2010). Als Auslöser der PDD wurden 2008 erstmalig aviäre Bornaviren beschrieben (Honkavuori et al., 2008; Kistler et al., 2008). Die Erfüllung der Henle-Koch-Postulate an einem Infektionsversuch mit Nymphensittichen 2012 bestätigte das Parrot bornavirus (PaBV) endgültig als Auslöser der PDD (Piepenbring et al., 2012).

Nach der Feststellung des PaBV als Auslöser der Erkrankung stellte sich nun die Frage nach der Übertragung. Einige Autoren vermuteten eine fäko-orale Übertragung (Kistler et al., 2010; Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009). Ein Beweis hierfür konnte aber unter Versuchsbedingungen bisher nicht erbracht werden (Heckmann et al., 2015). In der Literatur gibt es Hinweise auf eine mögliche vertikale Übertragung. Da in Zucht- und Erhaltungsprogrammen bei gefährdeten Arten oft auf einen sehr kleinen Genpool zurückgegriffen wird, können einzelne Tiere auch nach Detektion von PaBV nicht aus der Zucht ausgeschlossen werden. Bisher konnte virale RNA im Ei oder Embryo nachgewiesen werden (Delnatte et al., 2014; Kerski et al., 2012; Lierz et al., 2011; Rubbenstroth et al., 2013), der Nachweis von infektiösem Virus aus Ei oder Embryo gelang hingegen nicht. Somit ist die Klärung der Frage, ob es zu einer vertikalen Übertragung kommen kann, von großer aktueller Bedeutung.

Zur Klärung der Frage, ob eine vertikale Übertragung über das Ei zu einer validen Infektion des Embryo führen kann, soll in der vorliegende Studie untersucht werden, ob eine Anzucht des Virus auf embryonalen Nymphensittichgehirnzellen (NEB) und embryonalen Nymphensittichfibroblastenzellen (NEF) überhaupt möglich ist. Anschließend wird untersucht, ob eine experimentelle Infektion eines Nymphensitticheis zu einer produktiven Infektion eines Embryos führt. Hierfür werden Eier zwischen Tag drei bis fünf der Bebrütung in den Dottersack und Eier zwischen Tag fünf bis sieben auf die gesenkte Chorioallantoismembran mit PaBV inokuliert. Geht die Infektion im Ei nicht an, ist eine vertikale Übertragung als natürlicher Infektionsweg eher unwahrscheinlich. Sollte es zu einer Virusvermehrung im Embryo kommen, soll untersucht werden, wie sich das Virus auf den Embryo auswirkt, da die Infektion vor der Ausbildung des Immunsystems am achten Bebrütungstag erfolgt. Darüber hinaus soll die Virusverteilung im Embryo untersucht werden. Zusätzlich werden die Eier natürlich infizierter *Pyrrhura spp.* untersucht, um die Bedeutung der vertikalen Übertragung weiter zu beleuchten.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Bornaviridae

Die Familie der *Bornaviridae* gehört zur Ordnung der *Mononegavirales*. Die Viren sind behüllt und besitzen einen RNA-Einzelstrang mit negativer Polarität, der nicht segmentiert ist (de la Torre, 1994; Schneemann et al., 1995). Im Gegensatz zu anderen *Mononegavirales* laufen bei den Bornaviren die Genomreplikation und die Transkription im Zellkern ab (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994; de la Torre, 1994; Schneemann et al., 1995). Zur Ordnung der *Mononegavirales* gehören neben den Bornaviren noch die Familien der *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Filoviridae*. Die Familie der *Bornaviridae* ist monotypisch und beinhaltet nur das Genus *Bornavirus*, das sieben verschiedene Spezies umfasst: Das *Elapid 1 bornavirus*, *Mammalian 1 bornavirus*, *Passeriform 1* und *2 bornavirus*, das *Psittaciform 1* und *2 bornavirus*, und das *Waterbird 1 bornavirus* (Afonso et al., 2016; Kuhn et al., 2015).

2.2 Bornavirus der Säugetiere (*Mammalian 1 bornavirus*)

Genomaufbau und Virusproteine

Das *Mammalian 1 bornavirus* kommt in zwei unterschiedlichen Virusvarianten vor: Das Borna disease virus 1 (BoDV-1) und BoDV-2 (Afonso et al., 2016; Kuhn et al., 2015). Das BoDV ist ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von 80-100 nm, ist neurotrop und nicht zytolytisch (Richt et al., 1993). Das Virus ist empfindlich gegenüber Hitze, Lösungsmitteln und UV-Licht (Ludwig et al., 1988; Mayr and Danner, 1974; Zwick, 1939). Die Länge des Virusgenoms beträgt 8,9 kb (de la Torre, 1994; Zimmermann et al., 1994). Sechs offene Leseraster (*open reading frames*, ORFs) kodieren jeweils für das N-Protein, das X-Protein, das P-Protein, das Matrixprotein (M), das Glykoprotein (G) sowie die virale Polymerase (*large polymerase protein*, L). Das Glykoprotein (G) ist an die Hülle des Virus gebunden und kann sich mit der Membran der Wirtszelle koppeln und so zur Fusion führen. Es wird in zwei Untereinheiten gespalten. Die N-terminale Untereinheit gp51 ist für die initiale Rezeptorbildung notwendig, die C-terminale Untereinheit gp43 vermittelt die Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran (Gonzalez-Dunia et al., 1998). Die Innenseite der Virusmembran exponiert das Matrixprotein (M). Darüber hinaus kann es auch im Nukleoplasma, Zytoplasma und in der Zytoplasmamembran gefunden werden.

Eine Beteiligung an der Fusion mit der Wirtszelle wird angenommen (Gonzalez-Dunia et al., 1997). Darüber hinaus reguliert es die Replikation des Virus. Experimentell konnte mit Antikörpern gegen einen Teil des Protein M eine Neutralisierung des Virus erreicht werden (Stoyloff et al., 1998). Die RNA des Virus ist im Virusinneren an die virale Polymerase (L), das Phosphoprotein (P), das Nukleoprotein (N) und an das Protein X gebunden. In der Wirtszelle finden sich die Translationsprodukte N und P zuerst im Zellkern und erst später auch im Zytoplasma (Briese et al., 1994). Die Hauptantigene für die humorale Immunantwort des infizierten Wirtes stellen die Polypeptide p24 und p40 dar. Zusammen bilden sie das sogenannte s-Antigen (Ludwig and Bode, 2000; Ludwig et al., 1988). Die Transkription und Replikation läuft im Zellkern durch alternatives Spleißen ab, hierbei werden drei verschiedene mRNAs hergestellt. Dies ist wichtig für die Synthese der Proteinketten M, L und G. Die Proteine N und P spielen im Gegensatz zum M- und G-Protein eine entscheidende Rolle und stellen wichtige Immunkomponenten im Infektionsgeschehen dar. Sie führen zu einer starken Abwehrreaktion des Immunsystems des Wirtes, in deren Folge es aber nicht zu einer Zerstörung des Virus kommt (Ludwig and Bode, 2000; Ludwig et al., 1988). Durch die Immunantwort des Wirtes kommt es zu einer Degeneration der Nervenzellen durch die zytotoxischen Eigenschaften der CD8+-T-Lymphozyten. Die immunmodulierte Pathogenese erfolgt auch unter Beteiligung der CD4+-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen (Narayan et al., 1983b; Stitz et al., 2002).

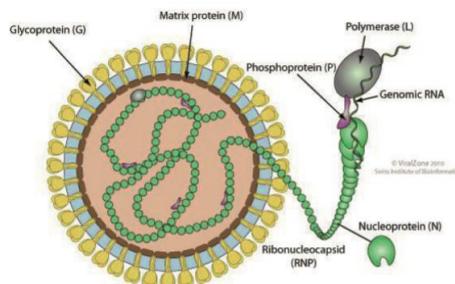


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Bornaviren
(Swiss Institute of Bioinformatics, 2010)

Bornasche Krankheit: Historie

Eine natürliche Infektion mit Borna disease Virus (BoDV) kommt hauptsächlich bei Pferden und Schafen vor. Bei diesen Tieren führt die Infektion zu einer nicht eitrigen Meningoenzephalitis oder Meningo-enzephalomyelitis (Rott and Becht, 1995). Erste Beschreibungen der Erkrankung reichen bis ins Jahr 1660 zurück (Galiberti, 1660). Später wurde die Erkrankung als „Hitzige Kopfkrankheit der Pferde“ beschrieben (Autenrieth, 1823; Dürrwald and Ludwig, 1997; Hiepe, 1958). Vor 1871 trat die Erkrankung vorwiegend im Südwesten Deutschlands auf, während Ende des 19. Jahrhunderts auch von großen Verlusten durch eine „Zerebrospinalmeningitis“ in Sachsen berichtet wurde (Dürrwald and Ludwig, 1997). Die Erkrankung war im Laufe der Zeit unter vielen Namen bekannt, bis nach einem verheerenden Seuchenzug in den Jahren 1894-1896 in der Region Leipzig, genauer in der Amtshauptmannschaft Borna², die Krankheit ihren Namen Bornasche Krankheit erhielt. Im 20. Jahrhundert wurde der Name wissenschaftlich übernommen und im Englischen als Borna disease (BD) bezeichnet (Danner and Mayr, 1973; Ludwig et al., 1973). Erstmals wurde 1909 über histologische Veränderungen in Form von intranukleären Einschlusskörperchen in Neuronen des Zentralnervensystems, die pathognomonisch sind, berichtet (Joest and Degen, 1909). Die ausführlichen histopathologischen Untersuchungen wiesen auf ein Virus als Ursache hin (Joest, 1911). Durch die Übertragung von bakterienfreiem Gehirnhomogenat eines an BD erkrankten Pferdes auf ein Kaninchen konnte eine Erkrankung bei dem Kaninchen ausgelöst werden (Zwick and Seifried, 1925). Die Rückübertragung vom Kaninchen auf das Pferd bestätigte die virale Genese (Zwick and Seifried, 1925). Die Gießener Forschungsgruppe um Zwick veröffentlichte 1927/28 erstmalig die Isolierung von fünf Virusstämmen (Zwick et al., 1927, 1928). Einer dieser Stämme wurde lange als Impfstoff verwendet (Zwick, 1939; Zwick et al., 1927, 1928). Dieser Stamm konnte auch erfolgreich im Hühnerei angezchtet und danach auf Kaninchen übertragen werden (Nitzschke and Rott, 1957; Rott and Nitzschke, 1958). Hierbei wurde virushaltige Gewebesuspension auf das gesenkte Chorion eines Hühnereis an Tag fünf der Bebrütung gegeben. Die Vermehrung des Virus gelang über vier Kaninchen-Ei-Wechselpassagen und anschließend über sechs Passagen im Ei (Nitzschke and Rott, 1957). In einer späteren Versuchsreihe konnten

² Verwaltungsbezirk im Königreich Sachsen, später Freistaat Sachsen. Das Gebiet gehört heute zum Landkreis Leipzig in Sachsen. (Quelle: Wikipedia)

das so wechsellpassagierte Virus der Bornaschen Krankheit nach erneuter 12-tägiger Bebrütung im Ei erfolgreich intrazerebral auf Kaninchen übertragen werden. In diesen Versuchsreihen konnte das Virus erfolgreich über zwölf Reihenpassagen angezüchtet werden. Die Infektiosität wurde anschließend durch intrazerebrale Rückimpfung auf das Kaninchen gesichert (Rott and Nitzschke, 1958).

Epidemiologie und Klinik von BD

Die Bornasche Krankheit konnte bisher nur in Deutschland, Österreich, Liechtenstein und der Schweiz nachgewiesen werden, dagegen werden Antikörper gegen BoDV weltweit gefunden (Kolodziejek et al., 2005). Bei der BD handelt es sich um eine Enzephalomyelitis, die in der frühen Phase von Verhaltensstörungen über Veränderung des Sehnsinns bis zu Störungen der Motorik geprägt ist. In der späten Krankheitsphase werden Lethargie, Somnolenz und Stupor sowie Ataxien und Paresen beobachtet (Grabner and Fischer, 1991). Die natürliche BoDV-Infektion wird neben den Fehlwirten Pferden und Schafen auch bei anderen Spezies beobachtet. Natürliche Infektionen wurden bei Rindern und Ziegen (Bode et al., 1994; Caplazi et al., 1994; Ihlenburg, 1962), Kaninchen (Metzler et al., 1978) einem Hund (Weissenböck et al., 1998), Neuweltkameliden (Altmann et al., 1976; Jacobsen et al., 2010; Schüppel et al., 1994) einem Zwergflusspferd, Faultier und Varis-Äffchen (Schüppel et al., 1994; Schüppel et al., 1995) beschrieben. Ob es einen Zusammenhang zwischen einer BoDV-Infektion und der *staggering disease* der Katze gibt, wird von einigen Autoren als nicht geklärt angesehen (Lundgren et al., 1995; Nowotny and Weissenböck, 1995; Wensman et al., 2014). Auch ist noch ungeklärt, ob das BoDV als Krankheitserreger bei Straußen eine Rolle spielt (Malkinson et al., 1993). Neben dem Vorkommen der Bornaschen Krankheit bei verschiedenen Tierarten wird auch eine Infektion beim Menschen diskutiert (Hoffmann et al., 2015; Richt et al., 1997). Erste Hinweise ergaben serologische Untersuchungen an Patienten mit affektiven Störungen (Rott et al., 1985). Kürzlich wurden drei Todesfälle bei Züchtern von Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*) beschrieben. Die drei Züchter starben zwischen den Jahren 2011 bis 2013 an einer Enzephalitis. In der Untersuchung von Organproben eines Bunthörnchens aus der Zucht eines Verstorbenen mittels RT-qPCR wurde ein neues Bornavirus nachgewiesen, das auch in der Gehirnprobe der verstorbenen Patienten nachweisbar war. Das neue Virus unterscheidet sich von den bekannten

Bornaviren und wird vorläufig *Variegated squirrel 1 bornavirus* (VSBV-1) genannt (Hoffmann et al., 2015).

Experimentelle Infektion

Experimentell lassen sich viele Tierspezies mit BoDV infizieren. Nach Infektion von Kaninchen und Meerschweinchen konnten neurologische Symptome, die denen der BD beim Pferd glichen, festgestellt werden (Zwick, 1939; Zwick and Seifried, 1925). Die Infektion von Spitzhörnchen führte zu einem gestörten Sozialverhalten (Sprankel et al., 1978). Bei Rhesusaffen konnte nach intrazerebraler Infektion bei einem Teil der Tiere neurologische Symptome beobachtet werden (Richt et al., 1997). Bei experimentell infizierten Ratten ist der Krankheitsverlauf von der Genetik des Rattenstamms (Herzog et al., 1991), dem Immunstatus (Herzog et al., 1984; Herzog et al., 1985; Narayan et al., 1983a, b) und der verwendeten Virusvariante (Herden et al., 2000) abhängig. Auch Mäuse lassen sich experimentell infizieren. Dabei kommt es nur bei neonatal infizierten Mäusen mit einem mausadaptierten BoDV zu neurologischen Erkrankungen. Die Schwere der Erkrankung neonatal infizierter Mäuse ist dabei abhängig vom Mäusestamm (Hallensleben et al., 1998). Im Gegensatz zum Rattenmodell erkranken adult infizierte Mäuse nicht (Kao et al., 1984; Rubin et al., 1993).

Reservoir des BoDV

Experimentelle Untersuchungen an Lewis-Ratten ließen schon früh Nagetiere als mögliches Reservoir für das BoDV vermuten. Infiziert man neonatale Lewis-Ratten innerhalb von 24 Stunden nach Geburt intrazerebral, kommt es zu einer tolerierten, persistierenden Virusinfektion. Bei diesen Tieren kommt es zu einer Virusverbreitung über das Gehirn in die Peripherie und damit zur Ausscheidung von infektiösem Virus über Urin, Lakrimalflüssigkeit, Nasensekret und Speichel (Morales et al., 1988; Sauder and Staeheli, 2003). Lässt man die neonatal infizierten Ratten zusammen mit den Muttertieren, so erkranken die Muttertiere regelmäßig. Anhand der histopathologischen Veränderungen (Ödematisierung im Frontalhirn), die bei der Lewis-Ratte charakteristisch für eine intranasale Infektion ist, ließ sich bei den Muttertieren als Infektionsroute die intranasale Infektion nachweisen (Morales et al., 1988). Bei freilebenden Nagetieren konnten bisher nur anti-BoDV-Antikörper, jedoch kein Virus (weder im Gehirn noch in den Organen) nachgewiesen werden (Bourg et al.,

2013; Dürrwald et al., 2014). Auch Wildvögel wurden als Virusreservoir diskutiert (Berg et al., 2001).

2006 konnte als Virusreservoir die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) identifiziert werden (Hilbe et al., 2006). Inzwischen konnte neben dem Endemiegebiet in der Schweiz (Puorger et al., 2010) auch für Endemiegebiete in Bayern und in Sachsen-Anhalt die Feldspitzmaus als Virusreservoir bestätigt werden (Bourg et al., 2013; Dürrwald et al., 2014). Weitere Untersuchungen an lebenden Feldspitzmäusen zeigten, dass infektiöses Virus über Speichel, Urin und Sekrete der Flankendrüse ausgeschieden wird (Nobach et al., 2015). Alle Tierspezies, die sich auf natürliche Weise über das von der Feldspitzmaus ausgeschiedene Virus intranasal infizieren („infektiöser Staub“), sind Fehlwirte (Nobach et al., 2015). Wie sich das BoDV in der Population der Feldspitzmäuse hält, ob durch vertikale oder horizontale Übertragung, ist noch nicht geklärt.

2.2.1 Horizontale und vertikale Übertragung des Mammalian 1 bornavirus

Bisher konnten beim Pferd weder eine horizontale (Donner, 1998), noch eine vertikale Übertragung nachgewiesen werden (Werner, 2000). Die Untersuchungen zur vertikalen Übertragung betrafen klinisch inapparent BoDV-infizierte Stuten und Stuten mit akutem Krankheitsverlauf. Es wurden die Fohlen von 14 BoDV-seropositiven Stuten *post partum* untersucht. Alle Fohlen hatten im Serum keine Antikörper gegen BoDV vor der Aufnahme von Kolostralmilch. Nach Aufnahme von Kolostrum waren maternale anti-BoDV-Antikörper nachweisbar. Diese konnten nach sechs bis zwölf Monaten jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Außerdem waren in peripheren Blutzellen der Fohlen mittels RT-PCR keine virusspezifische RNA nachweisbar. Auch bei zwei klinisch apparenten BD-Fällen bei trächtigen Stuten gab es keine Hinweise auf eine vertikale Übertragung. Im ersten Fall konnte retrospektiv das Fohlen einer akut an BD erkrankten Stute durch Schnittenbindung entwickelt und mit der Flasche aufgezogen werden. Bei diesem Pferd gab es über einen Beobachtungszeitraum von acht Jahren keinen Hinweis auf eine vertikale Übertragung. Es wurden weder Antikörper gegen BoDV im Serum oder Liquor noch virusspezifische RNA nachgewiesen. Bei dem zweiten Fall handelt es sich um das Fohlen einer an BD erkrankten Kaltblutstute, das nach Kaiserschnitt nicht überlebte. Auch hier konnten keine Antikörper gegen BoDV nachgewiesen werden. Alle Organe des Fohlens wurden zusätzlich auf

infektiöses Virus (Virus-Isolierung auf REB-Zellen), BoDV-Antigen (Westernblot, Immunhistochemie) und BoDV-RNA (RT-PCR) untersucht. Alle Methoden wiesen ein negatives Ergebnis auf. Eine zusätzlich durchgeführte histologische Untersuchung aller Organe zeigte keine Auffälligkeiten. Bei der euthanasierten Mutterstute hingegen konnte infektiöses Virus, Virusantigen, virusspezifische RNA und anti-BoDV-Antikörper im Serum und Liquor nachgewiesen werden (Werner, 2000). Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus Japan. Eine tragende Stute aus dieser Untersuchung wurde wegen Ataxien und Paresen eingeschläfert und auf eine BoDV-Infektion untersucht. Das Gehirn zeigte histologisch neuronale Degenerationen sowie Nekrosen und Hämorrhagien. In Gehirnmateriale wurde außerdem BoDV-RNA nachgewiesen. Das Gehirn des Fetus zeigte histologisch keine Veränderungen, aber auch dort konnte BoDV-RNA nachgewiesen werden. Die BoDV-Sequenzen beider Proben waren identisch (Hagiwara et al., 2000). Die Ergebnisse sind jedoch fraglich, da die Virussequenz mit der Sequenz übereinstimmt, die für das Virus-Cluster Baden-Württemberg / Bayern II ermittelt wurde. Phylogenetische Analysen zeigten, dass unterschiedliche Virus-Cluster für die jeweiligen Endemiegebiete typisch sind (Dürwald et al., 2006; Kolodziejek et al., 2005). Die außerhalb der Endemiegebiete nachgewiesenen BoDV-Sequenzen zeigten eine große Übereinstimmung mit den Laborstämmen, mit denen in den entsprechenden Laboren gearbeitet wurde. Somit kann bei diesen Ergebnissen eine Laborkontamination nicht ausgeschlossen werden (Dürwald et al., 2007). Eine vertikale Übertragung bei neugeborenen Mäusen von experimentell infizierten Versuchstieren konnte in einer Studie nachgewiesen werden. Hierfür wurden sechs Wochen alte Mäuse intraperitoneal mit BoDV infiziert und dann zur Zucht verwendet. Ein Teil der tragenden Mäuse wurde bereits am Tag zehn und vierzehn der Trächtigkeit getötet und ihre Feten untersucht. Von zwei Muttertieren wurden die Würfe sieben Tage nach Geburt untersucht. Alle neugeborenen Mäuse wiesen BoDV-RNA im Gehirn auf. Auch in der Placenta war BoDV-RNA nachweisbar. Immunhistochemisch konnte BoDV p40 in den Neuronen im Gehirn bei allen neugeborenen Mäusen und bei den Feten nach dem vierzehnten Tag der Trächtigkeit nachgewiesen werden. Bei den Feten des zehnten Tages konnte kein Hinweis auf eine BoDV Infektion gefunden werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es bei Mäusen während der Trächtigkeit zu einer vertikalen Übertragung von BoDV auf den Fetus kommen kann (Okamoto et al., 2003).

2.3 Aviäre Bornaviren

2008 wurde mit dem Virochip-Verfahren (Microarrayanalyse) ein Virus aus Papageien mit einer neuronalen Drüsenmagendilatation (PDD) nachgewiesen (Kistler et al., 2008). Dieses Virus zeigte eine Genomorganisation, die typisch für Bornaviren ist. Das Virus zeigte eine Übereinstimmung in den für Bornavirus typischen Merkmalen: die sechs Proteine N, P, X, M, G und L, die sechs verschiedenen Open Reading Frames (ORF) und die Anordnung von regulatorischen Elementen. Eine Übereinstimmung ergab auch die ähnliche Anordnung von Initiations- und Terminationsstellen und der Splicingsignale der Introns. Allerdings zeigte das diskutierte Virus nur eine Sequenzhomologie von 64% zu BoDV (Kistler et al., 2008). Parallel dazu wurden von Honkavuori et al. (2008) mit Pyrosequenzanalyse zwei zu dem von Kistler et al. (2008) gefundenem Virus ähnliche Viren gefunden. Aufgrund der Ähnlichkeit mit BoDV wurde das Virus den *Bornaviridae* zugeordnet und Aviäres Bornavirus genannt. Rinder et al. (2009) untersuchten den Unterschied zu den Bornaviren der Säugetiere genauer. So scheint den aviären Bornaviren eine regulatorische Sequenz in 3'-Richtung des ORF für das X-Gen zu fehlen. Des Weiteren ist im Gegensatz zu den Bornaviren der Säugetiere bei den aviären Bornaviren die Startregion S2 direkt in die 5'-Richtung des ORF für das N-Gen gerichtet. Die Unterschiede betreffen also hauptsächlich die Transkriptionseinheiten 1 und 2 (Rinder et al., 2009).

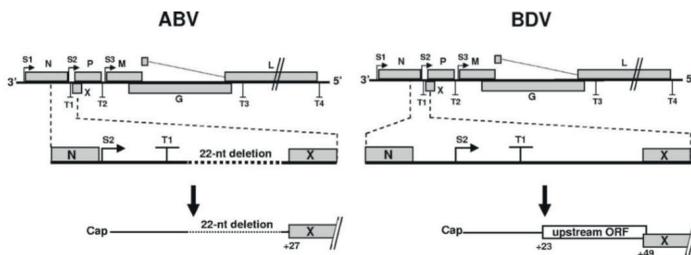


Abbildung 2: Genomstruktur von aviären Bornaviren und Bornaviren der Säugetiere im Vergleich
Fehlende regulatorische Sequenz in 3'-Richtung des ORF für das X-Gen bei den aviären Bornaviren. Im Gegensatz zu den Bornaviren der Säugetiere ist bei den aviären Bornaviren die Startregion S2 direkt in die 5'-Richtung des ORF für das N-Gen gerichtet (Rinder et al., 2009).

Bis heute sind bei Psittaziden acht verschiedene Bornavirusvarianten entdeckt worden (Honkavuori et al., 2008; Kistler et al., 2008; Philadelpho et al., 2014; Rubbenstroth et al., 2012; Weissenbock, 2009). Auch bei anderen Vogelspezies konnten aviäre Bornaviren nachgewiesen werden. So wurden aviäre Bornaviren bei Kanarienvögeln und Astrilden (Rubbenstroth et al., 2013; Rubbenstroth et al., 2014b; Weissenbock et al., 2009), bei Höcker- und Trompeterschwäne, Kanada-, Schnee- und Zwergschneegänse sowie Stockenten, Brautenten und Möwen (Delnatte et al., 2011; Delnatte et al., 2013; Guo et al., 2012; Guo et al., 2014; Guo et al., 2015; Payne et al., 2012) nachgewiesen.

Erst kürzlich wurde das *aquatic bird bornavirus 2* (ABBV-2) vormals ABV-MALL entdeckt. Es wurde in Stockenten in den USA gefunden (Guo et al., 2014). Eine weitere Virusvariante bei Papageien wurde 2015 beschrieben. Bei der Virusvariante handelt es um eine bereits 2008 gefundene Variante, die aber erst 2015 als Folge von fehlenden ausführlichen Genomsequenzen bestimmt werden konnte (Kuhn et al., 2015; Marton et al., 2015). Diese unterscheidet sich in der Sequenz deutlich vom *Psittaciform 1 bornavirus*. Auch ein Vergleich mit anderen Virusvarianten erbrachte nur eine 68% Sequenzhomologie zu CnBV-2. Dies erforderte die Neuklassifizierung unter *Psittaciform 2 bornavirus*. Die neue Virusvariante wurde *parrot bornavirus 5* (PaBV-5) genannt. Noch nicht klassifizierte Virusvarianten von aviären Bornaviren sind aktuell PaBV-6 (Kuhn et al., 2015) und PaBV-8 (Philadelpho et al., 2014). Bei PaBV-8 gehen die Autoren von einer neuen Variante des *Psittaciform 1 bornavirus* aus, da eine hohe Sequenzhomologie zu diesem besteht. Die Einteilung der aviären Bornaviren nach der aktuellen veröffentlichten Nomenklatur ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Spezies	Virus
<i>Passeriform 1 bornavirus</i>	<i>Canary bornavirus 1, 2, 3 (CnBV-1, -2, -3)</i>
<i>Passeriform 2 bornavirus</i>	<i>Estrildid finch bornavirus 1 (EsBV-1)</i>
<i>Psittaciform 1 bornavirus</i>	<i>Parrot bornavirus 1, 2, 3, 4 und 7 (PaBV-1, -2, -3, -4 und PaBV-7)</i>
<i>Psittaciform 2 bornavirus</i>	<i>Parrot bornavirus 5 (PaBV-5)</i>
<i>Water bird 1 bornavirus</i>	<i>Aquatic bird bornavirus 1 (ABBV-1)</i>
	<i>Aquatic bird bornavirus 2 (ABBV-2)</i>
Noch nicht klassifizierte aviäre Bornaviren	<i>Parrot bornavirus 6</i>
	<i>Parrot bornavirus 8</i>
	<i>Munia bornavirus 1 (MuBV-1)</i>

Tabelle 1: Übersicht der aviären Bornaviren nach der aktuellen Nomenklatur (Afonso et al., 2016)

Natürliches Vorkommen von PaBV

In Europa und Nordamerika findet sich bei Psittaziden am häufigsten PaBV-2 und PaBV-4 (Hoppes et al., 2010; Staeheli et al., 2010; Weissenböck, 2009). Honkavuori et al. fanden 2008 bei drei von drei (100%) Papageien mit PDD aviäre Bornaviren im Gehirn, Drüsenmagen und Nebenniere. In einer weiteren Studie wurden aviäre Bornaviren bei fünf von acht (62,5%) erkrankten Papageien aus den USA und fünf von sieben (71%) aus Israel nachgewiesen (Kistler et al., 2008). 2009 wurde bei sechs Papageien die an PDD erkrankt waren eine Infektion mit aviären Bornaviren beschrieben (Rinder et al., 2009). Auch bei 31 Gewebeproben von Papageien aus Österreich, der Schweiz, Ungarn und Australien die an PDD erkrankt waren konnten aviäre Bornaviren nachgewiesen werden (Weissenböck et al., 2009). Bei einer Untersuchung europäischer Papageienhaltungen konnte PaBV nachgewiesen werden. Es wurden 1442 lebende und 73 tote Vögel aus 215 europäischen Vogelhaltungen untersucht. Die Prävalenz lag bei 22,8 % (Heffels-Redmann et al., 2011). Eine weitere Studie untersuchte Psittaziden aus Brasilien aus konfiszierten Wildfängen. Bei 30 % der 86 untersuchten Tiere wurden im Probenmaterial PaBV-4 RNA oder PaBV-spezifische Antikörper festgestellt (Encinas-Nagel et al., 2014). PaBV kommt somit sowohl bei wildlebenden als auch bei in Menschenobhut gehaltenen Papageien vor.

Experimentelle Untersuchungen von PaBV

In experimentellen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen den aviären Bornaviren und der Erkrankung PDD hergestellt werden. In einer Studie wurden auf multiplen Infektionsrouten (intramuskulär, intraokulär, intranasal und oral) drei Nymphensittiche mit Gehirnmateriale aus einem an PDD erkrankten, PaBV-4 positiven Graupapagei infiziert. Bei allen inokulierten Vögeln konnte eine Erkrankung hervorgerufen und PaBV-4 nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe, die mit Gehirnmateriale aus gesunden Tieren inokuliert wurde, erkrankte hingegen nicht (Gancz et al., 2009). Dieser Versuch deutete zum ersten Mal auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Infektion mit aviären Bornaviren und der Erkrankung PDD hin. Allerdings stützt sich die Studie auf Nymphensittiche eines Bestandes, in dem bereits natürliche Infektionen mit PaBV vorlagen. In einer weiteren Studie wurden zwei Felsensittiche mit dem PaBV-4 Isolat aus Gehirnmateriale eines Gelbbrustaras, der an PDD erkrankt war, intramuskulär infiziert. PaBV-spezifische Antikörper gegen das 38-kDa N-Protein waren 33 Tage nach Infektion im Western-Blot nachzuweisen. PaBV-RNA konnte 62 Tage nach Infektion im Kot nachgewiesen werden. Beide Vögel entwickelten PDD-typische Krankheitsanzeichen. Histopathologisch konnte *post mortem* bei beiden Vögeln eine lymphoplasmazytäre Ganglioneuritis in Kropf, Drüsen-, Muskelmagen und Darm, die typisch für eine PDD ist, festgestellt werden. In den Gehirnprouben konnte PaBV-RNA nachgewiesen werden (Gray, 2010). In einer Infektionsstudie mit PaBV-freien Nymphensittichen konnte nach intrazerebraler und intravenöser Inokulation von PaBV-4 aus einem an PDD erkrankten Hellroten Ara eine Erkrankung bei allen Tieren hervorgerufen werden. Es wurden 19 Nymphensittiche untersucht. Jeweils neun der Vögel wurden intrazerebral oder intravenös mit PaBV infiziert. Zusätzlich wurde ein Sentinel-Nymphensittich als Kontakttier dazugesetzt. Die Nymphensittiche wurden 33 Wochen lang beobachtet und untersucht. Erste Krankheitsanzeichen einer PDD traten nach 159 (intravenöse Gruppe) beziehungsweise nach 199 (intrazerebrale Gruppe) Tagen p.i. bei fünf Vögeln auf (drei aus der intravenösen Gruppe und zwei aus der intrazerebralen Gruppe). Das Sentineltier zeigte keine Auffälligkeiten. In der Sektion konnte bei sieben Vögeln ein vergrößerter Drüsenmagen festgestellt werden. Bei allen Nymphensittichen außer dem Sentineltier konnte sowohl histologisch, immunhistochemisch als auch serologisch und mittels RT-PCR die Infektion und die Erkrankung nachgewiesen werden

(Piepenbring et al., 2012). Im gleichen Versuchsmodell wie zuvor gelang auch die Infektion und Auslösung einer Erkrankung in Nymphensittichen nach Inokulation von PaBV-2 aus einem an PDD erkrankten Nymphensittich. Ähnlich zu PaBV-4 führte die Infektion mit PaBV-2 zu einer persistenten Infektion ab dem sechsten Tag nach Infektion. Ab dem 27. Tag konnte PaBV-2 RNA in Kropf- und Kloakentupfern nachgewiesen werden. Anders als bei der Infektion mit PaBV-4 entwickelten mehr Vögel PDD typische Krankheitsanzeichen. Von den infizierten Nymphensittichen zeigten zwölf klinische Symptome und bei zehn konnte ein vergrößerter Drüsenmagen in der Sektion festgestellt werden. Bei allen infizierten Nymphensittichen konnte sowohl histologisch, immunhistochemisch als auch serologisch und mittels RT-PCR die Infektion mit PaBV-2 nachgewiesen werden (Piepenbring et al., 2016). Somit wurde der kausale Zusammenhang zwischen PaBV-2 und PaBV-4 als Auslöser der PDD erfolgreich bestätigt. Die beiden Versuche aus 2012 und 2016 bestätigten erstmalig die Erfüllung der Henle-Kochschen-Postulate mit statistisch signifikanten Ergebnissen.

2.3.1 Pathogenese und Symptome durch aviäre Bornaviren

Durch die Studien der experimentellen Infektion mit PaBV-4 und PaBV-2 konnten beim Nymphensittich erstmalig Symptombilder und die Pathogenese von PaBV im zeitlichen Verlauf beschrieben werden (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Bereits zwischen dem 33. und 41. Tag nach Infektion mit PaBV-4 traten bei einem Nymphensittich Störungen des Allgemeinbefindes, die Ausscheidung von unverdaulichem Futter und epileptiforme Anfälle auf. Zwei weitere Vögel zeigten nach 116 und 126 Tagen p.i. nur gastrointestinale Symptome. Darüber hinaus konnten bei zwei Nymphensittichen ab dem 159. und 199. Tag p.i. nur neurologische Symptome festgestellt werden. Zwei Nymphensittiche verstarben plötzlich ohne Symptome an Tag 66 und 120 p.i. Durch die histologisch feststellbare lymphoplasmazytäre Infiltration im Gehirn kommt es zu einer Enzephalitis mit neurologischen Symptomen wie Ataxie, Tremor, epileptiforme Anfälle und unkoordinierte Bewegungen (Piepenbring et al., 2012). Nach der Infektion mit PaBV-2 zeigten 12 von 18 Nymphensittichen die typischen gastrointestinalen Symptome einer PDD. Bereits im ersten Drittel der Versuchszeit (1-77d.p.i.) zeigten fünf Vögel heftige Krankheitssymptome mit Abmagerung und Ataxie, alle Vögel hatten einen hochgradig dilatierten Drüsenmagen. Fünf weitere Vögel erkrankten zwischen dem 78. und 154. Tag p.i.

mit milden Symptomen des Gewichtsverlustes und leichter Ataxie. Die Drüsenmagen dieser Tiere waren nur leicht dilatiert. Zwei weitere Nymphensittiche zeigten bis zum Versuchsende nur leichte Symptome wie Gewichtsverlust. (Piepenbring et al., 2016). Bereits vor Entdeckung der aviären Bornaviren wurden die Symptome der PDD in der Literatur beschrieben. Bei der PDD kommt es zu einer nichteitrigen, entzündlichen Infiltration der autonomen Nerven des Magen- und Darmtraktes (Graham, 1991). Dies führt zu einem Innervationsverlust mit darauffolgender Atrophie der glatten Muskulatur des gastrointestinalen Systems (Dahlhausen et al., 2002; Grund and Ritter, 2004; Hughes, 1984; Lierz, 2005). Die Motilitätsstörungen führen zu einer Futteranschoppung. Durch die Überladung des Drüsenmagens kommt es zu einer Dilatation, die der Erkrankung PDD ihren Namen gegeben hat (Gregory, 1995). Nach Fortschreiten der Erkrankung und starker Futteranschoppung kann das Duodenum ebenfalls dilatieren (Busche et al., 1985; Lutz and Wilson, 1991). Durch den Druck des Futters auf die dilatierten Magen- und Darmwände können diese auch rupturieren (Shivaprasad et al., 1995; Turner, 1984). Die ersten klinischen Anzeichen für eine PDD sind unverdaut ausgeschiedene Körner im Kot. Aber auch Durchfall, Erbrechen oder Regurgitieren und Polyurie/Polydypsie können Zeichen einer Drüsenmagendilatation sein (Clark, 1984; Mannl et al., 1987; Ridgway and Gallerstein, 1983; Turner, 1984; Woerpel and Rosskopf, 1984). Durch die Maldigestion des Futters magern die Vögel trotz Futteraufnahme ab und verhungern schließlich (Ridgway and Gallerstein, 1983; Vice, 1992; Woerpel and Rosskopf, 1984). Die beiden Studien von Piepenbring et al. (2012 und 2016) zeigten deutlich die beiden Hauptsymptome einer Infektion mit aviären Bornaviren. Neben den klassischen Symptomen einer PDD konnten neurologische Symptome sowohl alleine als auch in Kombination auftreten. Erste Krankheitsanzeichen konnten nach experimenteller Infektion bereits nach 33 Tagen beobachtet werden.

2.3.2 Diagnose der klinischen Erkrankung einer Infektion mit PaBV

Der Verdacht auf eine Erkrankung kann anhand der klinischen Symptome gestellt werden. Hierbei muss zwischen den beiden Hauptleitsymptomen PDD und neurologische Störungen unterschieden werden. Klassisch für die PDD sind Abmagerung und Apathie. Im Röntgenbild und endoskopisch können ein vergrößerter Drüsenmagen sowie eine verlängerte Passagezeit von Futter festgestellt werden (Woerpel et al., 1984). Zusätzlich können neurologischen Symptome auftreten. Beides kann

kombiniert oder getrennt voneinander auftreten. Die PDD kann mit Hilfe einer histopathologischen Untersuchung einer Kropfbiopsie diagnostiziert werden (Doolen, 1994). Dort kann der Nachweis lymphoplasmazytärer Infiltrate in Ganglienregionen des Kropfes erfolgen (Boutette and Taylor, 2004). Bei der Kropfbiopsie ist das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen sehr hoch, da nicht immer ausreichend Nervengewebe biopsiert wird. Sicherer für die Diagnose ist die kombinierte Biopsie aus Drüsen- und Muskelmagen. Damit wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen durch die Auswahl verschiedener Stellen im Magen-Darmtrakt reduziert. Als Standarduntersuchung hat diese aber zu große gesundheitliche Risiken für den Vogel (Gregory et al., 1996). Zusätzlich sollte der spezifische Nachweis einer Infektion mit aviären Bornaviren erfolgen (siehe 2.3.3). *Post mortem* kann zusammenfassend anhand der klinischen Symptome und der histopathologischen Untersuchung die Erkrankung diagnostiziert werden.

Als Differentialdiagnosen der Erkrankung des Gastrointestinaltraktes sollten Infektionen, Fremdkörper oder Neoplasien ausgeschlossen werden. Findet sich nur eine Dilatation des Drüsenmagens ohne weitere klinische Symptome, muss an spezies- oder altersspezifische Veränderungen gedacht werden. Beispielweise haben Edelpapageien als Weichfresser im Vergleich zu Körnerfressern immer einen großen Drüsenmagen. Genauso zeigen Jungtiere vor der Aufnahme von Festfutter und erwachsene Papageien, die ausschließlich mit Pellets gefüttert werden, eine physiologische Vergrößerung des Drüsenmagens. Bei Symptomen aus dem zentralnervösen Bereich können Vitamin- und Mineralmangel ursächlich sein. Auch Schwermetallintoxikationen, giftigen Pflanzen oder Organophosphate sowie Chemikalien können starke neurologische Symptome auslösen. Darüber hinaus können psittazine Herpesviren, Paramyxoviren, Adenoviren oder das Eastern Equine Encephalomyelitis Virus sowie Salmonellose oder eine Infektion mit Chlamydien ähnliche Symptome verursachen. Bei unspezifischen Symptomen müssen auch internistische Probleme in Betracht gezogen werden (Speer, 2015).

2.3.3 Molekularbiologische Nachweismethoden einer Infektion mit Aviären Bornaviren

RT-PCR

Für die Detektion der Gene L, M und N der aviären Bornaviren stehen verschiedene RT-PCR-Protokolle zu Verfügung. Hierfür muss die virale RNA aus der Probe isoliert werden. Nach der Extraktion kann die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Diese kann dann mittels einer RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese ausgewertet werden. (Kistler et al., 2008; Weissenbock, 2009). Für die verschiedenen aviären Bornaviren sind die zur Verfügung stehenden RT-PCR-Protokolle unterschiedlich sensitiv. Die Wahl des PCR-Protokolls hängt davon ab, welche Virusvariante in der Probe vermutet wird. Für ein breites Spektrum an aviären Bornavirusvarianten stehen konventionelle PCR-Protokolle zur Verfügung, deren Primer sich gegen die Konsensussequenz des N-Gens (Ncon) beziehungsweise M-Gens (Mcon) der Virusvarianten PaBV-1 bis -5 sowie BoDV-1 und -2 richten (Kistler et al., 2008). Auch der Nachweis für ABBV-1- und -2 bei Wasservögeln kann mittels konventioneller RT-PCR erfolgen (Guo et al., 2014; Payne et al., 2011). Für die quantitative Bestimmung von PaBV-4 und PaBV-3 stehen zwei spezifische real-time-RT-PCR-Protokolle zur Verfügung. Die Primer und Sonde binden an Sequenzen des P-Gens (Phosphoprotein). Sie dienen dem Nachweis von PaBV-4 (Primer 1034-1322) und PaBV-3 (Primer 1367) und ermöglichen eine quantitative Analyse anhand des Ct-Wertes < 36 (Honkavuori et al., 2008). Für den Nachweis von PaBV-2 wurde ein neues real-time-RT-PCR-Protokoll etabliert, da die bisherigen Primer dieses nicht detektieren konnte. Wie bei der real-time-RT-PCR für die Detektion von PaBV-4 und PaBV-3 wurde die Sequenz des P-Gens als Grundlage genutzt und Primer und Sonde für PaBV-2 modifiziert (Piepenbring et al., 2016). Für Virusvarianten der Spezies *Passeriform 1 bornavirus* und *Passeriform 2 bornavirus* kann eine gegen die Konsensussequenz des N-Gens von CnBV-1 und -2 gerichtete RT-PCR (Ccon) verwendet werden. Diese zeigte sich im Vergleich zur Ncon- und Mcon-PCR bei diesen Virusvarianten sensitiver (Rubbenstroth et al., 2013; Rubbenstroth et al., 2014b). Bei Sperlingsvögeln kann darüber hinaus auch die gegen die Konsensussequenz des P-Gens von CnBV-1, -2 und MuBV-1 gerichtete RT-PCR (Fcon) verwendet werden (Rubbenstroth et al., 2014c). Der Nachteil des Virus-RNA-Nachweises mittels PCR ist, dass bereits vor der Untersuchung die wahrscheinliche Virusvariante der Probe

vermutet werden muss, um auf das geeignete PCR-Protokoll zurückgreifen zu können. Darüber hinaus kann es nötig sein, dass verschiedene PCR-Protokolle eingesetzt werden müssen, beginnend mit der wahrscheinlichsten, um die Probe sicher untersuchen zu können.

In-situ-Hybridisierung

Weissenböck et al. veröffentlichten 2010 eine Untersuchung mit *In-situ*-Hybridisierung an Gewebeschnitten zum Nachweis von PaBV-RNA. Die *In-situ*-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von messenger-RNA in Gewebeschnitten und Zellen. Sind spezifische mRNA-Sequenzen in den untersuchten Gewebeschnitten vorhanden, weist das darauf hin, dass bestimmte Gensequenzen zum Zeitpunkt der Analyse transkribiert wurden und somit aktiv waren (Leitch et al., 1994). Die Digoxigenin-markierten Sonden aus der Studie detektierten PaBV-mRNA in Gewebeproben des Gehirns, des vegetativen Nervensystemes, der glatten Muskulatur des Magen- und Darmtraktes sowie Zellen des Myokard. Allerdings detektierten sie von elf immunhistochemisch positiven Proben nur sieben (Weissenböck et al., 2010).

Antigennachweis mittels Immunhistochemie

Zum Nachweis von viralem Antigen wird am Gewebsschnitt eine Reaktion mit Antikörpern durchgeführt. Hierfür werden meist oligoklonale Antikörper vom Kaninchen oder monoklonale von der Maus verwendet. Auf Gewebeschnitte wird ein viruspezifischer Erstantikörper gegeben, an den dann ein anti-Spezies-Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, binden kann. Durch eine enzymatische Katalysation kommt es anschließend zu einer Farbreaktion, die mikroskopisch ausgewertet werden kann. Bisher zeigte sich, dass polyklonale Antikörper gegen das P-Protein von BoDV erfolgreich zum Nachweis von aviären Bornaviren verwendet werden können (Rinder et al., 2009; Weissenböck, 2009). Auch ein oligoklonaler BoDV-Antikörper gegen das P-Protein wurde in Studien erfolgreich eingesetzt (Piepenbring et al., 2016). Hierfür wird die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Methode angewendet mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-BDV-p24-Primärantikörper und biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG als Sekundärantikörper. Um die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen, werden die Schnitte mit Chromogen-Diaminobenzidin (DAB) gefärbt (Herden et al., 1999). Während die Antikörper gegen

das P-Protein zufriedenstellende Farbreaktionen auslösen, reagiert der monoklonale Antikörper Bo18, der gegen ein Epitop des N-Proteins von BoDV gerichtet ist, nicht mit dem aviären N-Protein (Herzog et al., 2010; Raghav et al., 2010; Rinder et al., 2009; Weissenbock, 2009; Wünschmann et al., 2011).

Antikörpernachweis

Für den Nachweis von Antikörpern gegen aviäre Bornaviren stehen verschiedene serologische Tests zur Verfügung. Bei der Untersuchung von 19 Papageien eines Bestandes und einem Graupapagei aus einem anderen Bestand, konnten mit einem ELISA hohe Antikörpertiter (1 : 4 000) bei zwei Soldatenaras und dem Graupapagei festgestellt und die Spezifität des Testes anhand eines Western-Blots bestätigt werden. Der ELISA detektierte anti-P40Protein-spezifische Antikörper der aviären Bornaviren. Für den Test wurde rekombinantes N-Protein als Antigen des Bornavirus der Säugetiere verwendet (De Kloet and Dorrestein, 2009). Für die Untersuchung von Papageienseren mittels Western-Blot wurden die Lysate von Entenembryofibroblasten-Kulturen, die mit ABV-4 infiziert waren, verwendet. Zwar detektierte dieser Test eine hohe Prozentzahl der histologisch positiven Proben, im Vergleich zur RT-PCR konnte er aber nur wenig Spezifität aufweisen. Von elf histologisch bestätigten PDD Fällen konnten bei neun (81,8%) mittels Western-Blot PaBV-Antikörper bestätigt werden. In dieser Studie konnten auch bei zwölf gesunden Vögeln bei vier (33,3%) Tieren serologisch Antikörper gegen PaBV nachgewiesen werden. Eine weitere Untersuchung von 94 Serumproben, darunter 19 von an PDD erkrankten Vögeln, ergab den Nachweis von PaBV-Antikörpern in 18 (94,7%) Seren. Alle positiven Seren dieser Untersuchung gehörten zu Vögeln, die an PDD erkrankt waren (Villanueva et al., 2010). Ein indirekter Immunfluoreszenztest wurde 2010 für den Vogel etabliert. Hierfür wurden persistent BoDV-infizierte Madin Darby canine kidney Zellen (MDCK), Epithelzellen aus der Niere eines Hundes, genutzt. Damit gelang die Detektion PaBV-spezifischer Antikörper bei 45,5% (35 von 77) klinisch gesunden Vögeln aus einem Bestand mit bekannter PDD Vorgeschichte. Im Vergleich dazu lag der Nachweis von PaBV-RNA in der RT-PCR und rRT-PCR bei diesen 77 Tieren bei 36%. Somit konnte in dieser Studie bei 34% der Tiere ohne RNA-Nachweis mittels IIFA (Indirect immunofluorescence assay) PaBV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Herzog et al., 2010). Inzwischen wurde der IIFT vom heterologen System auf ein homologes System (persistent PaBV- infizierte CEC-32-

Zellen) umgestellt und in den Versuchen von Heckmann et al. (2015) bereits erfolgreich eingesetzt.

Virus-Isolierung

Ein weiterer Test zur Diagnostik einer Infektion mit aviären Bornaviren ist die Isolierung von infektiösem Virus aus Organmaterial, Tupferproben und Blut (Piepenbring et al., 2012; Rubbenstroth et al., 2012; Rubbenstroth et al., 2013). In einer Studie wurden unterschiedliche Zellkulturen für die Virus-Isolierung untersucht. Die CEC-32-Wachtelfibroblastenzelllinie, die Wachtel-Skelettmuskel-Zelllinie QM7 und die chicken-LMH-hepatoma-Zelllinie als Vogel-Zellkulturen. Darüber hinaus wurden die Säugetierzellkulturen Vero-monkey-kidney-Zellen, Rat-glioma-Zelllinie und die MDCK Zelllinie vom Hund eingesetzt. Diese Studie zeigte, dass Aviäre Bornaviren unterschiedlich gut auf verschiedenen Vogel-Zelllinien wachsen. Auf Säugerzelllinien lässt sich das Virus nicht erfolgreich vermehren (Rinder et al., 2009). Die Wachtelfibroblastenzelllinie CEC-32 eignet sich besonders bei PaBV (Rinder et al., 2009; Rubbenstroth et al., 2012), wohingegen für Sperlingsvögel relevante Bornaviren gut auf der Wachtelmuskelzelllinie QM-7 anzüchtbar sind (Rubbenstroth et al., 2013; Rubbenstroth et al., 2014c). Das *waterbird 1 bornavirus* lässt sich auch gut auf Entenfibroblasten (*duck fibroblasts*, DEFs) anzüchten (Guo et al., 2014; Payne et al., 2011a). Der Virusnachweis der infizierten Zellen erfolgt mittels IIFT.

Beurteilung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden

Alle bisherigen Testverfahren zeigen in ihrer praktischen Durchführung am lebenden Tier Limitierungen bei der Interpretation der Ergebnisse. Die Ergebnisse von Herzog et al. (2010) zeigen, dass in der Immunfluoreszenz nicht alle zuvor mit RT-PCR auf PaBV-RNA getesteten Proben sicher detektiert werden konnten. Allerdings fanden sich unter den Ergebnissen auch 34 % zuvor negative auf PaBV-RNA getestete Vögel, deren Seren im Immunfluoreszenztest positiv reagierten. Genauso zeigen die Untersuchungen von De Cloet und Dorrestein (2009), von Weissenböck et al. (2010) und von Villanueva et al. (2010), dass bei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden von gleichen Proben nicht immer eine Übereinstimmung der Ergebnisse vorhanden ist. Die hängt aber oftmals nicht mit den Testverfahren zusammen, sondern mit dem Zeitpunkt der Infektion im Tier. So können beispielsweise PaBV-Antikörper im

Blut bereits früh nachgewiesen werden, ohne dass infektiöses Virus oder PaBV-RNA in den Tupferproben nachweisbar ist (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012).

Darüber hinaus ist es wichtig das richtige Probenmaterial für die jeweilige Untersuchungsmethode auszuwählen. Für die Untersuchung mittels RT-PCR eignen sich kombinierte Kropf- und Kloakentupfer (Heffels-Redmann et al., 2012). Auch in Kotproben kann virale RNA nachgewiesen werden, allerdings zeigen Studien nur einen unsicheren Nachweis, möglicherweise durch Hemmstoffe im Kot (De Kloet and Dorrestein, 2009). In einer Untersuchung 2009 konnte im Kot von PaBV-positiven Vögeln keine virusspezifische RNA nachgewiesen werden (Enderlein et al., 2009). Dagegen konnte bei einer anderen Untersuchung von Kot und Kloakentupfern PaBV-RNA nachgewiesen und kein Unterschied zwischen den beiden Proben festgestellt werden (Hoppes et al., 2010; Hoppes et al., 2013b). Die Untersuchung von Federkielen auf PaBV-RNA stellt sich als ähnlich unsicher dar. 2011 konnte eine Arbeitsgruppe den Nachweis von PaBV-RNA in Federkielen erbringen. Hierfür wurden 44 Papageien mittels Tupferprobe und Federkiel mit RT-PCR untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sechs Vögel PaBV-RNA in den Federkielen aufwiesen, aber nur einer auch positiv in der Tupferprobe reagierte. In dieser Studie konnte darüber hinaus bei 31 von den 44 Papageien PaBV-Antikörper im Blut nachgewiesen werden (de Kloet et al., 2011). Diese Studie zeigte erstmalig den Nachweis von PaBV-RNA aus Federkielen. Dies ließ sich in einer späteren Studie aber nicht bestätigen (Hoppes et al., 2013b).

Postmortal lässt sich eine Infektion mit aviären Bornaviren jedoch sicher nachweisen, da Proben aus verschiedenen Geweben entnommen werden können und somit zu einem sicheren Ergebnis beitragen. In Kombination mit histologischen Veränderungen lässt sich virale RNA in vielen Geweben nachweisen. Die Organverteilung der virusspezifischen RNA scheint dabei vom Grad der Erkrankung abzuhängen. So finden sich bei erkrankten Tieren in fast allen Organen virale RNA, bei klinisch gesunden, aber PaBV-positiven Tieren dagegen nur im Nervensystem (Lierz et al., 2009). Auch im Versuch von Piepenbring et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass nach experimenteller Infektion mit PaBV-2 deutlich weniger Virus in den Organen der klinisch unauffälligen Tiere zu finden war als in den Erkrankten. Diese Untersuchungen zeigen, dass bei latenten Trägern oder im Stadium einer frühen Infektion der Nach-

weis von PaBV schwierig sein kann. Nach dem bisherigen Stand der Forschung ist die sicherste Untersuchung am lebenden Tier eine Kombination aus Nachweis viraler RNA mittels RT-PCR und dem serologischen Nachweis von Antikörpern.

2.3.4 Therapie und Prophylaxe

Therapieansätze zur Behandlung einer Infektion mit aviären Bornaviren mit Amantadin zeigten bisher nur mäßigen Erfolg (Gancz et al., 2010). Erste Erfolge hingegen zeigen Therapieversuche mit Cyclosporin A zur Immunsuppression (Gancz et al., 2012; Hoppes et al., 2012). Da die immunsupprimierende Wirkung bei Vögeln fatale Infektionen wie beispielsweise eine Aspergillose nach sich ziehen kann, besteht die gegenwärtige klinische symptomatisch-palliative Therapie aus dem Einsatz nichtsteroidaler Antiphlogistika, um die Entzündung der Nerven zu reduzieren. In einer Studie mit Celecoxib konnte eine erste Verbesserung der klinischen Symptomatik nach einer Woche erzielt werden. (Dahlhausen et al., 2002). In einer weiteren Studie wurde Meloxicam eingesetzt (Hoppes et al., 2013a). Beide Wirkstoffe werden von Vögeln gut vertragen und können auch über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden. Darüber hinaus können unterstützende Maßnahmen je nach Symptomatik eingeleitet werden. Bei Nährstoffmangel und Abmagerung kann voraufgeschlossenes Futter als Brei verabreicht werden. Auch Pellets eignen sich gut, da sie das Futter in leichtverdaulicher Form darbieten. Bei Passagezeitverlängerungen können Antimetika eingesetzt werden. Ganz besonderes Augenmerk sollte auf die Behandlung von Sekundärinfektionen gelegt werden (Lierz, 2005; Suedmeyer, 1992). Eine erfolgreiche, zur Ausheilung führende Therapie der Infektion mit aviären Bornaviren ist nicht bekannt.

Aktuelle Untersuchungen zielen auf die Entwicklung eines Impfstoffes hin. Eine Studie zur Impfung als Prophylaxe wurde 2016 durchgeführt. Der Impfstoff wurde auf Basis viraler Vektoren hergestellt. Als virale Vektoren wurden das Newcastle disease virus (NDV) und das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) ausgewählt, in deren Genome das Nukleoprotein- (N) und Phosphoprotein- (P) Gen von PaBV-4 beziehungsweise CnBV-2 eingebaut wurden. Die Schutzwirkung der Impfstoffe wurde in Impfversuchen für PaBV-4 im Nymphensittich und CnBV-2 in Kanarienvögeln getestet. Das Impfschema bestand aus einer Erstimmunisierung mit NDV und aus ein bis zwei Booster mit MVA. Die geimpften Tiere wurden anschließend mit PaBV-4 oder

CnBV-2 infiziert. Bei den geimpften Tieren zeigte sich eine signifikant verzögerte Virusausscheidung, jedoch kein Schutz vor der Infektion und auch kein Schutz vor der klinischen Manifestation (Olbert, 2016). Somit stellt sich auch die Prophylaxe bislang als schwierig dar. Nach dem bisherigen Stand der Untersuchungen sollte das Ziel sein, PaBV-freie Bestände aufzubauen. Hierfür sollten Vögel vor der Vergesellschaftung wiederholt auf aviäre Bornaviren getestet werden. Darüber hinaus spielen die Einhaltung von Hygienemaßnahmen und Quarantäne eine wichtige Rolle (Heffels-Redmann et al., 2012). Für die weitere Forschung ist es wichtig, den Übertragungsweg der aviären Bornaviren zu untersuchen, um Aussagen über geeignete Prophylaxemaßnahmen treffen zu können.

2.3.5 Übertragungsweg von aviären Bornaviren

Der Nachweis von virusspezifischer RNA aus Kropf- und Kloakentupfern und Kot legen die Vermutung einer oro-fäkalen Aufnahme als Übertragungsweg nahe (Rinder et al., 2009). Auch andere Autoren beschreiben eine intermittierende Ausscheidung mit dem Kot (Raghav et al., 2010) sowie eine Ausscheidung über Urin (Heatley and Villalobos, 2012). Ein Beweis für diese Infektionswege konnte bisher nicht erbracht werden (Kistler et al., 2010; Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009). Allerdings zeigen Beobachtungen eines natürlichen Ausbruches, dass durch Kontakt zwischen den Vögeln eine Übertragung zumindest möglich scheint. Zwölf Vögel von 46 eines Bestandes infizierten sich durch den Kontakt mit einem PaBV-2 positiven Tier. Zehn dieser Tiere verstarben an PDD (Kistler et al., 2010). Bei einer Untersuchung von drei Papageienbeständen über ein Jahr verstarb ein zuvor PaBV-freier Hellroter Ara nach wenigen Monaten nach Vergesellschaftung mit einem PaBV-positiven Partnertier (Heffels-Redmann et al., 2012). Viele weitere Beobachtungen und Untersuchungen zeigen, dass sich gesunde Vögel durch den Kontakt zu PaBV-positiven Tieren nicht immer anstecken (Lierz et al., 2009). Darüber hinaus gibt es viele infizierte Vögel, die über lange Zeit gesund bleiben (De Kloet and Dorrestein, 2009; Heffels-Redmann et al., 2011; Heffels-Redmann et al., 2012; Lierz et al., 2009). In der Untersuchung von Heffels-Redmann et al. (2011 und 2012) konnte gezeigt werden, dass im Untersuchungszeitraum von einem Jahr von 63 untersuchten Papageien 34 der 40 positiv auf PaBV getesteten Papageien klinisch gesund blieben. Untersuchungen zur Feststellung des natürlichen Infektionsweges verliefen bislang erfolglos: Bei Infektionsversuchen am Nymphensittich wurde den intravenös und intrazerebral infi-

zierten Vögeln ein nicht-infiziertes Sentineltier beigesetzt. Im Verlauf der gesamten Studie blieb dieser Vogel klinisch gesund und es konnte keine Infektion mit PaBV nachgewiesen werden, obwohl die Kontaktiere PaBV-RNA ausschieden (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). In einer weiteren Studie wurden 18 Nymphensittiche oral und nasal mit PaBV-4 infiziert. Die Vögel wurden sechs Monate beobachtet und beprobt. Es konnte keine Infektion mit PaBV-4 nachgewiesen werden (Heckmann et al., 2015). Bei Kanarienvögeln konnte experimentell eine Übertragung durch Kontakt herbeigeführt werden. Zu infizierten Kanarienvögeln wurden fünf nicht-infizierte Kontaktiere hinzugesetzt. Bei zwei dieser Vögel konnte anschließend eine persistierende Infektion nachgewiesen werden (Rubbenstroth et al., 2013). Der gleichen Arbeitsgruppe gelang es bei Nymphensittichen unter experimentellen Bedingungen jedoch nicht durch Kontakt eine persistierende Infektion auszulösen (Rubbenstroth et al., 2014a). Bei einem Infektionsversuch mit Graupapageien konnten die Tiere durch subkutane Inokulation persistent infiziert werden, nicht aber durch okulonasale Applikation des Virus (Rinder et al., 2014). Der natürliche Übertragungsweg für aviäre Bornaviren bleibt somit weiterhin unklar.

Da sich PaBV- Antigen auch in Follikelzellen erkrankter Vögel nachweisen lässt (Raghav et al., 2010), wurde vermutet, dass eine vertikale Übertragung möglich ist. Lierz et al. (2011) beschreiben bei einer Untersuchung von 30 abgestorbenen Papageienembryonen den Nachweis von PaBV-RNA im Gehirn von zwei Embryonen. Bei einem Embryo waren die Elterntiere serologisch negativ auf PaBV-Antikörper getestet, aber zeigten PaBV-RNA Nachweis aus dem Kropftupfer. Bei dem zweiten Embryo zeigte nur ein Elternteil, das Weibchen, virusspezifische RNA im Tupfer und war serologisch negativ, das männliche Tier hingegen hatte Antikörper gegen PaBV. Histologisch konnten bei den untersuchten Embryonen allerdings keine PaBV- typischen Veränderungen gefunden werden. Eine Virus-Isolierung gelang ebenfalls nicht. Diese Studie gibt erste Hinweise zur möglichen vertikalen Übertragung, allerdings sind die Ergebnisse limitiert durch die Probenqualität der Embryonen, da der Züchter die Eier nach dem Absterben zur Sicherheit noch einige Tage inkubiert hatte (Lierz et al., 2011). Bei einer Untersuchung von befruchteten Eiern von vier natürlich infizierten Sonnensittichpaaren konnte in allen Embryonen zu Beginn der Entwicklung PaBV spezifische RNA nachgewiesen werden. Nur bei einem Embryo eines Paares wurde im späteren Entwicklungszustand kurz vor Schlupf noch PaBV-RNA in Gehirn, Leber

und Auge nachgewiesen, von einem zwei Wochen alten Küken desselben Paares wurde auch PaBV-RNA im Blut nachgewiesen (Kerski et al., 2012). In derselben Studie konnte nach dem Schlupf nicht bei jedem Küken von positiven Elterntieren PaBV-RNA nachgewiesen werden. Diese Küken zeigten im Blut und Dotter Antikörper, die nach zwei Wochen verschwanden. Die Autoren vermuten, dass sich aus Eiern PaBV positiver Elterntiere durch artifizielle Ei-Inkubation und Handaufzucht PaBV negative Küken entwickeln können (Kerski et al., 2012). Dies zeigt auch die Beobachtung eines Bestandes mit natürlich infizierten Papageien. Bei Handaufzucht von Küken PaBV-positiver Eltern muss ein Nachweis von PaBV mittels RT-PCR von Kropf- und Kloakentupfer sowie Serologie im Küken nicht positiv ausfallen (Wüst et al., 2015). Eine weitere Arbeitsgruppe fand in Eiern und im Gehirn nicht geschlüpfter Embryonen von PaBV-positiven Elterntieren virusspezifische RNA ohne Nachweis von infektiösem Virus (Monaco et al., 2012b). Eine mögliche vertikale Übertragung von aviären Bornaviren wurde auch bei Kanadagänsen beschrieben. Im Dotter eines unbefruchteten Eis freilebender Kanadagänse wurde virusspezifische RNA gefunden. Die Untersuchung wird allerdings limitiert durch den unklaren Virusstatus der Elterntiere. Die Untersuchung fand lediglich in einem Gebiet statt, in dem zuvor Infektionen auftraten (Delnatte et al., 2014). Auch bei Kanarienvögeln konnte gezeigt werden, dass in den Embryonen CnBV-positiver Kanarienvögel virusspezifische RNA nachgewiesen werden kann. Allerdings hatten nur die experimentell infizierten Hennen mit einer persistenten CnBV-Infektion und hoher Virusausscheidung Eier mit CaBV-RNA-positiven Embryonen. Die intermittierenden Ausscheider und die Hennen aus der Kontaktgruppe legten ausschließlich negative Eier. Eine Virus-Isolierung gelang nicht (Rubbenstroth et al., 2013). Wie in den Studien zuvor wurde kein infektiöses Virus, sondern lediglich virale RNA aus dem Embryo nachgewiesen. Alle Studien geben Hinweise auf eine mögliche vertikale Übertragung, der Beweis einer Übertragung auf diesem Wege ist aber, insbesondere durch die fehlende Virus-Isolierung aus dem Embryo, noch nicht erbracht. Wie einige Autoren schon andeuten, stellt sich die Frage, ob durch die Handaufzucht von Küken PaBV-positiver Eltern negative Nachzuchten möglich sind (Kerski et al., 2012; Lierz et al., 2011) und wie sich Küken von positiven Elterntieren entwickeln. Möglicherweise entwickeln sich aus Embryonen, deren Immunsystem sich schon im Ei mit aviären Bornaviren auseinandersetzen musste, latent infizierte Dauerausscheider (Monaco et al., 2012a).

Ziel dieser Studie ist es zu klären, ob eine vertikale Übertragung über das Ei überhaupt generell möglich ist. Durch die Anzucht von PaBV-Varianten auf embryonalen Nymphensittichgehirn- und fibroblastenzellkulturen (NEB/NEF) soll geklärt werden, ob eine Infektion von embryonalen Zellen *in vitro* überhaupt möglich ist und wie sich die Wachstumseigenschaften der Varianten darstellen. Darüber hinaus soll durch die Inokulation von PaBV in das Ei der erste Teil der natürlichen Infektion übersprungen werden. Somit wird sichergestellt, dass infektiöses Virus im Ei vorhanden ist. Die erfolgreiche Virusvermehrung im Ei und die Infektion der Embryonen erbringen hierbei den Beweis, dass eine vertikale Übertragung unter der Bedingung, dass infektiöses Virus ins Ei gelangt, auch auf natürlichem Wege stattfinden kann. Für die Inokulation von PaBV wurde ein Modell als Grundlage gewählt, dass die Anzucht von BoDV im Hühnerei beschreibt. Dabei wird Virusmaterial am fünften Tag der Inkubation auf das abgesenkte Chorion gegeben. Eine Anzucht nach Inokulation in den Dotter gelang hingegen nicht (Nitzschke and Rott, 1957; Rott and Nitzschke, 1958). Dieses Modell wurde für die Inokulation auf die Chorioallantoismembran der Nymphensitticheier übernommen. Da aber Untersuchungen zeigen, dass bei einigen Eiern natürlich infizierter Vögel virusspezifische RNA auch im Dottersack (Delnatte et al., 2014; Kerski et al., 2012) nachgewiesen werden konnte, wurde für diese Arbeit zusätzlich die Instillation in den Dottersack gewählt, um die Virusanzucht und -verteilung von PaBV im Ei und im Embryo zu untersuchen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsaufbau und Versuchsablauf

Zur Untersuchung der Möglichkeit einer vertikalen Übertragung an Nymphensittichen wurden in einem ersten Versuch Zellkulturen von embryonalen Nymphensittichen hergestellt. Diese wurden mit PaBV-Varianten inokuliert und die Wachstumseigenschaften *in vitro* beschrieben. Somit konnte überprüft werden, ob die Virusvarianten die Zellen der Nymphensittichembryonen infizieren können. Diese Studie wurde durch die Inokulation von PaBV in befruchtete Nymphensitticheier *in vivo* fortgeführt. Hierfür wurden in einem ersten Versuch embryonierte Eier mit PaBV-4 in den Dottersack inokuliert. In einem zweiten Versuch wurden die embryonierten Eier in vier Gruppen aufgeteilt und mit PaBV-4 in den Dottersack (Gruppe 1) und auf die Chorioallantoismembran (Gruppe 2) inokuliert. Gruppe 3 (Dottersack) und Gruppe 4 (Chorioallantoismembran) wurden mit PaBV-2 inokuliert. Darüber hinaus standen Eier von natürlich infizierten *Pyrrhura spp.* zur Untersuchung zur Verfügung. Um eine Kontamination bei Eröffnung der Eischale zur Untersuchung der Embryos zu verhindern, wurde in einem Vorversuch ein geeignetes Desinfektionsmittel untersucht.

3.1.1 PaBV-Isolate

3.1.1.1 Herkunft der PaBV-Isolate

PaBV-4-Isolat

Die PaBV-4-Variante Ps34 wurde aus Gehirnmateriale eines 17 Jahre alten Hellroten Aras (*Ara macao*) isoliert, der zuvor hochgradig abgemagert war. Histologisch wurde eine Psittazine Drüsenmagendilatation (PDD) diagnostiziert. In Proben von Gehirn und Drüsenmagen wurde PaBV-4 RNA nachgewiesen. Das Virusisolat wurde bereits erfolgreich in vorhergehenden Infektionsversuchen verwendet und zur Sequenzierung gegeben (Piepenbring et al., 2012).

PaBV-2-Isolat

Die PaBV-2-Variante Ps39 wurde aus dem Gehirn eines sechs Monate alten Nymphensittichs (*Nymphicus hollandicus*) isoliert. Pathologisch-anatomisch wurde ein hochgradig dilatierter Drüsenmagen nachgewiesen. Der Vogel war hochgradig

abgemagert. Im gesamten Magen-Darm-Trakt befanden sich unverdaute Körner. Auch bei diesem Vogel wurde histopathologisch eine PDD diagnostiziert und PaBV-2 RNA in Organproben nachgewiesen. Das Ps39 wurde bereits erfolgreich in Infektionsversuchen eingesetzt und sequenziert (Piepenbring et al., 2016).

3.1.1.2 Herstellung der PaBV-Isolate

Die Herstellung der Virusisolate wurde in Zusammenarbeit durch Frau Dr. Sibylle Herzog am Institut für Virologie³ durchgeführt.

Für die Gewinnung der Virusisolate wurde das jeweilige Gehirnmateriale in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)⁴ mit 2 % fetalem Kälberserum durch Ultraschall zu einer 10 %igen Gehirnsuspension aufgeschlossen und bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Mit dem jeweiligen Virusüberstand wurden Zellen der Wachtelzelllinie CEC-32 infiziert und alle vier Tage passagiert. Die persistent PaBV-infizierten Zellen der sechsten Passage wurden gewonnen und in Medium mit 2 % fetalem Kälberserum mit Ultraschall aufgeschlossen. Der durch Zentrifugation bei 1000 g für 10 Minuten erhaltene Virusüberstand wurde auf 1 ml aliquotiert und bei – 70 °C eingefroren. Zur Bestimmung des Virustiters des Virusstocks wurde ein Aliquot aufgetaut und eine 10-fache Verdünnungsreihe in Medium mit 10 % fetalem Kälberserum hergestellt. Jede Virusverdünnung wurde mit dem entsprechenden Volumen einer CEC-32-Zellsuspension auf Chamber-Slides⁵ für sechs Tage bei 37 °C inkubiert. Die anschließend mit Aceton fixierten Zellen wurden mit einem polyklonalen anti-BoDV-Serum von der Ratte inkubiert, das mit PaBV kreuzreagiert (Herzog et al., 2010). Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde durch einen anti-Spezies-Antikörper, der mit dem Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelt ist (goat-anti-rat-IgG FITC conjugated⁶; 1:400 verdünnt in Immunoblockpuffer) nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) bei einer Anregung von 492 nm und einer 400-fachen Vergrößerung. Als spezifische Reaktion wurde eine brillante granuläre Fluoreszenz im Nucleus angesehen. Die Virus-Isolate wurden zur Sequenzierung gegeben (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012).

³ Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, BFS Schuberstr. 81, 35392 Gießen

⁴ Invitrogen, Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA49RF, UK

⁵ Nunc A/S, Kamstrupvej 90, Postbox 280, 4000 Roskilde, Dänemark

⁶ Dianova GmbH, Warburgstraße 45, 20354 Hamburg, Deutschland

3.1.2 In vitro Inokulation von PaBV auf embryonalen Nymphensittich Zellkulturen

Um die Möglichkeit einer Virusvermehrung im Nymphensittichembryo zu überprüfen, wurden Zellkulturen von Gehirnzellen von Nymphensittichembryonen (NEB-Zellen) und embryonalen Nymphensittichfibroblasten (NEF-Zellen) angelegt. Die Zellen wurden jeweils mit PaBV-4 und PaBV-2 Isolat in einer Verdünnung von 1:10 und unverdünnt infiziert.

Embryonale Nymphensittichgehirnzellen (NEB-Zellen)

Von zehn Tage alten Nymphensittichembryonen aus dem Bestand der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische wurden mit einer 10 ml Einmalspritze, die 2 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Gibco®)⁷ mit 10 %igem fetalem Kälberserum (FKS) enthielt, durch eine Kanüle (20 G x 1 1/2 ``) Gehirnmateriale entnommen. Die NEB-Zellsuspension wurde mit DMEM mit 10 %igem FKS auf 1 ml / Gehirne eingestellt und auf Chamber-Slides ausgesät. Nach zwei Tagen Inkubation bei 37 °C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Wenn der Monolayer zu ¾ konfluent war, erfolgte die Inokulation der Virusstocks von PaBV-2 und PaBV-4. Es wurde mit dem jeweiligen Isolat (Herstellung siehe 3.1.1.2) eine 10-fache Verdünnungsreihe in Medium mit 10 % fetalem Kälberserum hergestellt. Jede Virusverdünnung wurde mit dem entsprechenden Volumen der Zellsuspension auf Chamber-Slides⁸ für sechs Tage bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der infizierten NEB-Zellkulturen erfolgte mittels IIFT wie unter 3.1.1 beschrieben.

Embryonale Nymphensittichfibroblasten (NEF-Zellen)

Von zehn Tage alten Nymphensittichembryonen aus dem oben genannten Bestand wurden der Kopf, die Extremitäten und die Organe entfernt. Der restliche Embryo wurde mit einer sterilen Schere zerkleinert, in ein Gefäß mit einer Enzymlösung (0,025 % Trypsin-EDTA) gegeben und bei 37 °C im Wasserbad unter leichtem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Gazefilter filtriert, der Durchlauf für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM mit 10 %igem FKS aufgenommen und auf Chamber-Slides ausgesät. Nach

⁷ Invitrogen, Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA49RF, UK

⁸ Nunc A/S, Kamstrupvej 90, Postbox 280, 4000 Roskilde, Dänemark

zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit den Verdünnungsstufen der Titration der Virusstocks von PaBV-2 oder PaBV-4 inkubiert. Die Auswertung der infizierten NEF-Zellkulturen auf den Chamber-Slides erfolgte mittels IIFT wie unter 3.1.1.

3.1.3 Vorversuch zur Desinfektion der Eischalen

Es erfolgte die Bestimmung eines geeigneten Desinfektionsmittels für die Eischalen, um die Außenkontamination der Eier mit PaBV zu vermeiden. Hierfür wurden sechs Eier, die von mit PaBV-2 infizierten Nymphensittichen aus einem Infektionsversuch stammten, untersucht (Piepenbring et al., 2016). In diesem Versuch legte ein Paar der Nymphensittiche sechs Eier. Diese sechs Eier wurden entnommen und untersucht. Die Eischale wurde vor der Desinfektion mit einem Tupfer beprobt und dieser mittels RT-PCR auf PaBV-2-RNA untersucht. Danach wurde die Eischale mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung abgerieben und nach Abtrocknung erneut beprobt. Die Eier wurden nach der Desinfektion weiter inkubiert. Nach dem Absterben der Embryonen wurden diese homogenisiert und als Ganzes auf PaBV-RNA mittels RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Wasserstoffperoxid in 3 %iger Konzentration als geeignetes Desinfektionsmittel für die weiteren Versuche übernommen werden konnte (siehe 4.2).

3.1.4 In vivo Inokulation von PaBV in Nymphensitticheier

Hierfür wurden in einem ersten Versuch embryonierte Eier von Nymphensittichen mit PaBV-4 in den Dottersack inokuliert. In Versuch 2 wurden die embryonierten Nymphensitticheier in vier Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 wurde mit PaBV-4 in den Dottersack und Gruppe 2 mit PaBV-4 auf die Chorioallantoismembran inokuliert. Gruppe 3 wurde mit PaBV-2 in den Dottersack und Gruppe 4 mit PaBV-2 auf die Chorioallantoismembran inokuliert.

3.1.4.1 Herkunft der Eier der Nymphensittiche

Alle Eier für die Infektionsversuche stammten aus dem PaBV-freien Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*)-Bestand der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen. Alle Elterntiere werden im Rahmen der regelmäßigen Bestandsbeprobung auf Erkrankungen untersucht. Hierfür werden re-

regelmäßig Kropf- und Kloakentupfer zur bakteriologischen und mykologischen Untersuchung sowie Kot zur parasitologischen Untersuchung genommen. Darüber hinaus werden regelmäßig Untersuchungen auf Aviäres Polyomavirus, Psittacines Circovirus, *Psittacine 1 bornavirus* und Psittacines Herpesvirus sowie *Clamylidia psittacie* mittels PCR und Serologie durchgeführt und verliefen bislang stets negativ.

Die Elterntiere, deren Eier für den Versuch verwendet wurden, wurden in Gruppen in Außenvoliere mit Schutzraum gehalten, damit eine freie Partnerwahl stattfinden konnte und wurden artspezifisch mit Sämereien und Frischfutter ernährt. Es standen ausreichend Nistkästen (ein Nistkasten pro Paar) aus Naturbaumstämmen zu freier Verfügung. Die Eier wurden direkt nach der Eiablage aus dem Nest entfernt, wie unter 3.1.3 beschrieben desinfiziert und künstlich wie unter 3.1.4.2 beschrieben inkubiert. Durch tägliches Schieren wurde der Befruchtungsstatus überprüft und nur befruchtete Eier wurden weiter in den Infektionsversuchen verwendet.

3.1.4.2 Inkubation der Eier der Nymphensittiche

Alle Eier wurden nach Entnahme aus dem Nest durch Abreiben mit einem mit 3 %igem Wasserstoffperoxid getränktem Gazetupfer wie unter 3.1.3 beschrieben desinfiziert. Da die Inokulationsversuche zeitlich versetzt zu der Untersuchung von den Eiern natürlich infizierter Tiere (siehe 3.1.5) stattfanden, kamen die unterschiedlichen Eier nicht miteinander in Berührung. Nach Desinfektion wurden die Eier in einem Inkubator (HEKA-Format Brutmaschiene, HEKA-Brutgeräte - Christa Hemel, Rietberg) mit automatischer Wendefunktion eingelegt. Die Inkubation erfolgte bis zum 17. Tag bei den Nymphensitticheiern, respektive bis zum Absterben des Embryos. Die Temperatur betrug während der ganzen Bebrütungsdauer 37,4 °C. Die Luftfeuchtigkeit lag bei 60 %. Die Eier wurden täglich kontrolliert und gesichert.

3.1.4.3 Inokulation von PaBV

Die Inokulation erfolgte in einem ersten Infektionsversuch mit PaBV-4. In einem weiteren Versuch wurde der Unterschied zwischen einer Infektion von PaBV-4 und PaBV-2 untersucht. Die Herkunft der Isolate ist unter 3.1.1.1 beschrieben. Die Isolate wurden wie unter 3.1.1.2 beschrieben hergestellt. Es wurden pro Ei 0,02 ml Injektionsvolumen des jeweiligen Virusstocks verwendet. Der Virusstock wurde direkt vor

Applikation mit sterilem PBS-Puffer auf die Inokulationsdosis 2×10^3 TCID₅₀ / 0,02ml je Ei verdünnt und sofort verwendet.

Dottersackinokulation

Für die Inokulation in den Dottersack wurde das Ei senkrecht auf der Spitze stehend fixiert und mit Jodlösung (Braunol®; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) punktuell über der Luftblase desinfiziert. Mit einer Insulinspritze (Kanülen-Spritzenkombination; Omnican® 50, U-100 Insulin/50 I.U.; 30Gx1/2"; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wurde vorsichtig ein Loch senkrecht in die Eischale gebohrt. Anschließend wurde die Nadel vorsichtig in den Dottersack vorgeschoben. Nach Inokulation der Virussuspension wurde das Loch mit Klebstoff (UHU extra Alleskleber, UHU GmbH & Co. KG, Bühl/Baden) verschlossen. Die Inokulation in den Dottersack fand zwischen dem dritten und fünften Tag der Bebrütung statt.

Chorioallantoisinokulation

Die Applikation der Virussuspension auf die Chorioallantoismembran erfolgte zwischen Tag fünf und sieben der Bebrütung. Zwischen Tag fünf und sechs verschmilzt die Allantois mit dem Chorion und bildet die Chorioallantoismembran. Zur Applikation des Virus-Isolates wurde das Ei schräg (45°-Winkel) auf der Spitze stehend fixiert. Mit der Schierlampe wurde die Chorioallantoismembran identifiziert. Mit einer Insulinspritze wurde oberhalb der Luftkammer nach Desinfektion mit Jod ein Loch in die Eischale gebohrt. Die Nadel wurde unter Sichtkontrolle mit der Schierlampe bis an die Chorioallantoismembran vorgeschoben und das Virusmaterial wie oben beschrieben appliziert. Anschließend wurde das Loch mit Klebstoff verschlossen und die Eier weiter inkubiert.

3.1.4.4 *In vivo* Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

In Versuch 1 wurden 32 Nymphensitticheier mit dem PaBV-4 Isolat Ps34 in den Dottersack inokuliert. Zwei weitere Eier wurden als Mock-Kontrollen mit 0,02 ml virusfreiem Zellkulturhomogenat der CEC-32 Wachtelzelllinie inokuliert. Die Inokulation, wie unter 3.1.4.3 beschrieben, erfolgte zwischen dem dritten und fünften Bebrütungstag. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich eine Befruchtung sicher erkennen und die Infektion findet vor der Ausbildung des Immunsystems des Embryos ab dem sechsten, be-

ziehungsweise achten Tag statt (Toivanen and Toivanen, 1987). Die Inkubation der Eier erfolgte wie unter 3.1.4.2. Die Eier wurden nach Inokulation noch 11-14 Tage bebrütet. Die Kontrolle der Eier erfolgte täglich durch Schieren. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Eier bei -20 °C für 30 Minuten schockgefrostet, um die Embryonen abzutöten, und die Proben für RT-PCR, Histologie und Immunhistologie sowie Virusisolierung entnommen. Bei früherem Absterben des Embryos wurde diesem sofort die Proben zur Untersuchung entnommen. Zur Untersuchung wurden das Gehirn und die Organe (Herz, Leber, Drüsen-, Muskelmagen und Niere) der einzelnen Embryonen entnommen und mit einer scharfen sterilen Klinge zerteilt. Alle Organe wurden jeweils auf die vier oben genannten Untersuchungsverfahren aufgeteilt.

3.1.4.5 *In vivo* Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

Da sich in Versuch 1 die Aufteilung der einzelnen Gewebe auf die unterschiedlichen Nachweismethoden durch die kleine Größe der Embryonen als sehr schwierig gestaltete und um die Virusverteilung im Embryo genauer zu untersuchen, wurde Versuch 2 durchgeführt. In diesem wurde jeweils ein ganzer Embryo den einzelnen Nachweismethoden (siehe 3.1.4.4) nach dem Zufallsprinzip zugeordnet. Zudem wurde der Unterschied zwischen Inokulation in den Dottersack und auf die Chorioallantoismembran untersucht. Darüber hinaus wurden zwei verschiedene Virusvarianten eingesetzt. Die unterschiedlichen Eizahlen der einzelnen Gruppen ergaben sich aus der Menge der zum Zeitpunkt der Untersuchung gelegten Eier.

Gruppe 1: PaBV-4 Inokulation in den Dottersack

In dieser Gruppe wurden 27 Eier untersucht. 25 Nymphensitticheier wurden analog zu Versuch 1 mit PaBV-4 in den Dottersack inokuliert. Zwei weitere Eier wurden als Mock-Kontrollen mit Zellkulturhomogenat der CEC-32 Wachtelzelllinie inokuliert. Nach 17 Tagen Inkubation wurden die Eier (11-14 Tage p.i.) schockgefrostet und die Embryonen untersucht. Die Organe von elf Embryonen (zehn infizierte und eine Mock-Kontrolle) wurden mit RT-PCR untersucht. Untersucht wurden Gehirn, Herz, Leber, Drüsen-, Muskelmagen sowie Niere. Von zehn weiteren Embryonen wurden Gehirn, Herz, Leber, Drüsen-, Muskelmagen und Niere histologisch und immunhistochemisch untersucht. Für die Virusisolierung wurden sechs Embryonen

(fünf infizierte und eine Mock-Kontrolle) in Kopf, Körper und Dottersack aufgeteilt und untersucht.

Gruppe 2: PaBV-4 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

In dieser Gruppe wurden 27 Nymphensitticheier verwendet. 25 Eier wurden zwischen dem fünften und siebten Tag auf die Chorioallantoismembran mit PaBV-4 inokuliert. Zwei Eier wurden mit 0,02 ml virusfreiem Zellkulturhomogenat der CEC-32 Wachtelzellelinie inokuliert. Nach 17 Tagen Inkubation (Tag 11-14 p.i.) wurden die Embryonen untersucht. Elf Embryonen (zehn infizierte und eine Mock-Kontrolle) wurden mittels RT-PCR auf PaBV-RNA untersucht. Untersucht wurden Gehirn, Herz, Leber, Drüsen-, Muskelmagen sowie Niere. Zehn Embryonen wurden histologisch und immunhistochemisch bearbeitet. Für die Virusisolierung wurden sechs Embryonen (fünf infizierte und eine Mock-Kontrolle) wie oben beschrieben in Kopf, Körper und Dottersack aufgeteilt und untersucht.

Gruppe 3: PaBV-2 Inokulation in den Dottersack

Es wurden 17 Eier in dieser Gruppe verwendet. 15 Nymphensitticheier wurden mit PaBV-2 Isolat Ps39 entsprechend der Virusmenge wie unter 3.1.4.3 inokuliert und zwei Eier als Mock-Kontrolle mit 0,2 ml Zellkulturhomogenat in den Dottersack inokuliert. Es wurden fünf infizierte Embryonen und eine Mock-Kontrolle mittels RT-PCR auf PaBV-2 RNA untersucht. Für die Immunhistologie und Histologie wurden fünf weitere Embryonen untersucht. Untersucht wurden Gehirn, Herz, Leber, Drüsen-, Muskelmagen sowie Niere. Die restlichen fünf und eine Mock-Kontrolle waren für die Virusisolierung bestimmt. Hierfür wurde der Embryo getrennt in Kopf, Körper und Dottersack untersucht.

Gruppe 4: PaBV-2 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

Es wurden 17 Nymphensitticheier untersucht. 15 Eier wurden mit PaBV-2 auf die Chorioallantoismembran inokuliert. Zwei Eier wurden als Mock-Kontrolle mit Zellkulturhomogenat inokuliert. Es wurden fünf infizierte Embryonen und eine Mock-Kontrolle mittels RT-PCR auf PaBV-2 RNA untersucht. Für die Immunhistologie und Histologie wurden fünf weitere Embryonen untersucht. Wie oben beschrieben wurden jeweils Gehirn, Herz, Leber, Drüsen-, Muskelmagen sowie Niere untersucht. Bei den

restlichen fünf Embryonen und einer Mock-Kontrolle wurde eine Virusisolierung durchgeführt. Auch hier wurde der Embryo getrennt in Kopf, Körper und Dottersack untersucht.

3.1.5 Untersuchung von Eiern natürlich PaBV-Infizierter *Pyrrhura* spp.

Die untersuchten Rotsteißeittchen (*Pyrrhura* spp.) Eier stammten aus einem Bestand mit zwölf *Pyrrhura* spp. bestehend aus drei Blausteißeittchen (*Pyrrhura lepida*) (1,2), drei Salvadori-Weißohrsittchen (*Pyrrhura griseipectus*) (1,2), zwei Goldgrünen Rotschwanzsittchen (*Pyrrhura hoffmanni gaudens*) (1,1) und vier Rotbauchsittchen (*Pyrrhura perlata*) (2,2). Alle Elterntiere wurden mittels RT-PCR (siehe 3.2.4) quantitativ auf PaBV-RNA untersucht (siehe Tabelle 2). Es konnte bei allen Tieren PaBV-RNA nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden alle Tiere serologisch mittels IIFT (siehe 3.2.5) untersucht. Alle Tiere zeigten hohe Antikörpertiter (siehe Tabelle 2). Die *Pyrrhuras* wurden in einer Gruppe in einer kombinierten Innen- und Außenvoliere gehalten und artspezifisch mit Sämereien, Pellets und Frischfutter ernährt. Es standen ausreichend Nistkästen (1,5 Nistkästen pro Paar) aus Baumstämmen zur freien Auswahl zur Verfügung. Die Eier wurden nach dem Ablegen entnommen und nach Desinfektion mit 3 %igem Wasserstoffperoxid bei 37,4 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit wie unter 3.1.4.2 inkubiert. Durch tägliches Schieren wurde der Befruchtungsstatus überprüft. Die *Pyrrhuras* legten im Untersuchungszeitraum elf Eier. Bei allen Eiern konnte nach drei Tagen festgestellt werden, dass sie nicht befruchtet waren. Zur Sicherheit wurden sie noch zwei Tage weiter bebrütet und dann untersucht. Die Eier wurden mittels RT-PCR auf virale RNA im Dotter und Eiklar untersucht.

	Spezies	Geschlecht	Ct- Wert	Antikörpertiter
1	<i>Pyrrhura lepida</i>	weiblich	17,33	1 : 80 000
2	<i>Pyrrhura lepida</i>	weiblich	15,11	1 : 20 000
3	<i>Pyrrhura lepida</i>	männlich	18,28	1 : 5 000
4	<i>Pyrrhura griseipectus</i>	weiblich	16,36	1 : 20 000
5	<i>Pyrrhura griseipectus</i>	männlich	25,25	1 : 20 000
6	<i>Pyrrhura griseipectus</i>	weiblich	17,39	1 : 40 000
7	<i>Pyrrhura hoffmanni gaudens</i>	männlich	18,59	1 : 80 000
8	<i>Pyrrhura hoffmanni gaudens</i>	weiblich	18,56	1 : 10 000
9	<i>Pyrrhura perlata</i>	weiblich	26,67	1 : 40 000
10	<i>Pyrrhura perlata</i>	männlich	21,31	1 : 80 000
11	<i>Pyrrhura perlata</i>	weiblich	17,57	1 : 80 000
12	<i>Pyrrhura perlata</i>	männlich	19,95	1 : 10 000

Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse der Elterntiere der natürlich PaBV-infizierten *Pyrrhura* spp. Nachweis von PaBV-Antikörpern im Serum mittels IIFT

3.2 Nachweismethoden für PaBV

3.2.1 PaBV-RNA Nachweis mittels real-time-Reverse-Transkriptase-TaqMan-PCR (real-time-RT-TaqMan-PCR)

Die real-time-reverse-Transkriptase-TaqMan-PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Bei RNA-Viren wie den aviären Bornaviren muss zuvor eine Extraktion der RNA und eine Umschreibung von RNA in DNA erfolgen. Die PCR vervielfältigt Nukleinsäuren durch eine Polymerisationsreaktion. Bei der TaqMan-PCR wird die hitzestabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* verwendet. Die Quantifizierung erfolgt bei der real-time-PCR durch Fluoreszierung in einem PCR-Zyklus in Echtzeit. Die Fluoreszenz tritt auf, sobald die präparierte Sonde mit einem passenden DNA Stück in der Probe hybridisiert. Je mehr Virusmaterial vorhanden ist, umso schneller kommt es zur Fluoreszenz. Der Ct-Wert (Ct=cycle threshold) beschreibt den Moment, in dem die Fluoreszenz zum ersten Mal über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Die Messungen finden immer am Ende eines PCR-Zyklus' statt. Je weniger Virusmaterial in der Probe vorhanden ist, umso mehr Zyklen werden für die Überschreitung der Hintergrundfluoreszenz benötigt. Somit ist der Ct-Wert umso höher, je weniger virales Genommaterial in der untersuchten Probe enthalten ist (Schmittgen et al., 2000).

3.2.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurde das RNeasy Mini Kit⁹ eingesetzt. Zur Vorbereitung wurden die zu untersuchenden Gewebeprobe aus 3.1.3, 3.1.4.4 und 3.1.4.5, sowie Dotter und Eiklar aus 3.1.5 mit einer 5 mm Stahlkugel (Stainless Steel Beads)⁹ in ein 2 ml Tube gegeben. Dazu wurden 1 ml RLT-Puffer pipetiert. Die Gewebeprobe wurden bei 50 Oszillationen/Sekunde für 3 Minuten im Tissue Lyser⁹ homogenisiert. Danach wurden die Proben bei 3000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert (Modell Universal 32R, Hettich, Mülheim a.d. Ruhr). Für die Untersuchung der Tupferproben aus 3.1.3 und 3.1.5 wurde der Wattetupfer in einem 1,5 ml Tube mit 1 ml RLT-Puffer⁹ gegeben. Mit einer Pipettenspitze wurde der Tupfer angerieben, um das Probenmaterial in der Flüssigkeit zu lösen. Mittels Qia-Cube⁹ wurde nach Protokoll des Herstel-

⁹ QUIAGEN GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden, Deutschland

lers „RNeasy mini, animal tissues and cells, large samples“ in jeweils 0,6 ml der zuvor gewonnenen Probenflüssigkeit aus Gewebehomogenat oder angeriebenem Tupper die RNA extrahiert. Hierfür wurde die in der Probe enthaltene RNA unter Zentrifugation und Zugabe von Ethanol 70 % sowie zweier Pufferlösungen (RW1, RPE) spezifisch an eine Membran gebunden. Durch eine letzte Zentrifugation mit RNase freiem Wasser wurde die RNA wieder von der Membran eluiert. Die so extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung durch Transkription bei -80 °C gelagert. Die Kieselsäuremembran des RNeasy Mini Kits hat eine Bindungskapazität von 100 µg RNA. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das Protokoll auf einen Optimumswert eingestellt, der dem Maximum an RNA entspricht die mit diesem Testkit zu erreichen sind.

3.2.3 Reverse Transkription

Für die Transkription der RNA wurde der Thermal Cycler (MJ Research PTC-200 DNA Engine Cycler, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) genutzt. Nach 10 Minuten bei 25 °C erfolgt die Umschreibung in cDNA¹⁰ bei 42 °C für 60 Minuten. Zur Transkription der RNA wurden 10 µl der zuvor extrahierten RNA mit jeweils 10 µl eines Mastermixes in einem 0,2 ml Tube angemischt. Für die Herstellung des Mastermixes für eine Probe wurden folgenden Reagenzien¹¹ genutzt:

RNase freies H ₂ O	2 µl
dNTP-Mix (2mM)	2 µl
Random Hexamer Primer (100µM)	1 µl
Puffer (5x)	4 µl
Revert Aid H Minus Reverse Transkriptase (200U/µl)	0,5 µl
Ribo Lock RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5 µl

Tabelle 3: Mastermix Proben für Reverse Transkription

Nach Abschluss der Trankription wurde die cDNA bei 4 °C gekühlt und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung mittels RT-PCR gelagert.

¹⁰ komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)

¹¹ Thermo Fisher Scientific Inc., 81 Wyman Street, Waltham MA 02454

3.2.4 Real-time –TaqMan-PCR

Für die Untersuchung der Proben mittels Real-time TaqMan-PCR wurde der Rotor-Gene Q¹² genutzt. Die PCR läuft dort nach einem Vorbereitungsschritt über zwei Minuten bei 50 °C. Zunächst erfolgt eine Denaturierung über 10 Minuten bei 95 °C. Danach erfolgt die zweite Denaturierung über 15 Sekunden bei 95 °C und anschließend kommt es zum Annealing der Primer und Synthese des DNA-Doppelstranges über eine Minute bei 60 °C. Dieser Zyklus wird 45 Mal wiederholt. Die Auswertung erfolgte mittels „Rotor-Gene Q Series Software“ der Firma Qiagen. Für die Untersuchung wurden 5 µl cDNA mit 20 µl eines Mastermix in ein Striptube gegeben. Der Mastermix bestand aus folgenden Reagenzien¹³ (Mengenangabe pro Probe):

RNAse freies H ₂ O	11,25 µl
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)	6,25 µl
Primer Set	1,25 µl
Sonde	1,25 µl

Tabelle 4: Mastermix zweite Denaturierung für die Real-time-TaqMan-PCR

Zum Nachweis der PaBV-4-RNA wurde das von Honkavuori et al. (2008) beschriebene Protokoll mit dem Primerpaar „1034-1322“ und die dazugehörige Sonde verwendet (Vorwärtsprimer: 5'-CAGACAGCACGTCGAGTGAGA-3', Rückwärtsprimer: 5'-AGTTAGGGCCTCCCTGGGTAT-3', Sonde: 6FAM-5'-AGGTCCCCGCGAAGGAAGCGA-3'-TMR). Ebenso wurden der als Positivkontrolle beschriebene Standard 1034 in einer Verdünnung von 10⁻¹ bis 10⁻⁷ verwendet. Die Standards wurden in Anlehnung an eine Verdünnungsreihe des Plasmids ermittelt. Der Standard 10⁻¹ wurde mit 500 000 Kopien ermittelt, Standard 10⁻² mit 50 000 Kopien, Standard 10⁻³ mit 5 000 Kopien, Standard 10⁻⁴ mit 500 Kopien, Standard 10⁻⁵ mit 50, Standard 10⁻⁶ mit 5 und 10⁻⁷ mit weniger als 5 Kopien. Ct-Werte von über 36 werden in der Literatur als positiv gewertet, basierend auf der Verdünnung des Standards mit 5 Kopien (Honkavuori et al., 2008). In den vorliegenden Versuchen wurden auch Werte über 36 als positiv gewertet, wenn sie den für positive Proben typischen Kurvenverlauf aufzeigten. Diese höheren ct-Werte lassen sich durch nicht optimal

¹² QUIAGEN GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden, Deutschland

¹³ Thermo Fisher Scientific Inc., 81 Wyman Street, Waltham MA 02454

ablaufende PCR Zyklen zu Beginn der PCR erklären, wenn beispielsweise das Enzym oder der Primer nicht optimal reagieren. Um die PaBV-2-RNA nachzuweisen, wurde der bereits entwickelte Primer und Sonde (Vorwärtsprimer: 5'-CAGACAGCACGTCGAATGAGG-3'; Sonde: 6-FAM-5'-AGGTCTCCAAGAAGGAAGCGA-3'-TMR; Rückwärtsprimer: 5'-AGTTAGGGCCTCCCTGGGTAT-3') verwendet (Piepenbring et al., 2016). Als Positivkontrolle wurde Gehirnmaterial eines PaBV-2 positiven Nymphensittichs aus dem Versuch von Piepenbring et al. (2016) in einer Verdünnung von 10^0 bis 10^{-6} verwendet.

3.2.5 Antikörpernachweis mittels des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT)

Die Serumproben der Elterntiere der *Pyrrhura spp.* wurden auf Antikörper gegen PaBV-4 untersucht. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sibylle Herzog am Institut für Virologie¹⁴. Die Untersuchung der Seren erfolgte mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT). Der quantitative Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen PaBV in den zwölf *Pyrrhura*-Seren erfolgte auf Multitest-Objektträgern mit PaBV-CEC-32-Zellen, die mit Aceton fixiert waren. Die Titerbestimmung erfolgte ausgehend von einer 1:10 Verdünnung in Zweierpotenzen. Die einzelnen Serumverdünnungen wurden auf den Objektträgern bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde durch einen anti-Spezies-Antikörper, der mit dem Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelt ist (goat-anti-bird-IgG, FITC conjugated¹⁵; verdünnt 1:400) nachgewiesen. Alle Serumverdünnungen wurden in Immunblockpuffer (Roti®-ImmunoBlock)¹⁶ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.1.1..

¹⁴ Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, BFS Schuberstr. 81, 35392 Gießen

¹⁵ Biomol GmbH, Waldmannstraße 35, 22769 Hamburg, Deutschland

¹⁶ Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland

3.2.6 Histopathologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung erfolgte eigenständig am Institut für Veterinär-Pathologie¹⁷ und wurde durch Frau Prof. Dr. Christiane Herden¹⁷ und Tierärztin Sara Malberg¹⁷ unterstützt.

Die in 5 %igem gepuffertem Formalin fixierten Organe aus 3.1.4.4 und 3.1.4.5 wurden in Paraffinwachs eingebettet. Daraus wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Durch die Färbung konnten die Gewebsstrukturen in den Organschnitten mit Hämatoxylin (Färbung im Kern) und Kontrastierung durch Eosin (Färbung im Plasma) sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit Xylol-Ersatz und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und dehydriert. Nach 5 Minuten in PBS wurde für 10 Minuten Methanol aufgetragen. Nach weiteren 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte für 8 Sekunden in Hämalaun gelegt. Nach Abspülen mit Leitungswasser und Aqua dest. wurden die Schnitte für je 30 Sekunden mit Ethanol 60 %, 70 % und 96 % behandelt. Danach folgte eine Färbung für 3 Sekunden mit Eosin 1 %. Anschließend wurden die Schnitte nochmal mit Ethanol 96 % (10 Sekunden) und Ethanol 100 % (30 Sekunden) behandelt. Die Färbung am Institut für Veterinär-Pathologie erfolgte automatisiert. Die Schnitte wurden anschließend unter dem Mikroskop bei 100er, 200er und 400er Vergrößerung betrachtet.

3.2.7 PaBV-Antigennachweis mittels Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde am Institut für Veterinär-Pathologie¹⁸ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte eigenständig mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. Christiane Herden¹⁸ und Tierärztin Sara Malberg¹⁸.

Für die Immunhistochemie wurde die in der Literatur beschriebene Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Methode angewendet (Herden et al., 1999). Die in 5 %igem gepufferten Formalin fixierten Organproben aus 3.1.4.4 und 3.1.4.5 wurden in Paraffinwachs eingebettet. Daraus wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Su-

¹⁷ Institut für Veterinär-Pathologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 96, 35392 Gießen

¹⁸ Institut für Veterinär-Pathologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 96, 35392 Gießen

perfrostoplus-Objektträger¹⁹ aufgezogen und mit Xylol-Ersatz und einer absteigenden Alkoholreihe (3x5 Minuten), Isopropanol (2x3 Minuten), 96 % Ethanol (3 Minuten) und 80 % Ethanol (3 Minuten) dehydriert und wieder entparaffiniert. Die Hemmung der endogenen Peroxidasen wurde durch Zugabe von 197 ml Methanol und 3 ml 30 %igem Wasserstoffperoxid erreicht und 30 Minuten inkubiert. Die Antigene wurden mit Zitratpuffer (pH=6,0) bei 95 °C für 25 Minuten demaskiert. Danach wurden sie 15 Minuten bei Raumtemperatur im Zitratpuffer abgekühlt und anschließend 5 Minuten in TBS gewaschen, anschließend wurden die Objektträger in Shandon-Racks (Shandon Coverplate)²⁰ eingestellt. Die Schnitte wurden mit 100 µl 20 %igem Schweineserum²¹ in TBS für 15 Minuten geblockt und mit dem Primäantikörper (polyklonaler Kaninchen-anti-BDV-p24-Antikörper, Biot. Goat anti rabbit IgG (H&L)²²) 1:2000 verdünnt in 20 % Schweineserum / TBS inkubiert. Dieser musste über zwölf Stunden bei 4 °C einwirken und wurde dann ausgewaschen (TBS 3x5 Minuten). Nach Auftragen des Sekundäantikörpers (biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Gießen) 100 µl Verdünnt 1:100 in 1 % Rinderserumalbumin (BSA)/TBS erfolgte eine weitere Inkubation über 30 Minuten und ein weiterer Waschschrift (TBS 3x5 Minuten). Schließlich erfolgte die Behandlung der Objektträger mit dem VECTASTAIN ABC Kit²³. Um die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit Chromogen-Diaminobenzidin (DAB)²⁴ 10 Minuten gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift (TBS 3x5 Minuten und 1x5 Minuten Aqua dest.) wurden die Objektträger mit Kardasewitch für 5 Minuten gefärbt und nach Auswaschen mit Aqua dest. mit Papanicolau / Hämatoxylin S 1:10 in Aqua dest. für ca. 30 Sekunden gegengefärbt und nach 5 Minuten bläuen in Leitungswasser und Abspülen mit Aqua dest. in aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 3 Minuten 50 % Ethanol, 70 % Ethanol, 80 % Ethanol, 96 % Ethanol, 2x 100 % Isopropanol) dehydriert. Nach dem Umsetzen der Objektträger in Xylol-Ersatz wurden die Schnitte mit Tissue-Tek® coverslipping films²⁵ in einer automatischen Eindeckmaschine²⁶ eingedeckt. Die Schnitte wurden bei 200-facher Vergrößerung

¹⁹ Firma Langenbrinck GmbH; Labor- und Medizintechnik, Im Hausgrün 13,79312 Emmendingen

²⁰ Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich, Deutschland

²¹ PAA Laboratories, 145 Bethridge Road Etobicoke, ON M9W 1N4, Kanada

²² Vector Lab., 3390 S Service Rd, L7N 3J5 Burlington, Kanada

²³ Vector Lab., 3390 S Service Rd, L7N 3J5 Burlington, Kanada

²⁴ Fluka Chemikalien, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen, Deutschland

²⁵ Sakura Finetek Germany GmbH, Innere Neumatten 20, 79219 Staufen, Deutschland

²⁶ VOGEL med. Technik & Elektronik, GmbH & Co. KG, Gottlieb-Daimler-Strasse 2, 35463 Fernwald, Deutschland

unter dem Mikroskop ausgewertet. Zur Kontrolle wurden alle Schnitte doppelt gefärbt, einmal mit dem Primärantikörper und einmal mit nicht-immunogenem Kaninchenserum als Negativkontrolle.

Alle Organe und das Gehirn unterteilt in Kleinhirn und Großhirn wurden auf PaBV-Antigen untersucht. Um das Verteilungsmuster von PaBV-Antigen im Gehirn besser darstellen zu können, erfolgte eine Untersuchung von drei Lokalisationen je Gehirn. Untersucht wurden das Kleinhirn zentral im *Arbor vitae*, das Großhirn zentral und ein Teil vom Gehirn mit Ventrikelanschnitt. Dabei wurden in der 200er Vergrößerung im Lichtmikroskop auf Grund der kleinen Größe der Organschnitte in jeweils einem Gesichtsfeld die PaBV-Antigen positiven Zellen ausgezählt. Auf die Bildung eines Scores wurde auf Grund der Zählung nur eines Gesichtsfeldes je Gehirnabschnitt verzichtet, da die statistischen Fehler der Zählung mit den Direktzahlen geringer gehalten werden konnten.

3.2.8 Färbung zur Zellidentifikation

Zur Spezifizierung der Zellen, die sich in der Immunhistochemie PaBV-Antigen-positiv anfärbten, wurde eine Färbung mit Zellmarkern und DAB in Kombination durchgeführt. Die Spezialfärbungen wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Christiane Herden und Tierärztin Sara Malberg am Institut für Veterinär-Pathologie²⁷ durchgeführt. Hierfür wurden erneut Schnitte von Embryo CA-01, CA-02, DO-01, DO-02 sowie PaBV-2-01C und PaBV-2-02D angefertigt und nach unten beschriebenen Protokollen gefärbt.

Anti Neuronal Nuclei (NeuN) ABC (Neuronen-Marker)

Die oben genannten Schnitte wurden zuerst entparafiniert und rehydriert. Hierzu wurden sie jeweils für 3 Minuten in Xylol-Ersatz 1, 2 und 3 gelegt. Daraufhin wurden sie für jeweils 3 Minuten in Isopropanol 1 und 2 gegeben. Zuletzt wurden die Schnitte für 3 Minuten in 96 %iges Ethanol und anschließend für 3 Minuten in 80 %iges Ethanol gegeben. Die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten in Methanol (reinst.) / 0,5 % H₂O₂ (30 %ig). Anschließend

²⁷ Institut für Veterinär-Pathologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 96, 35392 Gießen

wurden die Schnitte mit TBS ausgewaschen. Die Vorbehandlung erfolgte in vorgewärmtem (97°C) Zitratpuffer 10 mM (pH:6,0) für 25 Minuten. Nach Abkühlung wurden die Schnitte in TBS umgesetzt. Als Blocking-Serum wurde für 10 Minuten unverdünntes Pferdeserum²⁸ aufgetragen. Anschließend wurde der Primäantikörper (Mouse anti Neuronal Nuclei , clone A 60²⁹) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Antikörper wurde in TBS/ 1 % / BSA angesetzt. Nach Inkubation wurden die Schnitte gewaschen (3 x 5 Minuten in TBS Puffer). Anschließend erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers (Biot. Horse anti MouselgG (H+L)³⁰) für 30 Minuten. Hierfür wurden 9 µl Sekundäantikörper für 1 ml TBS/ 1 % BSA angesetzt. Anschließend wurden die Objektträger 3 Mal für 5 Minuten in TBS gewaschen. Der ABC Komplex³¹ wurde mit 9 µl A + B für 1 ml TBS / 1 % BSA angesetzt und für 30 Minuten auf die Schnitte aufgetragen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt in TBS (3 x 5 Minuten). Für die Färbung wurde 0,05 % DAB in 0,1 ml Imidazol / HCL Puffer – pH: 7,08 und 0,01 % H₂O₂ (30 %ig) angesetzt. Die Schnitte wurden darin für 10 Minuten unter Rühren inkubiert. Er erfolgte ein weiterer Waschschritt in TBS (3 x 5 Minuten) und anschließendem Abspülen in Aqua dest.. Daraufhin wurde für 5 Minuten mit Kardasewitch behandelt und mit Aqua dest. gründlich abgespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Papanicolaous / Hämatoxin S 1 : 10 verdünnt in Aqua dest.. Nach der Gegenfärbung wurden die Schnitte für 5 Minuten unter Leitungswasser gebläut und dann mit Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe je 3 Minuten dehydriert. Anschließend wurden die Objektträger in Xylol-Ersatz für 10 Minuten gegeben und dann wie unter 3.2.7 eingedeckt. Als Positivkontrolle wurden Schnitte aus dem Gehirn adulter Nymphensittiche eingesetzt, bei denen der Marker bereits erfolgreich eingesetzt werden konnte, verwendet (Malberg, persönliche Mitteilung).

Rabbit anti GFAP PAP (Gliazellmarker)

Für die Untersuchung mit dem Gliazellmarker wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben. Als Blocking-Serum wurde Schweineserum

²⁸ PAA Laboratories, 145 Bethridge Road Etobicoke, ON M9W 1N4, Kanada

²⁹ Chemicon international, Fischbacher Weg 3A , 65719 Hofheim am Taunus, Deutschland

³⁰ Vector Lab., 3390 S Service Rd, L7N 3J5 Burlington, Kanada

³¹ Vector Lab., 3390 S Service Rd, L7N 3J5 Burlington, Kanada

rum³² 1 : 5 verdünnt in TBS verwendet. Als Primärantikörper wurde Rabbit-anti-Cow GFAP³³ nach oben beschriebenem Protokoll in TBS / 20 % Schweineserum verwendet. Als Sekundärantikörper wurde Schwein-anti-Kaninchen IgG³⁴ (1 : 100 verdünnt in TBS 20 % Schweineserum) wie oben beschrieben eingesetzt. Nach einem Waschschrift (3 x 5 Minuten in TBS) erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation von PAP vom Kaninchen³⁵. Anschließend wurden die Schnitte wie oben beschrieben gefärbt und gegengefärbt. Auch hier wurden Schnitte aus dem Gehirn adulter Nymphensittiche als Kontrollen eingesetzt.

Kaninchen anti S-100 PAP (Gliazellmarker)

Die Schnitte wurden wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Die endogene Peroxidase wurde wie oben beschrieben gehemmt. Als Blocking-Serum wurde Schweineserum³⁶ 1 : 5 verdünnt in TBS verwendet. Als Primärantikörper wurde Rabbit-Immunglobulin-to-Cow S-100³⁷ nach oben beschriebenem Protokoll in TBS / 20 % Schweineserum verwendet. Als Sekundärantikörper wurde Schwein-anti-Kaninchen IgG³⁸ (1 : 100 verdünnt in TBS 20 % Schweineserum) wie oben beschrieben eingesetzt. Nach einem Waschschrift (3 x 5 Minuten in TBS) erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation von PAP vom Kaninchen³⁹. Anschließend wurden die Schnitte wie oben beschrieben gefärbt und gegengefärbt. Zusätzlich wurden Kontrollen von Gehirnschnitten adulter Nymphensittiche gefärbt.

³² PAA Laboratories, 145 Bethridge Road Etobicoke, ON M9W 1N4, Kanada

³³ Dako, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Obere Hauptstrasse 10b, 85386 Eching, Deutschland

³⁴ Dako, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Obere Hauptstrasse 10b, 85386 Eching, Deutschland

³⁵ DIANOVA GmbH, Warburgstraße 45, 20354 Hamburg, Deutschland

³⁶ PAA Laboratories, 145 Bethridge Road Etobicoke, ON M9W 1N4, Kanada

³⁷ Dako, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Obere Hauptstrasse 10b, 85386 Eching, Deutschland

³⁸ Dako, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Obere Hauptstrasse 10b, 85386 Eching, Deutschland

³⁹ DIANOVA GmbH, Warburgstraße 45, 20354 Hamburg, Deutschland

3.2.9 Virus-Isolierung

Die Virus-Isolierung von infektiösem PaBV-2 und -4 wurde in Zusammenarbeit durch Frau Dr. Sibylle Herzog am Institut für Virologie⁴⁰ durchgeführt.

3.2.9.1 Virus-Isolierung in CEC-32-Zellen

Für die Virusisolierung wurden nach 17 Tagen Inkubation (11-14 Tage p.i.) der embryonierten Nymphensitticheier, die mit PaBV-2 oder PaBV-4 inokuliert waren und die für diese Untersuchung bestimmten Mock-Kontrollen, drei verschiedene Proben von jedem Embryo untersucht: Dotter, Gehirn und Pool von Organen (Darm, Magen, Leber). Es wurden 10 %ige Organsuspensionen in DMEM⁴¹ mit 2 % fetalem Kälberserum hergestellt, mit Ultraschall aufgeschlossen und bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert. 100 µl jedes Überstandes wurden direkt auf einen semi-konfluenten Zellrasen von CEC-32-Zellen in 24-Well-Platten gegeben. Nach der Virusabsorption von einer Stunde bei 37 °C wurden die Zellkulturen mit DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum aufgefüllt und inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die infizierten Zellkulturen passagiert. Gleichzeitig wurden Multitest-Objekträger angelegt, um die Zellkulturen nach jeder Passage mittels des indirekten IIFT auf eine Virusreplikation zu untersuchen. Die inokulierten Zellkulturen wurden dreimal passagiert und jedes Mal mittels IIFT untersucht.

3.2.9.2 Virus-Isolierung in embryonalen Nymphensittichzellen

Für die Isolierung von PaBV-2 und PaBV-4 auf Nymphensittichzellen wurde nur das Gehirn der Embryonen aus Versuch 2 untersucht. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.2.9.1. Die Untersuchung wurde auf zwei verschiedenen Zelltypen durchgeführt, auf embryonalen Nymphensittichgehirnzellen (NEB) und auf embryonalen Nymphensittichfibroblasten (NEF). Die Infektion der NEB- und NEF-Zellen erfolgte auf Chamber-Slides wie unter 3.1.2. 50 µl jeder Organsuspension wurde auf die Zellkulturen gegeben, die zu ¾ konfluent waren. Nach Virusadsorption von einer Stunde wurden die Chamber-Slides mit DMEM + 10 % FKS aufgefüllt und nach Inkubation von fünf Tagen ausgewertet. Die Zellen wurden nicht passagiert. Die Auswertung erfolgte mittels IIFT.

⁴⁰ Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, BFS Schuberstr. 81, 35392 Gießen

⁴¹ Invitrogen, Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA49RF, UK

3.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Statistische Berechnungen zu Ergebnissen wurden mit Hilfe des Programms BiAS Version 9.14 auf der Grundlage von „Angewandte Statistik, Kapitel 45“ durchgeführt (Sachs, 2013). Die statistische Berechnung wurde in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Klaus Failing und Herrn Andreas Schaubmar und Frau Marion Sparenberg aus der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung⁴² am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, durchgeführt. Weitere Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms „Microsoft Office Excel 2007“ durchgeführt.

Es wurde die relative Häufigkeit der positiven Ergebnisse in den Versuchsgruppen bestimmt. Darüber hinaus wurden die Konfidenzintervalle für alle Versuchsgruppen berechnet. Das Konfidenzintervall ist der Bereich, der bei unendlicher Wiederholung eines Zufallsexperiments mit einer gewissen Häufigkeit (dem Konfidenzniveau 95 %) die wahre Lage des Parameters einschließt. Der „Vergleich der Häufigkeiten“ wurde für Versuch 2 mittels zweifaktorieller exakter logistischer Regression mit dem Programm „StatXact“ bestimmt. Hierfür wurde der Unterschied zwischen Infektionsroute und Virusvariante jeweils für die Untersuchung mittels RT-PCR und Immunhistochemie berechnet.

In Versuch 2 wurde darüber hinaus der Mann-Whitney-U-Test an den Ergebnissen der Immunhistochemie angewandt um die Unterschiede zwischen den Gruppen und der Lokalisation des PaBV-Antigens im Gehirn zu untersuchen. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein nicht-parametrisches Verfahren, er stellt geringere Anforderungen an die Verteilung der Messwerte in der Grundgesamtheit als der T-Test. So müssen die Daten nicht normalverteilt sein. Die Variablen müssen nur ordinalskaliert sein. Somit kann auch bei kleineren Stichproben, wie in dieser Arbeit, die Statistik berechnet werden.

⁴² AG Biomathematik und Datenverarbeitung, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 95, 35392 Gießen

4 ERGEBNISSE

4.1 *In vitro* Inokulation von PaBV auf embryonalen Nymphensittichzellkulturen

Anzucht des PaBV-4-Isolates Ps34 auf embryonalen Nymphensittichgehirnzellen (NEB-Zellen)

Um die Möglichkeit einer Virusvermehrung im Nymphensittichembryo zu überprüfen, wurden Zellkulturen von Gehirnzellen aus Nymphensittichembryonen (NEB-Zellen) angelegt. Die Zellen waren mit PaBV-4-Isolat Ps34 infizierbar. Der Titer des Virusstocks, der auf den NEB-Zellen ermittelt wurde, entsprach dem Titer auf den CEC-32 Zellen: 5×10^6 TCID₅₀/ ml.

Anzucht des PaBV-4-Isolates Ps34 auf embryonalen Nymphensittichfibroblasten (NEF-Zellen)

Das PaBV-4-Isolat Ps34 ließ sich auf den Nymphensittichfibroblasten (NEF-Zellen) nicht anzüchten.

Anzucht des PaBV-2-Isolates Ps39 auf embryonalen Nymphensittichgehirnzellen (NEB-Zellen)

Das PaBV-2-Isolat Ps39 ließ sich ebenfalls auf NEB-Zellen anzüchten. Ebenso entsprach der Titer des Virusstocks der auf den NEB-Zellen bestimmt wurde dem Titer auf den CEC-32 Zellen: 5×10^5 TCID₅₀/ ml. Die Wachstumseigenschaft von PaBV-2 erfolgte ohne Unterschied zu der von PaBV-4.

Anzucht des PaBV-2-Isolates Ps39 auf embryonalen Nymphensittichfibroblasten (NEF-Zellen)

Das PaBV-2-Isolat Ps39 ließ sich auf den NEF-Zellen nicht anzüchten.

Besonderheiten in der Zellkultur der NEB- und NEF- Zellen

Bei der Adspektion der Zellen unter dem Mikroskop fiel auf, dass sich besondere Zellen darstellten. Diese Zellen ähnelten keinen anderen bekannten Zellen aus Säugertier- oder anderen Vogelzelllinien. Sie schienen speziell bei Zellkulturen aus embryonalen Nymphensittichgehirnzellen und vereinzelt auch bei Zellkulturen aus embryonalen Nymphensittichfibroblasten vorzukommen. Die Zellen wiesen einen bis mehrere Zellkerne auf. Die Zellkerne waren umgeben von einem optisch dichten Zytoplasma, das durch einen optisch leeren Plasmasaum umhüllt war. Dieser war entweder glatt oder wies Ausbuchtungen auf. Diese Zellen ließen sich auch mit PaBV infizieren.

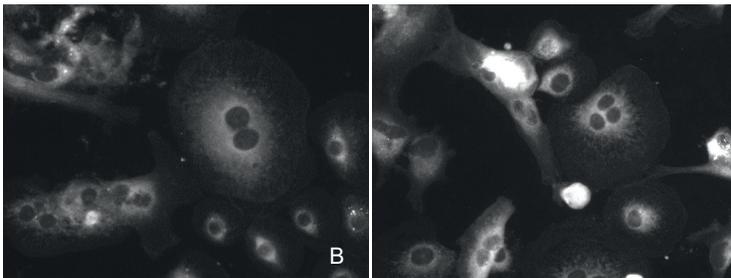


Abbildung 3: Embryonale Nymphensittichgehirnzellen (NEB)

A: Große Zelle mit zwei Zellkernen und durchsichtigem Zytoplasmasaum, daneben kleinere Zellen mit mehreren Zellkernen.

B: Zellen mit mehreren Zellkernen und verzweigtem Zytoplasma.

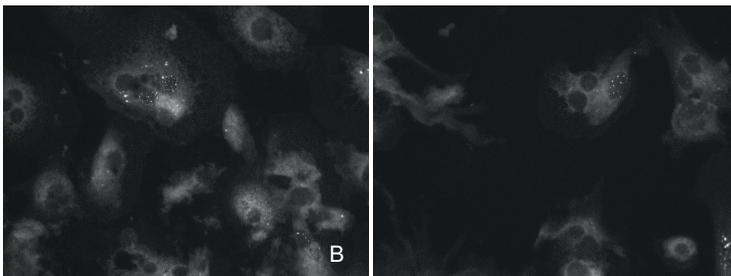


Abbildung 4: Mit PaBV-4 Isolat infizierte NEB Zellen

A: PaBV-Nachweis im Zellkern und Zytoplasma

B: PaBV-Nachweis hauptsächlich im Zellkern

4.2 Vorversuch zur Desinfektion der Eischalen

Zur Bestimmung eines geeigneten Desinfektionsmittels für die Eier wurden sechs Eier von PaBV-2 positiven Elterntieren mit 3 %igem Wasserstoffperoxid desinfiziert. Auf allen Eischalen konnte vor der Desinfektion PaBV-2 RNA nachgewiesen werden, nach Desinfektion jedoch nicht mehr. Somit zeigte sich die Desinfektion mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung als wirksam. Die Eier wurden nach Desinfektion weiter inkubiert. Alle Embryonen starben nach 5-7 Tagen Inkubation ab. Die Embryonen wurden homogenisiert und ebenfalls auf PaBV-RNA untersucht. Bei keinem der Embryonen wurde PaBV-2 RNA nachgewiesen.

Nr.	Eischale vor Desinfektion mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung	Eischale nach Desinfektion mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung	Embryo (ganzes Tier) nach Absterben
1	Ct 27.40	-	-
2	Ct 30.44	-	-
3	Ct 33.91	-	-
4	Ct 32.83	-	-
5	Ct 30.63	-	-
6	Ct 34.68	-	-

Tabelle 5: Ct-Werte der PaBV-RNA vor und nach Desinfektion mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung

Zusätzlich wurden die Embryonen nach Absterben *in toto* untersucht

Legende: Positiv = Ct-Wert; Negativ = -

4.3 *In vivo* Inokulation von PaBV in Nymphensitticheiern

4.3.1 *In vivo* Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

4.3.1.1 Klinische Beobachtungen von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

In Versuchsgruppe 1 zeigten die Eier einen normalen Entwicklungsverlauf vor und nach der Inokulation in den Dottersack.

4.3.1.2 PaBV- RNA Nachweis von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

In Versuch 1 konnte bei neun der 32 Embryonen (28,1 %) aus inokulierten Eiern PaBV-4-RNA aus dem Gehirn nachgewiesen werden. Bei beiden Mock-Kontrollen gelang dies nicht. Die Ct-Werte lagen zwischen 26,48 und 37,36. Die anderen Organe (Herz, Leber, Drüsen-, Muskelmagen und Niere) wurden als Pool untersucht und waren alle negativ. Für den Versuch ergab sich ein Konfidenzintervall von CI: [13,7 %; 46,7 %].

Nr.	Gehirn Ct-Wert	Organe Ct-Wert
EI 01	Ct 23,34	-
EI 02	-	-
EI 03	-	-
EI 04 Kontrolle	-	-
EI 05	Ct 31,03	-
EI 06	-	-
EI 07	-	-
EI 08	-	-
EI 09	-	-
EI 10	-	-
EI 11	Ct 30,59	-
EI 12 Kontrolle	-	-
EI 13	-	-
EI 14	Ct 24,75	-
EI 15	-	-
EI 16	- (Ct 43,38)	-
EI 17	-	-
EI 18	-	-
EI 19	-	-
EI 20	-	-
EI 21	-	-
EI 22	-	-
EI 23	Ct 31,03	-
EI 24	-	-
EI 25	-	-
EI 26	-	-
EI 27	-	-
EI 28	-	-
EI 29	Ct 37,36	-
EI 30	-	-
EI 31	Ct 30,84	-
EI 32	-	-
EI 33	Ct 34,88	-
EI 34	Ct 26,48	-

Tabelle 6: Nachweis von PaBV-4-RNA in Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Legende: Positiv = Ct-Wert; Negativ = -

4.3.1.3 Histopathologische Untersuchungen von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

Histopathologisch konnten bei allen Embryonen aus inokulierten Eiern keine Hinweise auf lymphoplazmazelluläre Infiltrate gefunden werden. Da die Embryonen in dieser Gruppe auf vier Untersuchungsmethoden aufgeteilt wurden, waren die Schnitte oft nur schwer auswertbar. Die einzelnen Organe sind bei Embryonen nach 17 Tagen

Inkubation noch sehr klein. Nach der Aufteilung für RT-PCR, Virusisolierung, Histologie und Immunhistochemie blieben nur sehr kleine Teilstücke übrig. Die Organe waren zum Teil nur in kleinen Stücken angeschnitten oder fehlten zum Teil ganz. Im Herz zeigten sich bei allen Küken immature Muskelfasern mit reichlich embryonalem Bindegewebe, das Leitungssystem (Purkinjefasern) war nicht sicher differenzierbar. In der Niere zeigte sich in einigen Schnitten (3 von 34) eine physiologische extramedulläre Hämatopoese. Die Leber zeigte bei vier Embryonen eine milde bis moderate Hepatolipidose, die als Folge der beginnenden Dottersackresorption gedeutet werden kann. Zusätzlich zeigten alle Leberschnitte, die Blutgefäßanschnitte und Blutzellen enthielten, eine physiologische moderate bis deutliche extramedulläre Hämatopoese. Dies ist für Embryonen in diesem Entwicklungsstadium physiologisch. Die Drüsen- und Muskelmägen enthielten zum Teil abgeschlucktes Material. Die Gehirnstrukturen waren in diesen Schnitten sehr schlecht zu beurteilen, da sie oft nur als Teilstücke vorlagen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zelldichte im juvenilen Gehirn deutlich dichter ist und die einzelnen Gehirnareale schlechter zu unterscheiden sind. Die Auswertung der HE-Schnitte ergab keinen Unterschied zwischen den Mock-Kontrollen und den infizierten Embryonen.

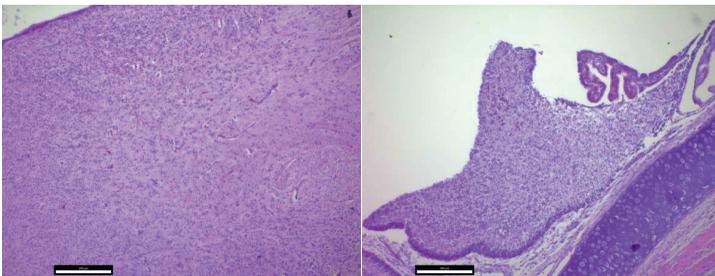


Abbildung 5: Großhirn (links) und Kleinhirn (rechts) Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Keine pathologischen Veränderungen mit physiologischer Zelldichte für Embryonen nach 17 Tagen Bebrütung (Embryo EI 33, HE-Färbung, 100er Vergrößerung)

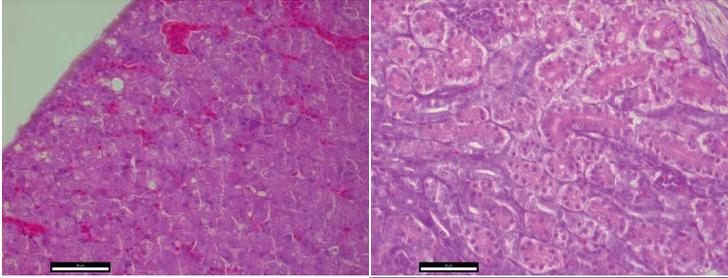


Abbildung 6: Leber mit Hepatolipidose (links), juvenile Niere (rechts) Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Links: Typische Fetteinschlüsse in der Leber bedingt durch beginnende Dottersackresorption drei Tage vor Schlupf (Embryo EI 01, HE-Färbung, 400er Vergrößerung)

Rechts: Juvenile Niere mit extramedullärer Hämatopoese (Embryo EI 01, HE-Färbung, 400er Vergrößerung)

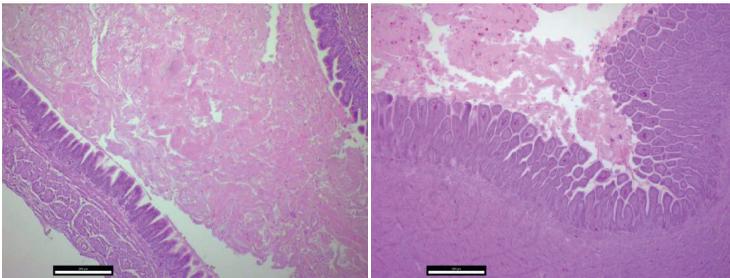


Abbildung 7: Drüsenmagen (links) und Muskelmagen (rechts) Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Im Lumen der Mägen ist abgeschlucktes Material zu finden (Embryo EI 04, HE-Färbung, 100er Vergrößerung)



Abbildung 8: Juveniles Herz, Klappenanschnitt Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Immature Muskelfasern mit embryonalem Bindegewebe, das Leitungssystem (Purkinjefasern) ist nicht sicher differenzierbar (Embryo EI 01, HE-Färbung, 100er Vergrößerung)

4.3.1.4 PaBV-Antigennachweis mittels Immunhistochemie von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

Mittels Immunhistochemie wurden Gehirn, Herz, Leber, Drüsenmagen, Muskelmagen und Niere auf PaBV-Antigen untersucht. Die Schnitte waren zum Teil nur schwer auswertbar, da die Embryonen in dieser Gruppe auf vier Untersuchungsmethoden aufgeteilt wurden und die Organe nur zum Teil oder gar nicht vorhanden waren. Bei sechs Embryonen war das Gehirn nicht auswertbar, da entweder nur ein sehr kleiner Teil angeschnitten war, oder es sogar vollständig nicht zu bewerten war. Bei den restlichen Embryonen konnte PaBV-Antigen mittels DAB-Färbung im Kleinhirn und vereinzelt auch im Großhirn nachgewiesen werden. Im Herzen und an der Niere fanden sich zum Teil dunkler gefärbte Areale mit DAB-Einlagerung, die aber keine Zellassoziation aufwiesen und somit als Hintergrundrauschen gewertet wurden. Die Mock-Kontrollen wiesen keine positiven Reaktionen im Gehirn auf. Die relative Häufigkeit des PaBV-Antigennachweises für die Immunhistochemie lag im Kleinhirn bei 91,3 % (21 von 23) und im Großhirn bei 50 % (12 von 24). Das Konfidenzintervall ergab für das Kleinhirn CI: [72,0 %; 98,9 %] und für das Großhirn CI: [29,1 %; 70,9 %].

ERGEBNISSE

Nr.	Kleinhirn	Großhirn	Herz	Leber	Drüsen- magen	Muskel- magen	Niere
EI 01	+	-	-	-	-	-	-
EI 02	+	-	-	-	-	-	-
EI 03	fehlt	fehlt	-	-	-	-	-
EI 04 K	-	-	-	-	-	-	-
EI 05	fehlt	fehlt	-	-	-	-	-
EI 06	+	fehlt	-	-	-	-	-
EI 07	fehlt	+	-	-	-	-	-
EI 08	+	+	-	-	-	-	-
EI 09	fehlt	fehlt	-	-	-	-	-
EI 10	+	+	fehlt	-	-	-	-
EI 11	+	-	-	-	-	-	fehlt
EI 12 K	-	-	-	-	-	-	-
EI 13	-	+	-	-	-	-	-
EI 14	+	+	fehlt	-	-	-	-
EI 15	fehlt	+	-	-	-	-	-
EI 16	fehlt	+	-	-	-	-	-
EI 17	+	+	-	-	-	fehlt	-
EI 18	fehlt	+	-	-	-	-	-
EI 19	+	-	-	-	-	-	-
EI 20	+	-	-	fehlt	-	-	-
EI 21	+	-	-	-	-	-	-
EI 22	+	fehlt	-	-	-	-	-
EI 23	+	+	-	-	-	-	-
EI 24	+	+	-	-	fehlt	-	-
EI 25	+	-	-	-	-	-	-
EI 26	fehlt	-	-	-	-	-	-
EI 27	+	fehlt	-	-	-	fehlt	-
EI 28	+	fehlt	-	-	-	-	-
EI 29	fehlt	-	-	-	-	-	fehlt
EI 30	-	-	-	-	-	-	-
EI 31	+	-	-	-	-	-	-
EI 32	+	+	-	-	-	-	-
EI 33	+	-	-	-	-	-	-
EI 34	+	fehlt	-	-	-	-	-

Tabelle 7: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4
Legende: Positiv = +; Negativ = -; Nicht genügend Material zur Auswertung vorhanden = fehlt ;
 K= Kontrolle

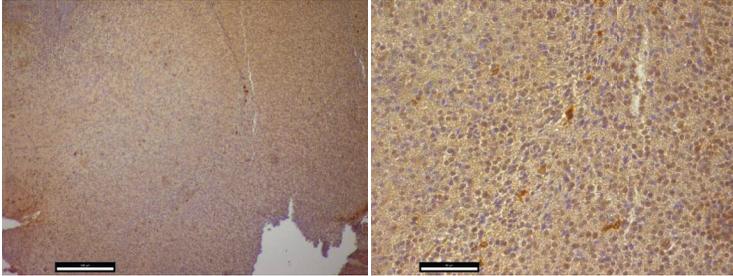


Abbildung 9: PaBV-Antigennachweis im Großhirn Embryo EI 32 Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Links: 100er Vergrößerung im Lichtmikroskop. Vereinzelt pos. DAB-Färbungen.

Rechts: 400er Vergrößerung im Lichtmikroskop. Deutliche DAB-Färbung im Zellkern und Perikariär.

4.3.1.5 Virus-Isolierung von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

In Versuchsgruppe 1 konnte nach drei Passagen auf CEC-32 Wachtelzellen kein infektiöses Virus aus den Embryonen isoliert werden.

4.3.1.6 Zusammenfassende Ergebnisse von Versuch 1: Dottersackinokulation mit PaBV-4

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass außer bei EI 05 und EI 29 bei allen in der PaBV-RT-PCR positiven Embryonen auch PaBV-Antigen gefunden werden konnte. Bei EI 05 und EI 29 war eine Auswertung der Immunhistochemie im Gehirn nicht möglich, da kein passendes Material angeschnitten wurde. Allerdings waren nicht alle Embryonen die in der Immunhistochemie positive Ergebnisse zeigten auch in der RT-PCR positiv (9 von 26).

ERGEBNISSE

Nr.	Gehirn Ct-Wert PaBV-RNA	Organe Ct-Wert PaBV-RNA	Kleinhirn PaBV-Antigen	Großhirn PaBV-Antigen	Organe PaBV-Antigen
EI 01	Ct 23,34	-	+	-	-
EI 02	-	-	+	-	-
EI 03	-	-	fehlt	fehlt	-
EI 04 Kontr.	-	-	-	-	-
EI 05	Ct 31,03	-	fehlt	fehlt	-
EI 06	-	-	+	fehlt	-
EI 07	-	-	fehlt	+	-
EI 08	-	-	+	+	-
EI 09	-	-	fehlt	fehlt	-
EI 10	-	-	+	+	-
EI 11	Ct 30,59	-	+	-	-
EI 12 Kontr.	-	-	-	-	-
EI 13	-	-	-	+	-
EI 14	Ct 24,75	-	+	+	-
EI 15	-	-	fehlt	+	-
EI 16	-	-	fehlt	+	-
EI 17	-	-	+	+	-
EI 18	-	-	fehlt	+	-
EI 19	-	-	+	-	-
EI 20	-	-	+	-	-
EI 21	-	-	+	-	-
EI 22	-	-	+	fehlt	-
EI 23	Ct 31,03	-	+	+	-
EI 24	-	-	+	+	-
EI 25	-	-	+	-	-
EI 26	-	-	fehlt	-	-
EI 27	-	-	+	fehlt	-
EI 28	-	-	+	fehlt	-
EI 29	Ct 37,36	-	fehlt	-	-
EI 30	-	-	-	-	-
EI 31	Ct 30,84	-	+	-	-
EI 32	-	-	+	+	-
EI 33	Ct 34,88	-	+	-	-
EI 34	Ct 26,48	-	+	fehlt	-

Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse in Versuch 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4
PaBV-RNA Nachweis und PaBV-Antigennachweis
Legende: Positiv (PaBV-RNA Nachweis) = Ct-Wert; Positiv (PaBV-Antigennachweis) = +;
Negativ = -; Nicht genügend Material zur Auswertung vorhanden= fehlt ; Kontr.= Kontrolle

4.3.2 In vivo Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

4.3.2.1 Klinische Beobachtungen von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

Gruppe 1: PaBV-4 Inokulation in den Dottersack

Die Eier zeigten einen physiologischen Entwicklungsverlauf vor und nach der Inokulation in den Dottersack.

Gruppe 2: PaBV-4 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

Die Eier zeigten einen normalen Entwicklungsverlauf vor und nach der Inokulation auf die Chorioallantoismembran. Bei drei Eiern kam es zu kleineren Blutungen nach der Applikation des Isolates, die Embryonen entwickelten sich jedoch normal.

Gruppe 3: PaBV-2 Inokulation in den Dottersack

Die Eier zeigten einen normalen Entwicklungsverlauf vor und nach der Inokulation mit PaBV-2 in den Dottersack. Ein Embryo starb an Tag 11 p.i. ab.

Gruppe 4: PaBV-2 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

Nach Applikation des Isolates auf die Chorioallantoismembran kam es bei zwei Eiern zu kleineren Blutungen, die Embryonen entwickelten sich aber normal. Ein Embryo starb an Tag 12 p.i. ab.

4.3.2.2 PaBV-RNA Nachweis von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

Gruppe 1: PaBV-4 Inokulation in den Dottersack

Es wurden elf Embryonen mittels RT-PCR untersucht. Zehn waren mit PaBV-4 inokuliert und eine Mock-Kontrolle mit Zellkulturhomogenat. Aus acht Embryogehirnen der PaBV-4 inokulierten Eier konnte PaBV-4-RNA nachgewiesen werden, wobei einer einen hohen Ct-Wert von 38,9 aufwies. Aufgrund des typischen Kurvenverlaufs in der RT-PCR wurde er trotzdem als positiv gewertet (siehe 3.2.4). Bei dem Embryo der Mock-Kontrolle und zwei weiteren Embryonen der infizierten Eier konnte keine PaBV-RNA nachgewiesen werden. Die im Organpool (siehe 4.3.1.2) untersuchten restli-

chen Organe waren bei allen Embryonen ohne Nachweis von PaBV-RNA (siehe Tabelle 9). Für diese Gruppe war die relative Häufigkeit in der RT-PCR 80 % (8 von 10). Das Konfidenzintervall betrug CI:[44,4 %; 97,4 %].

Nr.	Gehirn Ct-Wert	Organe Ct-Wert
PCR_DO 01	Ct 21,17	-
PCR_DO 02	Ct 30,47	-
PCR_DO 03	Ct 29,56	-
PCR_DO 04	-	-
PCR_DO 05	Ct 21,09	-
PCR_DO 06	Ct 28,75	-
PCR_DO 07	Ct 38,90	-
PCR_DO 08	Ct 21,78	-
PCR_DO 09	Ct 21,81	-
PCR_DO 10	-	-
PCR_DO 11 Kontrolle	-	-

Tabelle 9: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4
Legende: Positiv = Ct-Wert; Negativ: -

Gruppe 2: PaBV-4 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

In dieser Gruppe wurden elf Embryonen untersucht, zehn waren mit PaBV-4 inokuliert und ein Embryo war eine Mock-Kontrolle. PaBV-4-RNA konnte im Gehirn von acht der zehn infizierten Embryonen (80 %) nachgewiesen werden. Der Embryo der Mock-Kontrolle und zwei weitere Embryonen aus infizierten Eiern waren negativ. Die im Organpool untersuchten restlichen Organe waren bei allen Embryonen negativ (siehe Tabelle 10). Das Konfidenzintervall für diese Gruppe lag bei CI: [44,4 %; 97,4 %].

Nr.	Gehirn Ct-Wert	Organe Ct-Wert
PCR_CA 01	Ct 23,02	-
PCR_CA 02	Ct 21,87	-
PCR_CA 03	Ct 24,33	-
PCR_CA 04	Ct 22,42	-
PCR_CA 05	Ct 31,46	-
PCR_CA 06	Ct 31,10	-
PCR_CA 07	Ct 32,48	-
PCR_CA 08	-	-
PCR_CA 09	Ct 25,07	-
PCR_CA 10	-	-
PCR_CA 11 Kontrolle	-	-

Tabelle 10: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4
Legende: Positiv = Ct-Wert; Negativ = -

Gruppe 3: PaBV-2 Inokulation in den Dottersack

Es wurden fünf Eier in den Dotter inokuliert, von denen die Embryonen untersucht wurden. Zusätzlich wurde eine Mock-Kontrolle untersucht. Bei vier von fünf infizierten Embryonen konnte PaBV-RNA im Gehirn nachgewiesen werden. Die im Organpool untersuchten restlichen Organe waren bei allen Embryonen negativ (siehe Tabelle 11). Für diese Gruppe wurde in der RT-PCR eine relative Häufigkeit mit 80 % (4 von 5) berechnet. Das Konfidenzintervall lag bei CI: [28,3 %; 99,5 %]. Der hohe Ct-Wert von Embryo PCR_PaBV-2 06 DO wurde als positiv berechnet, da die Kurvenauswertung der RT-PCR einen eindeutigen Anstieg zeigte.

Nr.	Gehirn Ct-Wert	Organe Ct-Wert
PCR_PaBV-2 02 DO	Ct 26,43	-
PCR_PaBV-2 04 DO	Ct 25,23	-
PCR_PaBV-2 06 DO	Ct 39,63	-
PCR_PaBV-2 08 DO	Ct 26,41	-
PCR_PaBV-2 10 DO	-	-
PCR_PaBV-2 12 DO Kontrolle	-	-

Tabelle 11: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2
Legende: Positiv = Ct-Wert; Negativ = -

Gruppe 4: PaBV-2 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

Hierfür wurden sechs Embryonen untersucht. Fünf waren aus mit PaBV-2 inokulierten Eiern und ein Embryo aus der Mock-Inokulation. Bei 100 % der Embryonen aus PaBV-2 inokulierten Eiern (fünf von fünf) konnte PaBV-RNA im Gehirn nachgewiesen werden (siehe Tabelle 12). Alle anderen Organe und der Embryo der Mock-Kontrolle waren negativ. Für diese Gruppe wurde ein Konfidenzintervall von CI: [54,9 %; 100 %] berechnet. Der hohe Ct-Wert von Embryo PCR_PaBV-2 05 CA wurde als positiv bewertet, da die Kurvenauswertung der RT-PCR einen eindeutigen Anstieg zeigte.

Nr.	Gehirn Ct-Wert	Organe Ct-Wert
PCR_PaBV-2 01 CA	Ct 31,16	-
PCR_PaBV-2 03 CA	Ct 38,11	-
PCR_PaBV-2 05 CA	Ct 36,94	-
PCR_PaBV-2 07 CA	Ct 29,66	-
PCR_PaBV-2 09 CA	Ct 29,90	-
PCR_PaBV-2 11 CA Kontrolle	-	-

Tabelle 12: Nachweis von PaBV-RNA Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2
Legende: Positiv = Ct-Wert; Negativ = -

4.3.2.3 Histologische Untersuchung von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

In Versuch 2 wurden jeweils zehn Embryonen für PaBV-4 Dottersackinokulation und PaBV-4 Chorioallantoismembraninokulation *in toto* histologisch untersucht. Für PaBV-2 wurden jeweils fünf Embryonen *in toto* für die Dottersackinokulation und die Chorioallantoismembraninfektion histologisch untersucht. Die Organschnitte waren bei allen Embryonen dadurch sehr gut auswertbar. Die Strukturen konnten vollständig nachvollzogen werden. Wie in Versuch 1 wurden keine Hinweise auf lymphoplasmazelluläre Infiltrate oder eine Ganglioneuritis gefunden. Die altersbedingten Veränderungen an den Organen ließen sich wie in Versuch 1 nachvollziehen. Das Herz wies bei allen Küken immature Muskelfasern mit reichlich embryonalem Bindegewebe auf, das Leitungssystem (Purkinjefasern) war nicht sicher differenzierbar. In der Niere zeigte sich eine physiologische extramedulläre Hämatopoese bei Ausschnitten mit Gefäßanschnitten (Gruppe 1: 2/10; Gruppe 2: 3/10, Gruppe 3: 0/5, Gruppe 4: 1/5). Die Leber zeigte bei den Embryonen eine milde bis moderate

Hepatalipidose (Gruppe 1: 4/10; Gruppe 2: 5/10, Gruppe 3: 2/5, Gruppe 4: 1/5), die als Folge der beginnenden Dottersackresorption gedeutet werden kann. Zusätzlich zeigten alle Leberschnitte, die Blutgefäßanschnitte und Blutzellen enthielten, eine physiologische moderate bis deutliche extramedulläre Hämatopoese (Gruppe 1: 1/10; Gruppe 2: 3/10, Gruppe 3: 0/5, Gruppe 4: 0/5). Die Drüsen- und Muskelmägen enthielten abgeschlucktes Material.

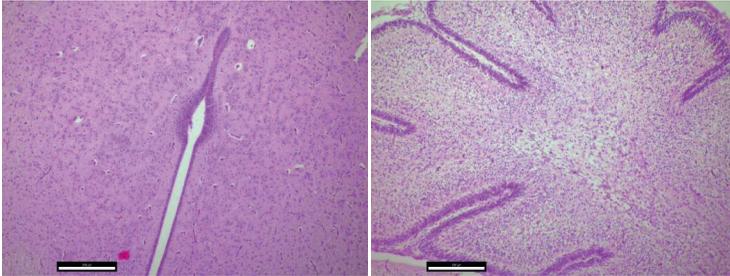


Abbildung 10: Juveniles Großhirn (links) und Kleinhirn (rechts)

Links Embryo HE_PaBV-2 01: Keine Hinweise auf pathologische Veränderungen (HE-Färbung, 100er Vergrößerung, Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2)

Rechts Embryo HE_CA 04: Keine Hinweise auf pathologische Veränderungen (HE-Färbung, 100er Vergrößerung, Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4)

4.3.2.4 PaBV-Antigennachweis mittels Immunhistochemie von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

Gruppe 1: PaBV-4 Inokulation in den Dottersack

In dieser Gruppe wurde PaBV-Phosphoprotein p24 bei neun von zehn untersuchten Embryonen (90 %) im Gehirn nachgewiesen. Bei einem Embryo war der Antigenachweis dabei schwach, bei einem weiteren negativ. Als bevorzugte Stellen erwiesen sich die zentralen Kerngebiete des *Arbor vitae*. Darüber hinaus zeigte sich eine Präferenz zu Zellen entlang des Ependyms der Ventrikel. Am Ependym entlang konnte häufig eine positive Zellfärbung beobachtet werden, im Großhirn ohne Ventrikelausschnitt dagegen konnten nur vereinzelt positive Zellen gefunden werden. Bei 80 % der Embryonen (acht von zehn) konnte eine positive Zellfärbung im Großhirn gefunden werden. Die Organe wiesen keinerlei positive Reaktion auf. Für die Ergebnisse der Immunhistologie ergaben sich für das Kleinhirn ein Konfidenzintervall von CI:[55,5 %; 99,7 %] und für das Großhirn ein Konfidenzintervall von CI:[44,4 %; 97,4 %].

Nr.	Kleinhirn zentral	Großhirn zentral	Herz	Leber	Drüsen- magen	Muskel- magen	Niere
DAB_DO 01	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 02	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 03	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 04	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 05	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 06	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 07	+	-	-	-	-	-	-
DAB_DO 08	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 09	+	+	-	-	-	-	-
DAB_DO 10	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 13: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Legende: Positiv = +; Negativ = -

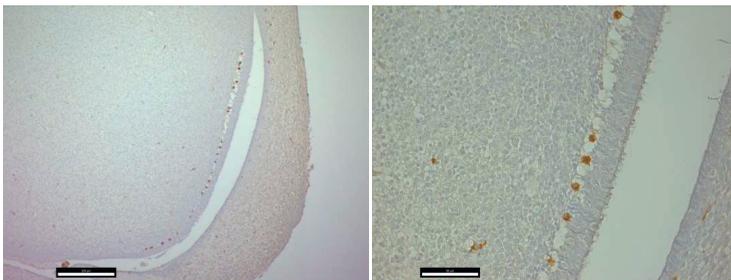


Abbildung 11: Großhirn mit Ventrikelschnitt Embryo DAB_DO 01 Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Links: Positive DAB-Färbung 100er Vergrößerung im Lichtmikroskop

Rechts: Positive DAB-Färbung entlang der Ependymzellen bei 400er Vergrößerung im Lichtmikroskop

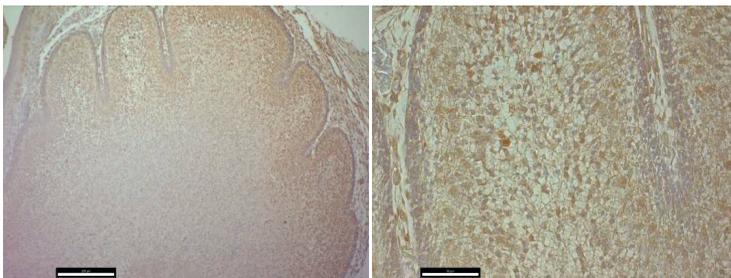


Abbildung 12: Kleinhirn Embryo DAB_DO 09 Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Links: Wenig pos. DAB-Färbung (100er Vergrößerung im Lichtmikroskop)

Rechts: *Arbor vitae* mit PaBV-Antigen in den Zellkernen bei 400er Vergrößerung im Lichtmikroskop

Um das Verteilungsmuster von PaBV-Antigen im Gehirn besser darstellen zu können wurden je Gehirn drei Lokalisationen untersucht. Untersucht wurden das Kleinhirn zentral im *Arbor vitae*, das Großhirn zentral ohne Ventrikelschnitt und ein Teil vom

Gehirn mit Ventrikelanschnitt. Dabei wurden in der 200er Vergrößerung im Lichtmikroskop die PaBV-Antigen-positiven Zellen ausgezählt. Es zeigte sich ein deutlich häufigerer PaBV-Antigennachweis im Kleinhirn und in Gehirnarealen mit Ventrikelanschnitt, als im Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Der Vergleich der Ergebnisse des Kleinhirns mit dem Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt ergab einen signifikanten Unterschied. Der kritische Wert von U bei $p < 0,05$ (p =probability) wurde mit 23 angegeben. Der berechnete U -Wert lag bei 17,5 und ist mit $p < 0,05$ statistisch signifikant. Der daraus resultierende p -Wert der exakten Signifikanz war 0,01552 und war damit signifikant bei $p < 0,05$. Im Gegensatz dazu konnte zwischen der Verteilung im Kleinhirn und dem Gehirnabschnitt mit Ventrikelanschnitt kein Unterschied festgestellt werden. Der berechnete U -Wert lag bei 47,5 bei einem kritischen Wert von $U=23$ bei $p < 0,05$ mit einem p -Wert von 0,88076. Das Ergebnis ist somit nicht signifikant. Im Vergleich der Verteilung von PaBV-Antigen zwischen Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt und Gehirnareal mit Ventrikelabschnitt konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hier berechnete sich der U -Wert mit 16 (Kritischer U -Wert 23 bei $p < 0,05$). Dies ergab einen statistisch signifikanten p -Wert von 0,0114.

	Kleinhirn zentral	Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt	Gehirn mit Ventrikelanschnitt
Gruppe 1	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)
DAB_DO 01	22	2	26
DAB_DO 02	20	4	20
DAB_DO 03	15	1	28
DAB_DO 04	38	22	46
DAB_DO 05	20	1	27
DAB_DO 06	10	5	4
DAB_DO 07	13	0	8
DAB_DO 08	25	2	12
DAB_DO 09	3	1	5
DAB_DO 10	0	0	0

Tabelle 14: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

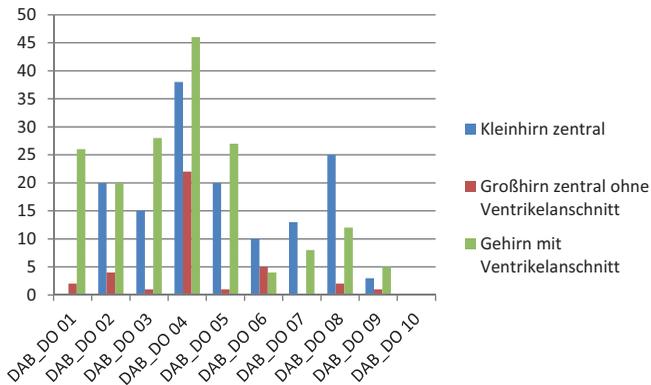


Abbildung 13: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 1 Dottersackinokulation mit PaBV-4

Deutlich mehr PaBV-Antigen Nachweis in Kleinhirn zentral und Gehirnaireal mit Ventrikelanschnitt als in Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt.

Gruppe 2: PaBV-4 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

Bei zehn von zehn untersuchten Embryonen konnte im Kleinhirn und bei sechs von zehn im Großhirn PaBV-Antigen nachgewiesen werden. Die Verteilung stellte sich ähnlich zur Gruppe mit der Dottersackinokulation dar. Die Organe wiesen keinerlei positive Reaktion auf. Die relative Häufigkeit lag bei 100 % im Kleinhirn (zehn von zehn) und 60 % (sechs von zehn) im Großhirn. Die Konfidenzintervalle für diese Gruppe lagen im Kleinhirn bei CI: [74,1 %, 100 %] und im Großhirn bei CI: [26,2 %; 87,8 %].

Nr.	Kleinhirn	Großhirn	Herz	Leber	Drüsen- magen	Muskel- magen	Niere
DAB_CA 01	+	+	-	-	-	-	-
DAB_CA 02	+	+	-	-	-	-	-
DAB_CA 03	+	+	-	-	-	-	-
DAB_CA 04	+	+	-	-	-	-	-
DAB_CA 05	+	-	-	-	-	-	-
DAB_CA 06	+	+	-	-	-	-	-
DAB_CA 07	+	-	-	-	-	-	-
DAB_CA 08	+	-	-	-	-	-	-
DAB_CA 09	+	+	-	-	-	-	-
DAB_CA 10	+	-	-	-	-	-	-

Tabelle 15: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4

Legende: Positiv = +, Negativ = -

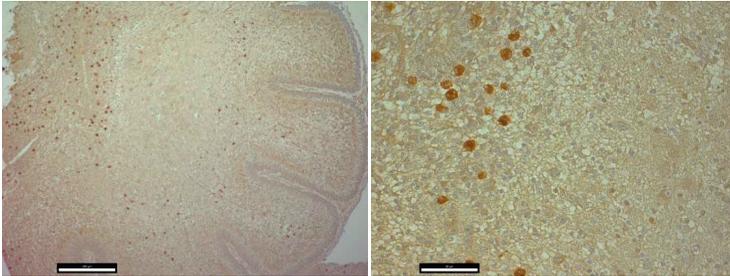


Abbildung 14: Kleinhirn Embryo DAB_CA 01 Versuch 2 Gruppe 2
Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4

Links: Positive DAB-Färbung im *Arbor vitae* bei 100er Vergrößerung
Rechts: DAB-Färbung im Zellkern und Perikariär bei 400er Vergrößerung

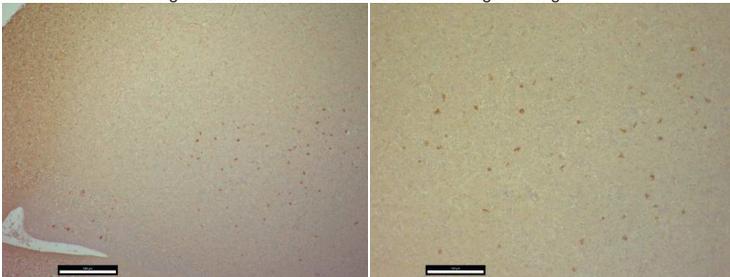


Abbildung 15: Großhirn Embryo DAB_CA 01 Versuch 2 Gruppe 2
Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4

Links: Großhirn mit Ventrikelanschnitt 100er Vergrößerung. PaBV-Antigen entlang des Ependyms des Ventrikels und zentral im Großhirn.
Rechts: Großhirn 200er Vergrößerung. PaBV-Antigen Nachweis im Zellkern und Perikariär.

Bei der Darstellung der PaBV-Antigenverteilung im Gehirn zeigte sich das oben beschriebene Verteilungsmuster (siehe Tabelle 16). Die Berechnung zum Vergleich Kleinhirn und Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt ergaben signifikante Unterschiede. Der kritische Wert von U bei $p < 0,05$ wurde mit 23 angegeben. Der berechnete U -Wert lag bei 2 und ist statistisch signifikant und der daraus resultierende p -Wert der exakten Signifikanz 0,00034. Wie in Gruppe 1 konnte zwischen der Verteilung im Kleinhirn und dem Gehirnabschnitt mit Ventrikelanschnitt auch in Gruppe 2 kein Unterschied festgestellt werden. Der berechnete U -Wert lag bei 44,5 bei einem kritischen Wert von $U=23$ bei $p < 0,05$ mit einem p -Wert von 0,70394. Das Ergebnis ist somit nicht signifikant. Im Vergleich der Verteilung von PaBV-Antigen zwischen Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt und Gehirnareal mit Ventrikelabschnitt konnte wie in Gruppe 1 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hier berechnete sich der U -Wert mit 8,5 (Kritischer U -Wert 23 bei $p < 0,05$). Dies ergab einen statistisch signifikanten p -Wert von 0,00194.

	Kleinhirn zentral	Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt	Gehirn mit Ventrikelanschnitt
Gruppe 2	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)
DAB_CA 01	75	5	15
DAB_CA 02	7	0	14
DAB_CA 03	3	1	5
DAB_CA 04	15	2	11
DAB_CA 05	15	0	20
DAB_CA 06	16	0	27
DAB_CA 07	12	0	10
DAB_CA 08	8	0	0
DAB_CA 09	18	6	29
DAB_CA 10	23	0	8

Tabelle 16: PaBV-Antigenverteilung in Versuch 2 Gruppe 2 Chorioallantoisembraninokulation mit PaBV-4

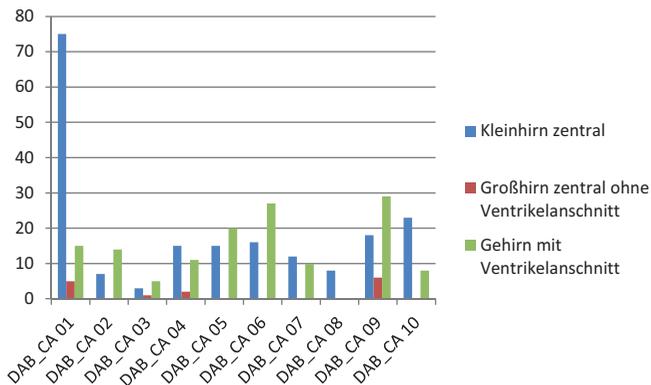


Abbildung 16: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn Versuch 2 Gruppe 2

Deutlich mehr PaBV-Antigen in Kleinhirn zentral und Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt als in Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt.

Gruppe 3: PaBV-2 Inokulation in den Dottersack

Bei 100 % der untersuchten Embryonen (fünf von fünf) konnte im Gehirn Antigen nachgewiesen werden. Die Organe wiesen keinerlei positive Reaktion auf. Die Konfidenzintervalle lagen für das Kleinhirn bei CI: [54,9 %; 100 %] und für das Großhirn bei CI: [54,9 %; 100 %].

ERGEBNISSE

Nr.	Kleinhirn	Großhirn	Herz	Leber	Drüsen- magen	Muskel- magen	Niere
DAB_PaBV-2 02D	+	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2 04D	+	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2 06D	+	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2 08D	+	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2 10D	+	+	-	-	-	-	-

Tabelle 17: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2
Legende: Positiv= +; Negativ = -

Der Vergleich zur Antigenverteilung in den unterschiedlichen Gehirnarealen wurde wie für Gruppe 1 und 2 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die statistische Berechnung ergab für den Vergleich der PaBV-Antigenverteilung im Kleinhirn und Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt einen statistisch signifikanten Unterschied von $U=1$, bei einem kritischen U -Wert von 2 bei $p<0,05$. Der p -Wert wurde mit $p=0,02144$ berechnet. Auch in dieser Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kleinhirn und Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt festgestellt werden ($U=7$, krit. \underline{U} -Wert=2, $p=0,29834$ bei $p<0,05$). Anders als in den Gruppen zuvor konnte für den Vergleich der PaBV-Antigenverteilung im Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt und in Gehirnarealen mit Ventrikelanschnitt in Gruppe 3 kein signifikanter Unterschied berechnet werden. Hier ergab sich ein U -Wert von 5,5 (krit. U -Wert=2) und ein p -Wert von 0,17384.

	Kleinhirn zentral	Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt	Gehirn mit Ventrikelanschnitt
Gruppe 3	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)
DAB_PaBV-2 02D	30	9	50
DAB_PaBV-2 04D	75	5	15
DAB_PaBV-2 06D	20	0	5
DAB_PaBV-2 08D	8	0	4
DAB_PaBV-2 10D	64	7	38

Tabelle 18: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2

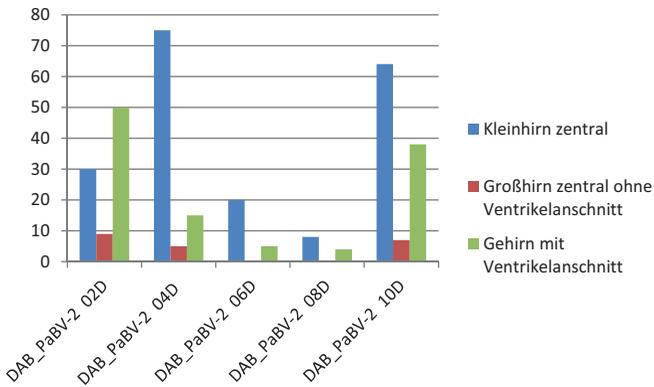


Abbildung 17: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 3 Dottersackinokulation mit PaBV-2

Deutlich mehr PaBV-Antigennachweis in Kleinhirn zentral und Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt als in Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt.

Gruppe 4: PaBV-2 Inokulation auf die Chorioallantoismembran

Auch hier konnte bei 100 % der untersuchten Embryonen PaBV-Antigen im Gehirn nachgewiesen werden. Die Organe blieben wie auch schon in den Versuchen zuvor negativ. Für das Kleinhirn wurde die relative Häufigkeit mit 80 % (vier von fünf) und im Großhirn mit 100 % (fünf von fünf) errechnet. Die Konfidenzintervalle lagen bei CI: [28,3%; 99,5%] im Kleinhirn und bei CI: [54,9 %; 100 %] im Großhirn.

Nr.	Kleinhirn	Großhirn	Herz	Leber	Drüsenmagen	Muskelmagen	Niere
DAB_PaBV-2_01C	+	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2_03C	+	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2_05C	+	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2_07C	-	+	-	-	-	-	-
DAB_PaBV-2_09C	+	+	-	-	-	-	-

Tabelle 19: Nachweis von PaBV-Antigenen in Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2

Legende: Positiv = +; Negativ = -

Der Vergleich zur PaBV-Antigenverteilung in den drei Gehirnabschnitten Kleinhirn zentral, Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt und Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt wurde wie für die oben beschriebenen Gruppen durchgeführt. Die Berechnung des Vergleichs Kleinhirn mit Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt erbrachte keine mathematisch darstellbaren signifikanten Unterschiede ($U=5$,

krit. $U=2$, $p=0,1443$ bei $p<0,05$). Für den Vergleich Kleinhirn und Gehirnameal mit Ventrikelabschnitt ergab sich ebenso kein signifikanter Unterschied ($U=12$, krit. $U=2$, $p=1$ bei $p<0,05$). Für den Vergleich Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt und Gehirnameal mit Ventrikelanschnitt ergab sich hingegen ein signifikanter Unterschied mit $U=0$ bei einem kritischen U -Wert von 2. Daraus ergibt sich ein p -Wert von $0,01208$ der bei einem $p<0,05$ signifikant ist.

	Kleinhirn zentral	Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt	Gehirn mit Ventrikelanschnitt
Gruppe 4	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)	PaBV-Ag pos. Zellen (200er Vergrößerung)
DAB_PaBV-2_01C	98	1	20
DAB_PaBV-2_03C	34	7	22
DAB_PaBV-2_05C	33	10	32
DAB_PaBV-2_07C	0	1	35
DAB_PaBV-2_09C	12	8	25

Tabelle 20: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2

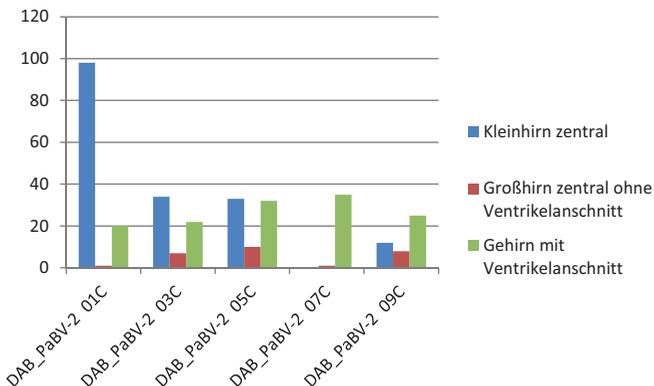


Abbildung 18: PaBV-Antigenverteilung im Gehirn bei Versuch 2 Gruppe 4 Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-2

Deutlich mehr PaBV-Antigen in Kleinhirn zentral und Gehirnameal mit Ventrikelanschnitt, als in Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt.

Vergleich der Gruppen 1, 2, 3 und 4

Die Auswertung der Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen PaBV-4 und PaBV-2 (Kleinhirn: $U=62$, krit. $U=55$, $p=0,09894$ bei $p<0,05$; Großhirn

zentral ohne Ventrikelanschnitt: $U=60$, krit. $U=55$, $p=0,08186$ bei $p<0,05$; Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt: $U=64$, krit. $U=55$, $p=0,11876$ bei $p<0,05$). Obwohl in Gruppe 3 der Vergleich Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt und Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt und in Gruppe 4 der Vergleich Kleinhirn und Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt keine signifikanten Unterschiede erbrachten, zeigte ein Vergleich der Gesamtzahlen aus allen vier Gruppen deutliche Ergebnisse. Vergleicht man die Zahlen der PaBV-Antigennachweise aus allen Gruppen im Kleinhirn mit dem Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt, ergibt sich ein U -Wert von 97. Der z -Wert berechnet sich mit 5,21151. Daraus ergibt sich ein p -Wert der asymptotischen Signifikanz von 0,0, welcher bei einem $p<0,05$ statistisch signifikant ist. Ebenso lässt sich der Unterschied in der PaBV-Antigenverteilung zwischen Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt und Gehirn mit Ventrikelanschnitt in den Gesamtzahlen aller Gruppen signifikant darstellen. Der berechnete U -Wert liegt hier für die Werte aller Gruppen bei 113,5. Mit einem $z= -4,96757$ ist auch hier der p -Wert bei 0,0 und damit statistisch signifikant. Nur im Vergleich von Kleinhirn und Gehirn mit Ventrikelanschnitt lässt sich kein signifikanter Unterschied aufzeigen ($U=423,5$, $z= 0,3844$, $p=0,70394$ bei $p<0,05$).

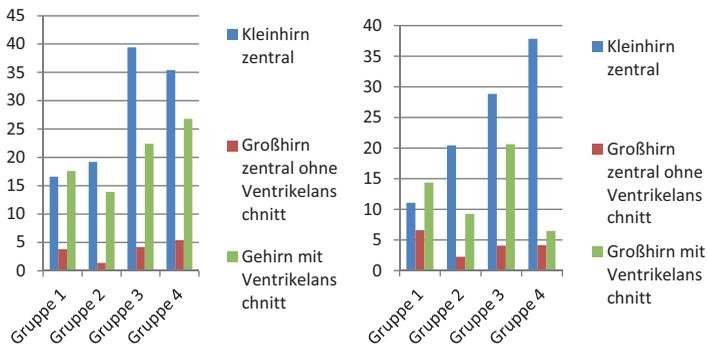


Abbildung 19: Mittelwerte (links) und Standardabweichung (rechts) der PaBV-Antigenverteilung im Vergleich der Gruppen 1, 2, 3 und 4 aus Versuch 2
 Eindeutige Mehrverteilung von PaBV-Antigen in Kleinhirn zentral und Gehirnareal mit Ventrikelanschnitt.

4.3.2.5 Vergleich der Häufigkeiten des PaBV-Nachweises aus RT-PCR und Immunhistochemie mittels zweifaktorieller exakter logistischer Regression

Für die Gruppen aus Versuch 2 der Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation im Vergleich von PaBV-4 mit PaBV-2 wurde ein Vergleich der Häufigkeiten eines PaBV-Nachweises mittels zweifaktorieller exakter logistischer Regression erstellt. Hierfür wurden die unterschiedlichen Infektionsrouten und die zwei Virusvarianten PaBV-4 und PaBV-2 miteinander verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede für den Virusnachweis bezüglich des Infektionsorts und der Virusvarianten nachgewiesen werden. Für die Untersuchung mit der RT-PCR ergaben sich für den Vergleich der Virusvarianten ein p -Wert (p =probability) von 1,0 und für den Unterschied in der Infektionsroute $p=0,6053$. Für die Immunhistochemie ließ sich für die beiden Virusvarianten ein $p=1,0$ berechnen. Auch der Vergleich der Infektionsrouten ergab einen p -Wert von 1,0. Nach diesen Berechnungen ergaben sich für Versuch 2 p -Werte über dem statistisch signifikanten Wert von 0,5 und sind damit als nicht signifikant anzusehen.

4.3.2.6 Färbung zur Zellidentifikation von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

Durch keines der angewandten Färbeprotokolle (Neuronal Nuclei (NeuN) ABC (Neuronen-Marker), Rabbit anti GFAP PAP (Gliazellmarker), Kaninchen anti S-100 PAP (Gliazellmarker)) konnten die PaBV-Antigen-positiven Zellen im embryonalen Gehirn der Nymphensittiche bestimmt werden. Die Marker konnten den zu detektierenden Zelltyp im juvenilen Gehirn nicht nachweisen. Bei den Kontrollschnitten von adulten Nymphensittichen detektierten die Marker hingegen die Zielzellen.

4.3.2.7 Virus-Isolierung von Versuch 2: Dottersack- und Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4 und PaBV-2

Gruppenübergreifend konnte bei keinem Embryo nach drei Passagen auf den CEC-32-Zellen Virus isoliert werden. Auch auf den NEB- und NEF- Zellen, die nicht passagiert wurden, konnte kein PaBV-Nachweis erfolgen.

4.3.3 Untersuchung von Eiern natürlich PaBV-Infizierter *Pyrrhura* spp.

4.3.3.1 PaBV-RNA Nachweis im Dotter und Eiklar der *Pyrrhura*-Eier

In der *Pyrrhura*-Gruppe wurde bei elf Eiern Dotter und Eiklar auf PaBV-RNA untersucht. Keine der untersuchten Proben enthielt PaBV-RNA.

Nr.	Dotter Ct-Wert	Eiklar Ct-Wert
P 01	-	-
P 02	-	-
P 03	-	-
P 04	-	-
P 05	-	-
P 06	-	-
P 07	-	-
P 08	-	-
P 09	-	-
P 10	-	-
P 11	-	-

Tabelle 21: Nachweis von PaBV-RNA in den Eiern der natürlich PaBV-infizierten *Pyrrhura* spp.

Legende: Positiv = Ct-Wert; Negativ = -

5 DISKUSSION

Viele Papageienarten sind nach der Listung der IUCN Red List⁴³ vom Aussterben bedroht. Gerade in Erhaltungszuchten bedrohter Arten stellt die durch aviäre Bornaviren ausgelöste, oft tödlich verlaufende Erkrankung mit gastrointestinalen und neurologischen Symptomen eine große Bedrohung für die bereits gefährdeten Arten dar. Da der natürliche Übertragungsweg noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, sind Prophylaxemaßnahmen zu Vermeidung einer Übertragung des aviären Bornavirus' sehr schwierig. Für das *mammalian 1 bornavirus* hingegen ist in der Literatur der Übertragungsweg für einige Tierarten beschrieben.

Für das Virus der Bornaschen Krankheit der Säugetiere ist 2006 die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) als Virusreservoir nachgewiesen worden (Hilbe et al., 2006). Die Feldspitzmaus ist persistent infiziert, jedoch klinisch unauffällig. Dieser erste Nachweis in einem endemischen Gebiet in der Schweiz (Hilbe et al., 2006) konnte in Untersuchungen von Feldspitzmäusen für zwei endemische Gebiete in Deutschland bestätigt werden (Bourg et al., 2013; Dürrwald et al., 2014). Die Virussequenzen der Spitzmäuse aus den entsprechenden Gebieten stimmen mit den Sequenz-Clustern, die für die entsprechenden Regionen ermittelt waren, überein (Kolodziejek et al., 2005). In den Feldspitzmäusen, die persistent infiziert waren, konnte mittels Immunhistochemie BoDV-Antigen und mittels RT-PCR BoDV-RNA im Gehirn, Rückenmark, peripheren Nerven, sämtlichen Organen und besonders in den Drüsenorganen nachgewiesen werden. Über die sekretorischen Zellen der Drüsen, besonders die der Flankendrüse, wurde infektiöses BDV ausgeschieden (Nobach et al., 2015). Wie sich die BoDV-Infektion in der Population der Feldspitzmäuse hält, ob durch vertikale oder horizontale Übertragung, ist noch nicht geklärt. Sämtliche Säugetierspezies, die sich auf natürliche Weise über die Ausscheidungen der Feldspitzmäuse durch infektiösen Staub anstecken, werden als Fehlwirte angesehen (Nobach et al., 2015). Darauf weisen auch die Untersuchungen bei an BD erkrankten Pferden hin. Bisher konnte weder eine horizontale (Donner, 1998) noch eine vertikale (Werner, 2000) Übertragung durch an BD erkrankte Pferde nachgewiesen werden. Bei einer apparent an BD erkrankten Stute wurde das Fohlen durch Schnittentbindung entwickelt. Da es nicht lebensfähig war, konnte das Fohlen mit allen zur Verfügung stehenden virologischen und immunhistologischen Methoden (Virus-Isolierung, Anti-

⁴³ www.iucnredlist.org

gennachweis durch Western-Blot, Immunhistologie und RNA-Nachweis durch RT-PCR) und serologische Methoden (IIFT) untersucht werden. Es konnte weder infektiöses Virus noch Antigen, noch BoDV-RNA und Antikörper in Serum und Liquor nachgewiesen werden. Dagegen waren bei der Stute mit den entsprechenden Methoden infektiöses Virus, BoDV-Antigen, BoDV-RNA und BoDV-Antikörper in Serum und Liquor nachweisbar. Außerdem war das Fohlen einer an BD erkrankten Stute, das ebenfalls durch Schnittentbindung entwickelt wurde, über Jahre hinweg unauffällig. Es konnten bis zum Alter von acht Jahren keine BoDV-spezifischen Antikörper im Serum dieses Tieres bestimmt werden (Werner, 2000). Die Veröffentlichung zur vertikalen Übertragung von BoDV bei einer an BD erkrankten Stute aus Japan (Hagiwara et al., 2000) sollte kritisch gelesen werden. Es konnte bei der Stute und dem Fohlen BoDV-RNA nachgewiesen werden, deren Sequenzen identisch waren. Diese Sequenzen stimmen überein mit der Sequenz aus einem geographischen Cluster in Deutschland. Es ist bekannt, dass die Sequenzen aus den einzelnen geographischen Clustern unverwechselbar sind, unabhängig von Jahr oder von der Spezies der Virusisolierung (Kolodziejek et al., 2005). Da der natürliche Übertragungsweg von PaBV bisher nicht bewiesen werden konnte, ist nicht klar, ob die Papageien zu den Fehlwirten oder dem Virusreservoir gehören. Bei Beobachtung von Papageienbeständen wurde beschrieben, dass sich PaBV-freie Tiere nach Kontakt mit PaBV-positiven Tieren infizieren und auch erkranken (Heffels-Redmann et al., 2012). Unter Versuchsbedingungen hingegen scheint Kontakt alleine für eine Übertragung nicht auszureichen. Nach der experimentellen Infektion mit PaBV-2 und PaBV-4 an Nymphensittichen konnte bei den zugesetzten Sentineltieren keine Infektion nachgewiesen werden (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Gleiche Beobachtungen machte auch eine weitere Arbeitsgruppe nach experimenteller Infektion mit PaBV-4 im Nymphensittich (Rubbenstroth et al., 2014a). Somit stellt sich die Frage, ob sich die Tiere in den beobachteten Beständen, ähnlich den Pferden, an derselben Quelle infiziert hatten und es zu keiner horizontalen Übertragung zwischen Papageien kommt. Dies würde bedeuten, dass das eigentliche Virusreservoir für PaBV noch nicht entdeckt wurde. Möglicherweise sind auch die unterschiedlichen Virusvarianten eine Erklärung für Papageien, welche PaBV über Jahre hinweg ohne Krankheitssymptome in sich tragen (Heffels-Redmann et al., 2012). Papageien könnten somit Reservoir und Fehlwirt sein, wenn eine Art für eine bestimmte Virusvariante

Fehlwirt ist, für einen anderen hingegen Reservoir. Da das PaBV sich im Reservoir halten muss, erscheint hier auch eine vertikale Übertragung möglich.

Die vertikale Übertragung von aviären Bornaviren wird in der Literatur immer wieder diskutiert. Ein sicherer Beweis konnte bislang nicht erbracht werden. Verschiedene Forschungsgruppen konnten virusspezifische RNA in Eiern und Embryonen von infizierten Elterntieren nachweisen. Die Anzucht von infektiösem Virus aus dem Embryo verlief bisher erfolglos (Kerski et al., 2012; Lierz et al., 2011; Monaco et al., 2012; Rubbenstroth et al., 2013). Beobachtungen von Beständen mit natürlich infizierten Papageien zeigen, dass bei Handaufzucht ein Nachweis von PaBV mittels RT-PCR und Serologie im Küken nicht positiv ausfallen muss (Wüst et al., 2015). Ob diese Küken wirklich nicht infiziert sind, oder auf Grund einer Infektion vor Ausbildung des Immunsystems PaBV nicht ausscheiden und keine Antikörperreaktion gegen PaBV zeigen, konnte nicht geklärt werden, da die Tiere lebend beprobt wurden und somit keine Untersuchung von Gehirnmateriale mittels PaBV-RNA, PaBV-Antigen und Virus-Isolierung möglich war. Um die Möglichkeit einer vertikalen Übertragung beim Nymphensittich mit PaBV-4 und PaBV-2 zu untersuchen, wurden die beiden Virusvarianten auf embryonalen Nymphensittichzellkulturen (NEB- und NEF-Zellen) gegeben. Somit konnte *in vitro* sichergestellt werden, dass die beiden Virusvarianten überhaupt embryonale Nymphensittichzellen infizieren können. Anschließend wurde PaBV direkt in embryonierte Eier inokuliert. Unter der Annahme, dass PaBV auf natürlichem Wege ins Ei gelänge, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Infektion der Embryonen möglich ist. In dieser Arbeit wurden die Eier von Nymphensittichen mit PaBV-2 und PaBV-4 inokuliert und die Embryonen vor Schlupf untersucht. Der Nachweis einer validen Infektion sollte mittels RT-PCR, Antigen-nachweis und Virus-Isolierung erfolgen.

5.1 *In vitro* Inokulation von PaBV auf embryonalen Nymphensittich Zellkulturen

Für die Überprüfung der Infizierbarkeit von embryonalen Nymphensittichzellen wurden Zellkulturen aus Gehirnmateriale (NEB) und Fibroblasten (NEF) von zehn Tage alten Nymphensittichembryonen angelegt. Diese wurden anschließend mit den Virusvarianten PaBV-4 und PaBV-2 infiziert. Der Titer von PaBV-4, der auf den NEB-Zellen ermittelt wurde, entsprach dem Titer auf den CEC-32-Zellen: 5×10^6 TCID₅₀/

ml. Auch PaBV-2 konnte problemlos auf den embryonalen Nymphensittich-Gehirnzellen (NEB) angezüchtet werden. Auch hier stimmte der Titer mit 5×10^5 TCID₅₀/ ml mit dem Titer auf den CEC-32-Zellen überein. Die sehr gute Wachstumseigenschaft von PaBV-2 verhält sich auf den NEB-Zellen dagegen anders als auf den CEC-32-Zellen. Eine Untersuchung zeigte, dass nach sechs Passagen der CEC-32-Zellen nur circa 70 % der Zellen infiziert waren. Dieses Ergebnis konnte auch durch weitere Passagen nicht verbessert werden (Piepenbring, 2017). Auch andere Autoren berichten von deutlich langsamerem Wachstum von PaBV-2 auf CEC-32-Zellen (Rinder et al., 2009). Die CEC-32-Zellen stammen von Wachteln. Dass unterschiedliche Virusvarianten auch unterschiedliche Wachstumseigenschaften in unterschiedlichen Zellkulturen zeigen, ist bereits gut beschrieben. Auf Säugerzelllinien lässt sich PaBV beispielsweise nicht erfolgreich vermehren (Rinder et al., 2009). Die oben beschriebene Wachtelfibroblastenzelllinie CEC-32 eignet sich besonders bei PaBV (Rinder et al., 2009; Rubbenstroth et al., 2012), wohingegen bei Sperlingsvögel beschriebene Bornaviren gut auf der Wachtel-Skelettmuskel-Zelllinie QM-7 anzüchtbar sind (Rubbenstroth et al., 2013; Rubbenstroth et al., 2014c). Das *waterbird 1 bornavirus* lässt sich auch gut auf Entenfibroblasten (*duck fibroblasts*, DEFs) anzüchten (Guo et al., 2014; Payne et al., 2011a). Dass das PaBV-2 in dieser Arbeit auf den embryonalen Nymphensittichzellen (NEB) uneingeschränkt gut wächst, zeigt, dass das PaBV-2 eine deutliche Speziespezifität zeigt. Darüber hinaus stammt das Isolat Ps39, mit denen die Zellen infiziert wurden, von einem Nymphensittich (siehe 3.1.1.1). Somit scheint die hier verwendete Virusvariante PaBV-2 bereits gut adaptiert an den Nymphensittich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmalig den Unterschied im Wachstum einer bereits beschriebenen Virusvariante auf Zellen der ursprünglichen Spezies. Dass sich die Wachstumseigenschaften von PaBV-2 aus einem Nymphensittich auf NEB-Zellen so deutlich von denen auf CEC-32-Wachtelzellen unterscheiden, spricht für eine deutliche Adaption des verwendeten PaBV-2 an den Nymphensittich. Auf den embryonalen Nymphensittichfibroblastenzellen (NEF) konnten die verwendeten Virusvarianten hingegen nicht angezüchtet werden. Dies spricht zusätzlich für einen ausgeprägten Zellotropismus zu Zellen des zentralen Nervensystems, ähnlich des Neurotropismus bei BoDV (Carbone et al., 1987; Carbone et al., 1989; Herden et al., 2000; Herden et al., 2005; Narayan et al., 1983a, b). Darüber hinaus wurden ungewöhnliche Zellen in den Zellkulturen der NEB und NEF gefunden. Diese Zellen waren bevorzugt infiziert und

zeigten einen dichteren Plasmasaum um die Zellkerne und ein blasses, dünnes Zytoplasma mit langen Ausläufern. Darüber hinaus hatten sie einen bis mehrere Zellkerne. Zum Vergleich wurden zusätzlich Zellen von embryonalen Hühnergehirnen angesetzt. Dort konnte sich dieser Zelltyp jedoch nicht finden. Dies lässt vermuten, dass bei der Infektion von embryonalen Nymphensittichzellen mit PaBV noch weitere Faktoren eine Rolle spielen könnten. Die mikroskopische Untersuchung dieser Zellen lässt vermuten, dass es sich um noch nicht genau differenzierte Zelltypen handelt. Dies könnte nun bedeuten, dass das PaBV gezielt diese undifferenzierten Zellen infiziert um später, wenn die Zellen differenziert sind, vom Körper nicht als fremd angesehen zu werden. Auf diese Weise könnten, wie bereits von einigen Autoren vermutet, symptomfreie Träger entstehen (Monaco et al., 2012a). Eine andere Theorie könnte sein, dass die gefundenen Zellen bereits so weit differenziert sind, dass sie von PaBV bereits als Zielzelle erkannt werden. Hierfür müssten weitere Untersuchungen zu Spezifizierung dieser Zellen durchgeführt werden.

5.2 *In vivo* Inokulation von PaBV in Nymphensitticheiern

Für den Nachweis einer vertikalen Übertragungsmöglichkeit wurden im ersten Versuch 34 Eier von Nymphensitticheltern, die in der RT-PCR und im IIFT PaBV-negativ getestet waren, untersucht. Es wurden 32 Eier mit PaBV-4 in den Dottersack inokuliert, zwei Eier wurden als Mock-Kontrollen mit Zellkulturhomogenat inokuliert. Die Inokulation erfolgte am dritten bis fünften Tag der Bebrütung. Anschließend wurden die Eier noch mindestens elf Tage inkubiert. Alle Embryonen wurden an Tag 17 der Brutdauer untersucht. Jedem Embryo wurden Gehirn, Herz, Leber, Drüsen- und Muskelmagen sowie die Niere entnommen, mit einer sterilen Klinge zerteilt und auf die Untersuchungsmethoden RT-PCR, Virus-Isolierung Histologie und Immunhistochemie verteilt. Aus dem Organmaterial, welches für die histologische Untersuchung bestimmt war, wurden auch die Schnitte für die Immunhistochemie hergestellt. Bei 9/32 Embryonen konnte der Nachweis von PaBV-RNA erbracht werden. Bei 26/32 Embryonen wurde PaBV-Antigen im Gehirn nachgewiesen, davon waren 21 Nachweise im Kleinhirn und zwölf im Großhirn. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse aus Immunhistologie und RT-PCR konnte bei acht der neun PaBV-RT-PCR positiv getesteten ermittelt werden. Allerdings konnte bei Embryo EI 05, welcher einen PaBV-RNA Nachweis hatte, keine immunhistochemische Auswertung des Gehirns erfolgen, da sich im Anschnitt kein Gehirnmateriale fand. Bei Embryo EI 29 (Ct-

37,36) war der PaBV-Antigennachweis im Großhirn negativ, das Kleinhirn konnte nicht untersucht werden. Durch die Aufteilung der Organe, die bei Embryonen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch sehr klein waren, konnte nicht sichergestellt werden, dass für alle Untersuchungsmethoden ausreichend Gewebe vorhanden war. Somit zeigte sich bei zwei PaBV-RT-PCR positiven Embryonen, dass für den Nachweis von PaBV- Antigen kein Gehirn im Anschnitt zu finden war. Außerdem zeigte sich, dass der PaBV-Antigennachweis bei 21/32 Embryonen im Kleinhirn gelang, aber nur bei 12/32 Embryonen im Großhirn. Da bei diesem Versuch nicht darauf geachtet wurde, dass gleiche Anteile von Großhirn und Kleinhirn auf alle Methoden verteilt wurden, kann die deutlich geringere Nachweisrate von PaBV-RNA im Gehirn in der RT-PCR damit erklärt werden. Daher wurde Versuch 2 durchgeführt. In Versuch 2 wurde auf Grund der Probleme mit der Organgröße und der daraus resultierenden Ungenauigkeit der Untersuchungsergebnisse jeweils ein ganzer Embryo den einzelnen Untersuchungsmethoden zugeordnet. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Inokulationsrouten und Virusvarianten verglichen. Die Untersuchung des ganzen Embryos zeigte, dass nach Infektion mit PaBV-4 in den Dottersack bei acht von zehn der Nachweis von PaBV-RNA im Gehirn möglich war. Nach Applikation auf die Chorioallantoismembran mit PaBV-4 gelang der PaBV-RNA-Nachweis ebenso bei acht von zehn Embryonen im Gehirnmaterial. Bei PaBV-2 gelang der PaBV-RNA-Nachweis im Gehirn nach Dottersackinokulation zu 80 % und nach Applikation auf die Chorioallantoismembran zu 100 %. Auch beim PaBV-Antigennachweis zeigte sich in den Ergebnissen, dass die Sicherheit der Nachweisbarkeit deutlich mit der Menge des Organmaterials zusammenhing. So konnte bei allen untersuchten Embryonen außer einem (Embryo DAB_DO 10) PaBV-Antigen entweder im Kleinhirn oder im Großhirn oder in beiden Gehirnebenen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich bei den unterschiedlichen Inokulationsrouten kein statistisch signifikanter Unterschied. Insgesamt konnte in Versuch 2 bei 28/30 Embryonen PaBV-Antigen im Kleinhirn und bei 24/30 Embryonen im Großhirn nachgewiesen werden. Damit liegt der Nachweis von PaBV deutlich höher als in Versuch 1, was durch die Auswertung von mehr Organmaterial der ganzen Embryonen zu erklären ist. Diese Versuche zeigen deutlich, dass für den Nachweis von PaBV eine gewisse Menge an Probenmaterial vorhanden sein muss, um mit den beschriebenen Untersuchungsmethoden den sicheren Nachweis zu erbringen. Diese Ungenauigkeit in den Nachweismethoden kann sich auf das verwendete Probenmaterial und die Sensitivität der einzelnen

Nachweismethoden zurückführen lassen. Aus diesem Grund ist die Kombination von unterschiedlichen Nachweismethoden zu empfehlen.

5.2.1 Eignung der Nymphensittiche

Mit der Wahl, die Eier von Nymphensittichen für die Versuche einzusetzen, wurde erstmalig ein Modell für eine vertikale Übertragung bei Psittaziden verwendet. Innerhalb der Psittaziden wurde der Nymphensittich als Spender der Eier ausgewählt, da er sich durch mehrfache Gelege auszeichnet. Darüber hinaus lässt er sich einfach in Gruppen halten und lässt sich bei ausreichender Nistmöglichkeit nicht durch die Anwesenheit anderer Paare beeinflussen. In seiner Haltung ist der Nymphensittich recht anspruchslos und legt bei ausreichenden Ressourcen fast das ganze Jahr über Eier (Lantermann, 1999). Die Empfänglichkeit gegenüber PaBV konnte sowohl natürlich als auch durch Infektionsversuche nachgewiesen werden (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012; Rubbenstroth et al., 2014a). In Gießen wurde bereits ein reproduzierbares Infektionsmodell, mit den Virusvarianten die auch für diese Arbeit verwendet wurden, am Nymphensittich etabliert (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Somit kann auch eine Vergleichbarkeit der Empfänglichkeit für die verwendeten Virusvarianten hergestellt werden. Darüber hinaus zeigte der *in vitro* Versuch durch die erfolgreiche Anzucht von PaBV auf embryonalen Nymphensittichgehirnzellen (NEB), dass Nymphensittichembryonen empfänglich für PaBV sind. Somit eignet sich der Nymphensittich und seine Embryonen als Modelltier zur Untersuchung einer möglichen vertikalen Übertragung. Die Nymphensittiche, deren Eier für die Versuche verwendet wurden, stammen alle aus dem SPF-Bestand der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische. Dieser Bestand wird regelmäßig durch Kropf- und Kloakentupfer zur bakteriologischen und mykologischen Untersuchung sowie Kot zur parasitologischen Untersuchung auf Infektionskrankheiten untersucht. Darüber hinaus werden regelmäßig Untersuchungen auf Aviäres Polyomavirus, Psittazines Circovirus, *Psittacine 1 bornavirus* und Psittacines Herpesvirus sowie *Chlamydia psittacie* mittels RT-PCR und Serologie durchgeführt und verliefen bislang negativ. Somit konnte sichergestellt werden, dass alle folgenden Ergebnisse auswertbar sind.

5.2.2 Eignung der gewählten Isolate

In den Versuchen wurde ein PaBV-4-Isolat verwendet, welches aus einem an PDD erkrankten Hellroten Ara (*Ara macao*) isoliert wurde. Darüber hinaus wurde ein PaBV-2-Isolat eines an PDD erkrankten Nymphensittichs (*Nymphicus hollandicus*) verwendet. Beide Varianten wurden bereits erfolgreich in Infektionsversuchen eingesetzt und isoliert sowie mit den verwendeten Untersuchungsmethoden detektiert. Bei den Infektionsversuchen mit Nymphensittichen kam es zu einer 100 %igen Infektion der Versuchstiere nach intrazerebraler und intravenöser Inokulation der Isolate (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Durch die vorausgegangenen Versuche und etablierten Infektionsmodelle am Nymphensittich konnten die PaBV-Isolate gut auf ihre pathogenen Eigenschaften untersucht und beschrieben werden. Somit konnte auch das speziesfremde Isolat aus dem Ara für den Nymphensittich als pathogen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Virusreplikation der Isolate in CEC-32-Zellen durch Piepenbring et al. (2012 und 2016) sehr gut beschrieben. Durch die Verwendung derselben Isolate wie in den vorangegangenen Studien ergibt sich eine gute Vergleichbarkeit aller Versuche. Somit konnten die Ergebnisse dieser Versuche zur Untersuchung der Eigenschaften des PaBV-2 und PaBV-4 beitragen. Aber auch andere Arbeitsgruppen beschreiben die Empfänglichkeit von PaBV-4 für den Nymphensittich (Gancz et al., 2009; Rubbenstroth et al., 2014a). Aber nicht nur Nymphensittiche sind empfänglich für PaBV-4 und PaBV-2. In einer Studie von Papageien aus Europa konnte PaBV-4 und PaBV-2 bei natürlich infizierten Vögeln mit Symptomen einer PDD gefunden werden (Rinder et al., 2009). Auch weitere Studien zeigen, dass sich in Europa und Nordamerika bei Psittaziden am häufigsten PaBV-2 und PaBV-4 findet (Hoppes et al., 2010; Staeheli et al., 2010; Weissenbock, 2009). Eine weitere Studie untersuchte Psittaziden aus Brasilien. Bei 30 % der 86 untersuchten Tiere wurden im Probenmaterial PaBV-4-RNA oder PaBV-spezifische Antikörper festgestellt (Encinas-Nagel et al., 2014). Darüber hinaus konnte PaBV-4 erfolgreich in einem Infektionsversuch mit Graupapageien eingesetzt werden (Rinder et al., 2014). Somit kann die Infektion mit Isolat von PaBV-4 und PaBV-2 aus dem Modell der Infektion von Nymphensitticheiern später höchstwahrscheinlich auch auf andere Papageienspezies übertragen werden. PaBV-4 und PaBV-2 repräsentieren somit die besten Eigenschaften für die vorliegenden Versuche.

5.2.3 Inokulationsrouten von PaBV

Als Inokulationsrouten wurde in Anlehnung an Rott und Nitzschke die Applikation in den Dottersack und auf die Chorioallantoismembran gewählt (Nitzschke and Rott, 1957; Rott and Nitzschke, 1958). Für die Applikation auf die Chorioallantoismembran musste das Ei fünf bis sieben Tage vorbebrütet werden. Durch Schieren wurden die verschmolzenen Anteile von Chorion und Allantois aufgesucht. Die Verschmelzung erfolgt beim Nymphensittichei wie beim Hühnerei ungefähr zwischen dem fünften und siebten Tag (Freeman and Vince, 1974). Sie ist gekennzeichnet durch eine deutliche Absenkung der Luftblase und viele Blutgefäße. Die Dottersackinokulation kann hingegen direkt nach Feststellung der Befruchtung am dritten Tag erfolgen. Dies ergibt bei der Dottersackinokulation eine längere Verweildauer des PaBV im Ei, was für die Virusvermehrung von Vorteil sein könnte. Dies war zu Beginn der Versuchsplanung besonders wichtig, da die Infektionsversuche am Nymphensittich gezeigt hatten, dass erste Nachweise im Kropf- und Kloakentupfer von PaBV-RNA bei PaBV-4 am 19. Tag p.i. nach intrazerebraler Inokulation und 25 Tage p.i. nach intravenöser Inokulation zu finden waren (Piepenbring et al., 2012). Bei PaBV-2 konnten im Versuch nach intrazerebraler Inokulation PaBV-2-RNA in Kropf- und Kloakentupfer nach 27 Tagen p.i. und nach intravenöser Inokulation nach 43 Tagen p.i. nachgewiesen werden (Piepenbring et al., 2016). Dies ließ vermuten, dass das PaBV einige Zeit für die Infektion der Embryonen im Ei benötigt. Somit wurde für den ersten Versuch die Inokulation in den Dottersack gewählt um eine längere Vermehrungszeit für das PaBV zu gewährleisten. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass sofern die vertikale Übertragung eine Rolle spielt, das Virus über den Dotter übertragen wird, da sich PaBV-Antigen auch in Follikelzellen erkrankter Vögel (Raghav et al., 2010) und im Dotter (Delnatte et al., 2014) nachweisen lässt. Um die Unterschiede der Applikationsart zu beleuchten wurde in Versuch 2 auch die Applikation auf die Chorioallantoismembran durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit zeigen, dass unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen allerdings kein Unterschied zwischen den Applikationswegen festgestellt werden konnte. Die statistischen Berechnungen ergaben einen p -Wert von 1,0, dieser liegt über dem statistisch signifikanten Wert von 0,5 und ist damit als nicht signifikant anzusehen. Die genaue Applikation auf die Chorioallantoismembran stellte sich als nicht ganz einfach dar, wenn das Ei ohne größere Schäden belassen werden sollte. Für Anzuchtversu-

che auf der Chorioallantoismembran gibt es in der Forschung zwei Modelle. Bei dem ersten Modell verbleibt der Embryo im Ei. Die Schale wird gefensteret, nachdem circa 2-3 ml Eiklar abpunktiert wurde und die Chorioallantoismembran sich so von der Schale gelöst hat. Nun liegt die Chorioallantoismembran zur Beimpfung frei. Für die weitere Bebrütung muss das Fenster im Ei dann mit Folie abgedeckt werden. Eine zweite Möglichkeit ist die Inkubation des Embryo in einer Petri-Schale (Ribatti et al., 2004; Rowlett and Simkiss, 1987). Die Applikation von PaBV in der vorliegenden Studie erfolgte ohne Fensterung der Eischale durch Punktion unter Durchleuchtungskontrolle. Durch die schlechtere Sicht auf die Chorioallantoismembran kam es bei einigen Eiern zu leichten Blutungen, die von der Verletzung der Blutgefäße des Embryos mit der Nadel stammten. Jedoch entwickelten sich alle Embryonen normal. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Blutungen keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchung hatten. Bei der Inokulation von PaBV-2 starben zwei von zehn Embryonen an Tag 11 und 12 p.i. ab. Dabei scheinen die Inokulationsrouten keinen Einfluss zu haben. Embryo PaBV-2 04 wurde in den Dottersack und Embryo PaBV-2 07 auf die Chorioallantoismembran inokuliert. Für BoDV ist die Anzucht im Hühnerei nach Applikation auf die Chorioallantoismembran beschrieben. BoDV kann danach erfolgreich auf Kaninchen übertragen werden und dort zur Infektion führen (Nitzschke and Rott, 1957; Rott and Nitzschke, 1958). Bei der Inokulation von BoDV in Hühnerei wurde virushaltige Gewebesuspension auf das gesenkte Chorion eines Hühneris an Tag fünf der Bebrütung gegeben. Die Vermehrung des Virus gelang über vier Kaninchen-Ei-Wechselpassagen und anschließend über sechs Passagen im Ei (Nitzschke and Rott, 1957). In einer späteren Versuchsreihe konnten das so wechselpassagierte Virus der Bornaschen Krankheit nach erneuter 12-tägiger Bebrütung im Ei erfolgreich intrazerebral auf Kaninchen übertragen werden. In diesen Versuchsreihen konnte das Virus erfolgreich über zwölf Reihenpassagen angezüchtet werden. Die Infektiosität wurde anschließend durch intrazerebrale Rückimpfung auf das Kaninchen gesichert (Rott and Nitzschke, 1958). Anders als bei Rott und Nitzschke (1958), die bei ihren Versuchen keine Anzucht von BoDV nach Applikation in den Dottersack nachweisen konnten, wurde bei den hier durchgeführten Versuchen mit PaBV-2 und PaBV-4 kein Unterschied zur Applikation auf die Chorioallantoismembran festgestellt werden. Dies erklärt sich daraus, dass das BoDV nicht zu einer Infektion der Hühnerembryonen geführt hat, da diese für BoDV nicht empfänglich waren. Das Virus konnte sich lediglich auf der

Chorioallantoismembran wie auf einer Zellkultur vermehren. Es musste dadurch immer wieder passagiert werden. Die Embryonen der Nymphensittiche sind jedoch für PaBV empfänglich. Somit konnte sich PaBV im Nymphensittichembryo unabhängig von der Stelle der Applikation ausbreiten. Dies scheint ein erster Beleg zu sein, dass es nach vertikaler Virusübertragung über den Dotter zu einer validen Infektion des Embryos kommen könnte.

5.2.4 Nachweis von PaBV-RNA

In allen angeführten Versuchen konnte PaBV-RNA nur in den Gehirnproben der Embryonen detektiert werden. Alle weiteren untersuchten Organe wiesen keine PaBV-RNA auf. In Versuch 1 konnte bei neun von 32 infizierten Embryonen PaBV-RNA nachgewiesen werden, wohingegen in Versuch 2 bei allen Inokulationsrouten insgesamt für 25 von 30 Gehirnproben der PaBV-RNA Nachweis erfolgen konnte. In Versuch 2 konnte bei zwei von zehn Embryonen aus Gruppe 1 (Dottersackinokulation mit PaBV-4) und zwei von zehn aus Gruppe 2 (Chorioallantoismembraninokulation mit PaBV-4) keine PaBV-RNA nachgewiesen werden. Bei einem weiteren Embryo aus Gruppe 3 (Dottersackinokulation mit PaBV-2) konnte ebenfalls keine PaBV-RNA nachgewiesen werden. Hierbei muss diskutiert werden, ob in diesen Fällen die Infektion nicht angegangen ist. Zwei der fünf negativ auf PaBV-RNA getesteten Gehirnproben gehörten zu Eiern, bei denen während der Virusapplikation Blutungen auftraten. Möglicherweise hatte dies Auswirkungen auf die Infektion. Bei einem weiteren Ei mit Blutungen ließ sich aber immunhistochemisch PaBV-Antigen nachweisen. Bisher gibt es in der Literatur keine Untersuchungen zur Organverteilung von PaBV-RNA im Embryo. Bei einem Sonnensittich-Embryo in einer Studie konnte PaBV-RNA sowohl in Gehirn, Leber und Auge nachgewiesen werden, von einem zwei Wochen alten Küken desselben Paares wurde auch PaBV-RNA im Blut nachgewiesen (Kerski et al., 2012). Weitere Autoren beschreiben bei einer Untersuchung von 30 abgestorbenen Embryonen den Nachweis von PaBV-RNA bei zwei Embryonen, bei dieser Untersuchung wurden die Embryonen als Ganzes untersucht, somit liefert das Ergebnis keinen Hinweis auf die Verteilung der PaBV-RNA in den einzelnen Organen (Lierz et al., 2011). Eine weitere Arbeitsgruppe fand in Eiern und im Gehirn nicht geschlüpfter Embryonen von PaBV-positiven Elterntieren virusspezifische RNA (Monaco et al., 2012b). Wie in der Literatur beschrieben gelang der häufigste Nachweis von PaBV-RNA bei Embryonen aus

dem Gehirn. Nur Kerski et al. (2012) konnten PaBV-RNA auch in anderen Organen nachweisen. Diese Arbeitsgruppe untersuchte aber nicht nur Embryonen bis zum 17. Tag der Inkubation, sondern auch ältere Embryonen und Küken. Möglicherweise sind die Embryonen aus der vorliegenden Arbeit noch zu jung und die Virusausbreitung noch nicht abgeschlossen. Bei der Ratte ist eine Einwanderung über axonale Nerven und eine anschließende Besiedelung des Gehirnes beschrieben. Dabei persistiert das BoDV anschließend nur im ZNS (Carbone et al., 1987; Morales et al., 1988; Morales, 1988). Infiziert man hingegen neonatale Lewis-Ratten innerhalb von 24 Stunden nach Geburt intrazerebral, kommt es zu einer Virusverbreitung über das Gehirn in die Peripherie und damit zur Ausscheidung von infektiösem Virus (Morales et al., 1988; Sauder and Staeheli, 2003). Somit könnte bei den im Ei infizierten Küken zu einem späteren Zeitpunkt möglicherweise der PaBV-RNA-Nachweis auch aus anderen Organen gelingen. Dabei ist auch zu beachten, dass bei einer natürlichen vertikalen Übertragung das PaBV bereits vom ersten Tag an im Ei vorhanden wäre und somit länger Zeit hat den Embryo zu infizieren und sich auszubreiten. Die Eier in dieser Arbeit wurden frühestens am Tag drei mit PaBV inokuliert. Somit kann es bei dem späten Embryo aus der Studie von Kerski et al. (2012) schon zu einer Ausbreitung in andere Gewebe gekommen sein. Dass PaBV bei adulten Papageien nicht ausschließlich im Gehirn vorkommt, ist gut beschrieben. Die Literatur beschreibt einen weiten Verteilungsgrad in andere Organsysteme, besonders bei klinisch erkrankten Tieren (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012; Rinder et al., 2009). Dies zeigt, dass weitere Studien unter Versuchsbedingungen notwendig sind um die Verteilung von PaBV-RNA in Organen von Embryonen und geschlüpften Küken in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Infektion zu untersuchen.

5.2.5 Histopathologische Befunde

Die untersuchten Embryonen zeigten histologisch keine Auffälligkeiten. Sie waren weder in ihrer Entwicklung beeinträchtigt noch wiesen sie die für eine Infektion mit PaBV typischen entzündlichen Veränderungen auf. Die zwei abgestorbenen Embryonen aus der PaBV-2 Inokulation zeigten einen normalen Entwicklungsverlauf. Einige Embryonen wiesen eine Hepatolipidose auf. Eine Hepatolipidose kann zum Zeitpunkt des Schlupfes durch die beginnende Resorption des Dottersackes drei Tage vor Schlupf entstehen (Freeman and Vince, 1974). Da die Eier nur einmal am Tag zu unterschiedlichen Zeiten eingesammelt und dann zu unterschiedlichen Zeiten an

Tag 17 der Bebrütung (Tag 11-14 p.i.) untersucht wurden, konnte es zu zeitlichen Abweichungen von ungefähr zwölf Stunden kommen. Somit konnte bei einigen Embryonen schon die Dottersackresorption eingesetzt haben. Bei einigen Schnitten konnte in der Leber und Niere auch eine extramedulläre Hämatopoese festgestellt werden. Dies ist für Vogelembryonen physiologisch (Dantschakoff, 1908). Dass sich dies nicht in allen Schnitten nachvollziehen ließ, ist der Tatsache geschuldet, dass nicht immer ausreichend Blutzellen in den jeweiligen Gewebeschnitten vorhanden waren. Die Infektionen mit PaBV-4 und PaBV-2 führten bei adulten Nymphensittichen zu einer klinischen PDD. In diesen Infektionsversuchen am Nymphensittich konnte histologisch auch die für eine PDD typische nicht-eitrige Enzephalitis mit mononukleären Infiltraten im Gehirn sowie eine nicht-eitrige Ganglioneuritis mit lymphoplasmazytären Infiltraten im Gastrointestinaltrakt der Vögel gefunden werden (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Die Tatsache, dass sich im Gehirn der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Embryonen keine Hinweise auf die typische mononukleäre Infiltrate fanden, schließt eine Virusinfektion nicht aus. Da die Embryonen mit dem PaBV vor der Entwicklung des Immunsystems konfrontiert wurden, kann das Virus vom Immunsystem nicht als fremd erkannt werden. Somit sind auch keine entzündlichen Reaktionen zu erwarten. Die Entwicklung des Immunsystems beginnt beim Haushuhn um den achten Tag der Bebrütung (Dunon and Imhof, 1996; Masteller et al., 1997; Toivanen and Toivanen, 1987). Die Inokulation der Eier wurde in den Dottersack zwischen Tag drei und fünf und bei der Applikation auf die Chorioallantoismembran zwischen Tag fünf und sieben durchgeführt. Somit konnte eine Infektion und Virusvermehrung zwar stattgefunden haben, die auf einer Abwehrreaktion des Körpers basierenden histologischen Veränderungen aber nicht vorhanden sein. Vögel, die vor der Ausbildung des Immunsystems mit PaBV konfrontiert werden, könnten möglicherweise zu symptomfreien Virusträgern werden, da sie immuninkompetent infiziert wurden. Bei BoDV ist ein ähnliches Modell beschrieben. Infektionsversuche mit BoDV an athymischen Ratten, die ein stark eingeschränktes Immunsystem auf Grund eines Mangels an T-Lymphozyten hatten, zeigten, dass diese Ratten zwar hohe Titer von BoDV im zentralnervösen System aufwiesen, aber keine Krankheitssymptome oder histopathologische Veränderungen im Gehirn aufwiesen, wohingegen immunkompetente Ratten klinische Symptome entwickelten (Herzog et al., 1985). Das histologische Bild der hier untersuchten Nymphensittichembryonen könnte der erste Hinweis auf latent infizierte Virusträger

sein. Somit bliebe zu klären, wie sich die im Ei mit PaBV infizierten Embryonen nach dem Schlupf weiterentwickeln.

5.2.6 Immunhistochemische Befunde

Die immunhistochemischen Befunde zeigten, dass bei Versuch 1 und 2 PaBV-Antigen im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Der Antigennachweis konnte nur für das zentrale Nervensystem erbracht werden. In den anderen Organen der mit PaBV infizierten Embryonen konnte keine positive Farbreaktion beobachtet werden. Bei der experimentellen Infektion von adulten Nymphensittichen hingegen konnte PaBV-Antigen in fast allen Organen nachgewiesen werden (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Bei den hier untersuchten Embryonen wurde PaBV-Antigen nur im Kleinhirn und im Großhirn nachgewiesen. Durch den Nachweis von PaBV-Antigen im Gehirn konnte der Nachweis einer Virusvermehrung und Virusausbreitung vom Inokulationsort in das Gehirn des Embryonen erbracht werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PaBV-2 und PaBV-4 bei den Nymphensittichembryonen vor dem Schlupf einen deutlichen Neurotropismus aufwiesen. Bei Nagern ist dieser Neurotropismus gut beschrieben, dort kommt es bei adult infizierten Ratten zu einer BoDV Vermehrung nur in neuronalen Zellen (Narayan et al., 1983b). Nur bei immuninkompetenten Tieren kommt es zu einer Verbreitung von BoDV in andere Organe (Herzog et al., 1984). Nun steht zur Diskussion, ob bei Embryonen oder geschlüpften Küken möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt der Nachweis von PaBV-Antigen in anderen Organen möglich wäre. Zum Zeitpunkt der Untersuchung konnte PaBV-Antigen hauptsächlich im Markkörper des Kleinhirns dem *Corpus medullare cerebelli* nachgewiesen werden. Die Färbung erstreckte sich dort sowohl auf den Zellkern als auch auf das Perikayon, dem Rezeptorteil und Zentrum für Erhaltungs- und Funktionsstoffwechsel der Zelle. Des Weiteren konnte Antigen häufig in Zellen entlang des Ependyms gefunden werden. Ependymzellen kleiden die Hohlräume des zentralen Nervensystems aus und sind am Transport von Stoffwechselmetaboliten über den *Liquor cerebrospinalis* beteiligt. An ihrer Basis stehen die Ependymzellen mit Neuronen in Kontakt, sie bilden eine funktionelle Schranke zwischen den Hohlräumen des zentralen Nervensystems und den Neuronen (Liebich, 2010). Möglicherweise gibt die Anwesenheit des PaBV-Antigens an diesen Stellen Hinweise auf die Verteilung und Ausbreitung des Virus im ZNS. Der Liquor kann das PaBV möglicherweise an die Zielregionen transportieren.

Über diese Verbindung ist es auch möglich, dass das Virus zu einem späteren Zeitpunkt auch in die Peripherie gelangen kann. Einen weiteren Hinweis auf eine spätere mögliche Verbreitung des Virus über die Blut-Hirn-Schranke liefert die positive Antigenreaktion von Zellen im Großhirn. Dort befinden sich hauptsächlich Astrozyten, sie sind die größten Gliazellen des ZNS. Sie bilden zytoplasmatische Fortsätze, die in Verbindung mit Nervenzellen und den weichen Gehirnhäuten stehen. Sie transportieren Nährstoffe und stellen einen Teil der Blut-Hirnschranke dar (Liebich, 2010). Kerski et al. konnten bei einem Küken von PaBV-positiven Eltern, nach dem Schlupf PaBV-RNA im Blut finden. Für BoDV wurde allerdings gezeigt, dass ein Transport über Blut und Liquor nicht möglich ist. Hier breitet sich das Virus über die Nerven in die Organe aus (Morales, 1988). Bei BoDV ist auch die Verteilung von Virus im Gehirn für die Ratte genau untersucht. Das BoDV zeigt bei Lewis-Ratten in den ersten beiden Wochen nach experimenteller Infektion einen ausgeprägten Tropismus für Neuronen. Zu diesem Zeitpunkt sind nur wenige Astrozyten mit BoDV infiziert (Carbone et al., 1987; Herden et al., 2005; Richt et al., 1991). Erst in der späteren Infektionsphase sind dagegen im gesamten Gehirn verteilt auch mehr Astrozyten BoDV-positiv (Carbone et al., 1987; Ovanesov et al., 2008; Staeheli et al., 2001). Möglicherweise befinden sich die Embryonen der Nymphensittiche in der frühen Infektionsphase. Dies erklärt die starke positive Antigenreaktion im Kleinhirn und die etwas vereinzelter erscheinende Antigenreaktion im Großhirn. Des Weiteren wurde in einer Studie mit Astrozytenzellkulturen und BoDV gezeigt, dass im Zellkulturüberstand BoDV-infizierter Astrozyten am Tag 27 p.i. infektiöses Virus nachweisbar war. Dies zeigte, dass sich die BoDV-Infektion durch Kontakt zwischen benachbarten Zellen ausbreiten muss. Die Mechanismen für eine Übertragung von Zelle zu Zelle sind hierbei noch unbekannt. Als mögliche Mechanismen werden die Weitergabe über Zytoplasmabrücken, die Bildung lokaler Mikrofusionsporen oder eine lokale Abschnürung von Viren diskutiert (Kehr, 2016). Über diese Verbindung könnte auch PaBV von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. In der Immunhistochemie zeigten besonders die Zellen im Kerngebiet des Kleinhirns und entlang des Ependyms von Ventrikeln einen PaBV-Antigen Nachweis. In welchen Zelltypen sich aber nun PaBV-Antigen bei den Nymphensittichembryonen findet, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Neuronen und Gliazellmarker, die zu guten Ergebnissen bei adulten Nymphensittichen führten, konnten bei den Embryonen zu keinem Nachweis führen. Möglicherweise sind die Zellen noch so immatur, dass die Marker nicht binden konn-

ten. Alternativ kann es sich um einen Zelltyp handeln der hier in der Arbeit nicht untersucht wurde. Für Säugetiere ist beschrieben, dass die Ependymzellen einen teilungsaktiven Zelltyp bilden können der wiederum Neurone generieren kann. Die Ependymzellen wurden in dieser Studie als neuronale Stammzellen definiert (Johansson et al., 1999). Mit der gehäuften Lokalisation von PaBV-Antigen an der Basis der Ependymzellen könnte bei einer schnellen Zellteilung das Virus über diese Zellen im Gehirn verteilt werden. Bei der Durchsicht der Präparate entstand der Eindruck, dass der PaBV-Antigennachweis im Kleinhirn bei PaBV-2 deutlich stärker war als der von PaBV-4, dies ließ sich aber durch die unterschiedliche Probenanzahl nicht statistisch belegen. Möglicherweise führt die PaBV-Variante, die ursprünglich aus einem Nymphensittich stammt, zu stärkeren Reaktionen, da es eine speziesspezifisch bessere Empfänglichkeit ausnutzen kann. Auch bei den Infektionsversuchen mit Nymphensittichen zeigte sich, dass eine Infektion mit PaBV-2 zu einer deutlich stärkeren Krankheitssymptomatik führte als die Infektion mit PaBV-4. Allerdings zeigten im Gegensatz zu den Nymphensittichembryonen aus der vorliegenden Studie, die adulten Nymphensittiche aus dem Infektionsversuch mit PaBV-2 nur bei 14/18 PaBV-Antigen-Nachweis im Gehirn. Bei PaBV-4 konnte bei allen adulten Nymphensittichen PaBV-Antigen im Gehirn gefunden werden (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Darüber hinaus erklärt die Anhäufung von PaBV-Antigen im Kleinhirn der Embryonen viele klinische Symptome der Infektion mit PaBV. Die von Piepenbring et al. (2012 und 2016) beschriebenen neurologischen Symptome sprechen für pathologische Veränderungen im Kleinhirn. Die Nymphensittiche zeigten dort Ataxie und Tremor, welche in dieser Ausprägung meistens cerebellär bedingt sind (Bähr and Frotscher, 2014). Somit gibt die Antigenverteilung und Präferenz zu bestimmten Arealen im Gehirn auch einen Hinweis auf die Ausprägung der Symptomatik. Die Präferenz zu bestimmten Gehirnarealen ließ sich signifikant in Versuch 2 belegen. Der PaBV-Antigennachweis im Kleinhirn war signifikant höher als zentral im Großhirn ohne Ventrikelanschnitt. Das sich dies nur für die Gruppen 1, 2 und 3 berechnen ließ und nicht für Gruppe 4 lag an der zu kleinen Probenzahl der Gruppen 3 und 4. Durch die zum Teil großen Unterschiede in den Zahlen der Zählung der PaBV-Antigen-positiven Zellen lässt sich für die Gruppen 3 und 4 mit nur jeweils 5 Proben die statistische Verteilung nur bedingt berechnen. Aus diesem Grund wurde auch auf die Bildung eines Scores verzichtet, da dieser größere statistische Auswirkungen auf die Fehler in der Zählung haben würde. Mit den reellen

Zahlen als Grundlage für die Berechnung wurde der Fehler, der durch die Auszählung der Zellen im Mikroskop entstehen kann, für die statistische Berechnung minimiert, da auf Grund der Größe des Gehirns je Gehirnareal nur ein Sichtfeld gezählt wurde. Nimmt man nun alle Ergebnisse aus allen Gruppen zusammen, erhöht sich die statistische Aussagekraft. Somit kann sicher gesagt werden, dass der Antigenachweis signifikant häufiger im Kleinhirn und in Arealen mit Ventrikelanschnitt als im Großhirn zentral ohne Ventrikelanschnitt auftritt. Die Verteilung im Kleinhirn passt zu den in der Literatur beschriebenen Symptomen der Erkrankung durch PaBV. Wie die gehäufte Ansammlung in Arealen mit Ventrikelanschnitt zu beurteilen ist, und ob sie etwas mit der Ausbreitung des Virus in andere Organe zu tun hat, möglicherweise durch die Nähe zu den Ependymzellen, die auch als neuronale Stammzellen beschrieben werden können (Johansson et al., 1999), und ob es durch die hohe Teilungsrate in diesem Gehirnbereich zu einer schnellen Ausbreitung des PaBV führen könnte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Hierfür müssen weitere Studien durchgeführt werden.

5.2.7 Virus-Isolierung

Um infektiöses PaBV nachzuweisen, wurden Gehirn, Organe und Dottersack der infizierten Embryonen zur Virus-Isolierung auf Zellkultur gebracht. Hierfür wurden die Organsuspensionen auf CEC-23-Wachtelfibroblastenzellen, embryonalen Nymphensittichgehirnzellen (NEB) und embryonalen Nymphensittichfibroblastenzellen (NEF) verimpft. In allen Versuchsgruppen konnte jedoch auf allen Zellkulturen kein infektiöses Virus isoliert werden. Diese Ergebnisse können hinweisend sein, dass es zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits kein infektiöses Virus mehr in den Embryonen gab und die Infektion abortiv verlief. Ein weiterer Grund könnte die kurze Untersuchungszeitspanne sein. Die Eier wurden nach Infektion nur maximal 14 Tage bebrütet und dann untersucht. Bei BoDV wird vermutet, dass das Virus sich nur über Zell-Zell-Kontakt weiter ausbreiten kann (Kehr, 2016). Diese Ausbreitung erfolgt nur sehr langsam. Somit ist es möglich, dass zum Untersuchungszeitpunkt noch zu wenig PaBV für die Infektion von Zellkulturen vorhanden war. Auch nach Passagierung der mit Organmaterial der Embryonen inokulierten CEC-32-Zellkulturen konnte kein Virus isoliert werden. Auch bei den Versuchen mit Nymphensittichen von Piepenbring et al. (2016) konnte die Virusanzucht von PaBV-2 erst sicher nach 75 Tagen *post infectionem* nachgewiesen werden. Alle Proben, die

zuvor genommen wurden, mussten in der Zellkultur mehrfach passagiert werden um eine Virusisolation zu ermöglichen. Darüber hinaus zeigten die besonders im Versuch 1 hohen Ct-Werte der RT-PCR (zwischen 26,48 und 37,36), dass nur recht wenig Virusmaterial im untersuchten Gehirnmateriale vorliegt. Somit ist es möglich, dass zwar infektiöses Virus in den Proben vorhanden war, es aber unterhalb der Nachweisgrenze lag. Ähnliches zeigte sich auch im Versuch von Piepenbring et al. (2016), dort zeigte sich eine direkte Korrelation von Virus-Isolierung und PaBV-RNA Nachweis. Je niedriger der Ct-Wert war, umso besser konnte die Virus-Isolierung erfolgen. Die Ergebnisse aus den hier vorliegenden Versuchen decken sich jedoch mit der bestehenden Literatur, dass bisher nur PaBV-RNA oder PaBV-Antigen im Ei oder Embryo nachgewiesen werden konnte, aber nie infektiöses Virus (Lierz et al., 2011). Bei einer Untersuchung von befruchteten Eiern von vier natürlich infizierten Sonnensittichpaaren konnte in den Embryonen PaBV spezifische RNA nachgewiesen werden, zusätzlich wurde bei diesen Küken im Blut und Dotter Antikörper für PaBV nachgewiesen (Kerski et al., 2012). In einer weiteren Untersuchung wurde in Eiern und im Gehirn nicht geschlüpfter Embryonen von PaBV-positiven Elterntieren virusspezifische RNA gefunden. Auch in dieser Studie konnte kein Nachweis von infektiösem Virus erfolgen (Monaco et al., 2012b). Im Dotter eines unbefruchteten Eis freilebender Kanadagänse wurde ebenfalls nur virusspezifische RNA gefunden (Delnatte et al., 2014). Auch bei Kanarienvögeln konnte gezeigt werden, dass in den Embryonen CnBV-positiver Kanarienvogelelterntiere virusspezifische RNA nachgewiesen werden kann (Rubbenstroth et al., 2013). Wie in den Studien zuvor wurde auch hier kein infektiöses Virus nachgewiesen. Somit ist die vermutete langsame Vermehrung von PaBV im Embryo eine mögliche Ursache für die bisher ausbleibende Virusisolation. Allerdings müssen weitere Studien folgen, die klären, ob mit dem Schlupf der Küken und der damit verbundenen längeren Verweilzeit von PaBV zu einem späteren Zeitpunkt die Virus-Isolierung möglich ist. Dies ist von großer Bedeutung um eine mögliche vertikale Übertragung zu belegen.

5.3 Untersuchung von Eiern natürlich infizierter *Pyrrhura spp.*

Die *Pyrrhura*, deren Eier für den Versuch genutzt wurden, stammen alle aus einem privaten Bestand, der seit Jahren von der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische betreut wird. Sie werden getrennt von anderen Vogelspezies in einer Voliere mit Zugang zu einer Außenvoliere gehalten. An dem Standort der Voliere befinden

sich nur PaBV-positive Papageien. Der Bestand wird regelmäßig medizinisch betreut und auf andere Infektionskrankheiten untersucht. Der Besitzer ergreift darüber hinaus Maßnahmen zur Schadnagerbekämpfung. Alle Volieren sind durch Bodengitter vor dem Eindringen von Schädlingen gesichert. Alle *Pyrrhura* sind stark positiv in der PaBV-RT-PCR mit Ct-Werten zwischen 16,36 und 26,78. Zusätzlich haben alle Vögel hohe Antikörpertiter gegen PaBV (zwischen 1:5 000 und 1: 80 000). Somit schienen ihre Eier sehr gut für diese Studie geeignet. Die Vögel legten im Untersuchungszeitraum nur elf Eier. Alle Eier waren unbefruchtet. Möglicherweise sind die *Pyrrhuras* durch ihre Infektion mit PaBV unfruchtbar, ähnlich den Lewis-Ratten aus einem Versuch (Herden et al., 2000). Dies lässt sich allerdings nicht sicher bestätigen, da viele weitere Faktoren Einfluss auf die Eiablage und Befruchtungsrate haben können. Die unterschiedlichen *Pyrrhura*-Spezies wurden alle in einer Voliere zusammen gehalten. Zwar standen genügend Nistmöglichkeiten zur Verfügung, aber *Pyrrhuras* sind sehr anspruchsvoll in ihrer Haltung. Somit ist es in Menschenobhut möglich, dass es bei Kontakt zu anderen Paaren zu Störungen in der Eiablage kommen kann (Arndt, 1983). Darüber hinaus war die Qualität der Eischalen aller Eier sehr schlecht. Die Kalzifizierung der Schale war deutlich herabgesetzt und zwei Eier zeigten Risse. Dies kann in Zusammenhang mit einer bereits klinischen PDD stehen. Bei einer PDD kann Nahrung nicht mehr gut aufgeschlossen werden und es kommt zu einer Vitamin- und Mineralstoffunterversorgung (Ridgway and Gallerstein, 1983; Vice, 1992; Woerpel et al., 1984). Allerdings zeigte keiner der *Pyrrhuras* im Untersuchungszeitraum klinisch sichtbare Symptome einer PDD. Auch die Fütterung der *Pyrrhuras* war ausgewogen mit Sämereien, Pellets und Frischfutter. Ob es trotzdem zu einem Vitamin- und Mineralstoffmangel durch die Infektion mit PaBV oder durch verschiedene Umweltfaktoren, wie ungünstige Gruppenzusammensetzung, gekommen war, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Bei der Untersuchung der *Pyrrhura*-Eier konnte keine PaBV-RNA nachgewiesen werden. Auch in den Embryonen aus dem Infektionsversuch von Piepenbring et al. 2016 konnte keine PaBV-RNA nachgewiesen werden. Somit konnte in den vorliegenden Untersuchungen von Eiern natürlich infizierter *Pyrrhuras* und experimentell infizierter Nymphensittiche kein Hinweis auf eine vertikale Übertragung gefunden werden. Alle Eier der *Pyrrhuras* waren unbefruchtet. In der Literatur ist nur ein einziger Nachweis von PaBV-RNA im unbefruchteten Ei beschrieben. Nur Delnatte et al.

(2014) fanden in einem unbefruchteten Ei von Kanadagänsen virusspezifische RNA im Dotter. Alle anderen Arbeitsgruppen konnten RNA nur im embryonierten Ei oder im Embryo selbst nachweisen. In allen Embryonen von Sonnensittichen wurde zu Beginn der Entwicklung PaBV spezifische RNA nachgewiesen (Kerski et al., 2012). Eine weitere Studie fand in Eiern und im Gehirn nicht geschlüpfter Embryonen von PaBV-positiven Elterntieren PaBV-RNA (Monaco et al., 2012b). In der Studie von Rubbenstroth et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass nur in den Embryonen von CnBV-positiven Kanarienvögeln virusspezifische RNA nachgewiesen werden konnte. Auch Lierz et al. (2011) beschreiben bei einer Untersuchung von 30 abgestorbenen Embryonen den Nachweis von virusspezifischer RNA nur im Embryo (Lierz et al., 2011). Somit ist es wahrscheinlich, dass sich bei einer möglichen vertikalen Übertragung über die Follikelzelle der Henne PaBV im unbefruchteten Ei nicht weiterentwickeln kann. Dies könnte mit der Änderung des pH-Wertes im unbefruchteten Ei zusammenhängen. Während der Inkubation steigt der pH-Wert des Eiweißes (im Hühnerei) von anfänglich pH 7,6 bis 7,9 auf über pH 9,7. Der pH-Wert des Dotters erhöht sich von 6,0 auf ungefähr 6,8 (Belitz and Grosch, 1992). Während der pH-Wert im Eigelb unbefruchteter Eier innerhalb einer Bebrütungsphase von acht Tagen im schwach sauren Bereich bleibt (6,04 bis 6,20), steigt der pH-Wert der befruchteten Eier schon nach zwei bis drei Tagen in Richtung des neutralen Bereichs von 6,07 bis 6,92 an (Lilienthal, 2014). Somit ist es möglich, dass bei frischen unbefruchteten Eiern nach Übertragung von PaBV über die Henne in das Ei noch RNA nachgewiesen werden kann. Je länger das unbefruchtete Ei aber inkubiert wird, umso länger ist PaBV keinen optimalen Bedingungen ausgesetzt. Für aviäre Bornaviren gibt es in der Literatur keine Untersuchungen zur pH-Empfindlichkeit. Für BoDV konnte hingegen gezeigt werden, dass bei einem Ausgangswert von 10^{-5} bei pH 3-5 eine deutlich Virusreduktion auf 10^{-3} bereits nach 30 Minuten auf Eis erfolgt (Herzog, persönliche Mitteilung). Dies legt nahe, dass nach längerem Einfluss eines sauren pH das Virus neutralisiert wird. Die Eier der *Pyrrhuras* wurden fünf Tage inkubiert und täglich geschickt, um eine Befruchtung sicher auszuschließen. Somit ist es möglich, dass eventuell vorhandene RNA durch die Inkubation inaktiviert wurde.

5.4 Übergreifende Betrachtung und Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer möglichen vertikalen Übertragung von PaBV bei Papageien. Hierfür wurde zuerst ein *in vivo* Modell aus embryonalen Zell-

kulturen erstellt. Die Replikation der PaBV-Isolate 4 und 2 in NEB-Zellen gaben erste Hinweise auf die Infizierbarkeit von Nymphensittichembryonen. Das Isolat Ps39 (PaBV-2) zeigte nach Verimpfung auf NEB Zellen ähnliche Vermehrungseigenschaften wie PaBV-4. Dagegen vermehrte sich PaBV-2 auf CEC-32-Zellen deutlich langsamer als PaBV-4 (Piepenbring, 2017). Bei dieser Untersuchung konnte auch gezeigt werden, dass PaBV einen deutlichen Tropismus zu den Gehirnzellen aufwies, da sich beide Virusvarianten nicht auf den embryonalen Nymphensittichfibroblastenzellen (NEF) anzüchten ließen. Darüber hinaus konnten in den NEB-Zellkulturen besondere Zellen beobachtet werden. Diese Zellen mit multiplen Zellkernen und zweiphasigem Zytoplasma mit Ausbuchtungen ließen sich gut mit PaBV infizieren. Diese Ergebnisse spiegeln sich in den folgenden Eiinfektionsversuchen wider. Auch hier konnte nach Inokulation von PaBV-4 und PaBV-2 in den Dottersack oder auf die Chorioallantoismembran PaBV-RNA und PaBV-Antigen nur im Gehirn nachgewiesen werden. Dabei konnte nach statistischer Berechnung kein Unterschied zwischen den verwendeten Virusisolaten und der Inokulationsroute gefunden werden. Bei der Auswertung der Immunhistochemie konnte erstmalig der Antigennachweis auf bestimmte Areale im Gehirn eingegrenzt werden. Im Kleinhirn wurde PaBV-Antigen hauptsächlich in den Kerngebieten des *Arbor vitae* gefunden. Im Großhirn dagegen vermehrt an der Basis von Ependymzellen und nur vereinzelt in Zentrum. Um die Zelltypen der PaBV-Antigen-positiven Zellen zu bestimmen wurden Färbungen mit Zellmarkern vom Säugetier durchgeführt, die für adulte Nymphensittiche schon zu erfolgreicher Zellbestimmung geführt hatten. Bei den embryonalen Zellen konnte durch diese Marker keine Zuordnung zu einem Zelltyp erfolgen. Ob diese Zellen ähnlich zu den in den NEB und NEF Zellkulturen gefundenen speziellen Zellen sind, konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um undifferenzierte Zellen oder Stammzellen. Hierfür müssen weitere Untersuchungen zur Klassifizierung der Zellen durchgeführt werden. Darüber hinaus konnte nicht abschließend geklärt werden, ob PaBV bei Infektion über das Ei im Gehirn der Embryonen persistiert, oder sich später auch auf andere Organe ausbreitet, wie es für die Infektion am adulten Nymphensittich beschrieben ist (Piepenbring et al., 2016; Piepenbring et al., 2012). Keski et al. 2012 beschreiben bei der Untersuchung von Embryonen natürlich infizierter Sonnensittiche, dass zu Beginn der Bebrütung PaBV-RNA nur im Gehirn festgestellt werden kann. Später wurde auch in anderen Organen und bei einem geschlüpften Küken auch im Blut PaBV-RNA nachge-

wiesen. Ob die in der vorliegenden Studie untersuchten Embryonen später zu latent infizierten Trägern werden, oder doch nach Schlupf Krankheitssymptome zeigen würden, konnte nicht abschließend geklärt werden. Hierfür müssen Folgeprojekte durchgeführt werden, bei denen die Küken aus den infizierten Eiern schlüpfen müssen. Diese können dann in Hinblick auf Virusverteilung, Ausscheidung, Antikörperbildung und klinische Symptome untersucht werden. Wie auch in der Literatur beschrieben, (Kerski et al., 2012; Lierz et al., 2011; Monaco et al., 2012b; Rubbenstroth et al., 2013) konnte in der vorliegenden Arbeit kein Virus aus den Embryonen isoliert werden. Eine Theorie ist die zu geringe Virusmenge durch die langsame Ausbreitung von PaBV von Zelle zu Zelle wie sie für BoDV beschrieben ist (Kehr, 2016). Eine weitere Studie von mit PaBV infizierten Embryonen, die unter experimentellen Bedingungen schlüpfen und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden, könnte diese Theorie untersuchen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Nachweis von PaBV-RNA und von PaBV-Antigenen erstmalig unter Versuchsbedingungen nach Inokulation von PaBV in Nymphensitticheier erfolgreich war. Darüber hinaus waren alle Eier der Mock-Kontrollen in allen Nachweismethoden negativ, was den Erfolg der Versuche untermauert. Dies zeigt erstmalig, dass eine vertikale Übertragung über das Ei grundsätzlich möglich scheint, wenn PaBV-RNA auf natürlichem Weg ins Ei gelangen kann. Hinweise hierfür gibt der Nachweis von PaBV-RNA in Follikelzellen (Raghav et al., 2010). Weitere Versuche könnten zum Verständnis der Infektion und der Epidemiologie von PaBV beitragen und möglicherweise das Virusreservoir identifizieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Seit 2008 ist das *Psittaciform 1 bornavirus* als Ursache für einen oft tödlich verlaufenden Symptomkomplex mit gastrointestinalen und neurologischen Symptomen beschrieben (Honkavuori et al., 2008; Kistler et al., 2008). Um die Ausbreitung der Erkrankung zu verhindern, ist die Kenntnis der Übertragungswege unerlässlich. Insbesondere die Klärung einer vertikalen Übertragung ist sehr relevant für Zuchtprogramme im Artenschutz.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur vertikalen Übertragung des PaBV bei Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) durchgeführt. Um die Infizierbarkeit von embryonalen Nymphensittichzellen zu überprüfen, wurden *in vitro* embryonale Nymphensittichgehirnzellkulturen (NEB) und embryonale Nymphensittichfibroblastenzellkulturen (NEF) von zehn Tage alten Nymphensittichembryonen hergestellt und mit PaBV-4 (Ps34) oder PaBV-2 (Ps39) beimpft und die Wachstumseigenschaften zu untersuchen. Beide Varianten ließen sich auf den NEB- nicht aber auf den NEF-Zellen vermehren. PaBV-2 zeigte hier ein deutlich besseres Wachstum im Vergleich zu CEC-32-Zellen aus Vorversuchen.

In einem Vorversuch wurde 3 %iges Wasserstoffperoxid als ein geeignetes Desinfektionsmittel gegen PaBV auf der Eischale bestimmt.

In Versuch 1 wurden 32 befruchtete Eier zwischen dem dritten und fünften Bebrütungstag mit PaBV-4 in den Dottersack inokuliert und bis zum Tag 12-14 p.i. bebrütet. Die Organe jedes Embryos wurden anschließend mittels RT-PCR, Histologie, Immunhistochemie und Virus-Isolierung untersucht. Neun Embryonen wiesen PaBV-4 RNA im Gehirn auf. Bei 26/32 konnte PaBV-Antigen im Gehirn nachgewiesen werden. Keiner der Embryonen zeigte pathologische Veränderungen in der Histologie. Eine Virusisolierung gelang nicht.

Anschließend wurden Embryonen an Tag drei bis fünf der Bebrütung in den Dottersack (Gruppe 1: n = 25 + 2-Mock-Kontrollen, mit PaBV-4; Gruppe 3: n = 15 + 2-Mock-Kontrollen, mit PaBV-2) beziehungsweise am Tag fünf bis sieben auf die Chorioallantoismembran (Gruppe 2: n = 25 + 2-Mock-Kontrollen, PaBV-4; Gruppe 4: n = 15 + 2-Mock-Kontrollen, mit PaBV-2) inokuliert. In Gruppe 1 und 2 wurden jeweils zehn und in Gruppe 3 und 4 jeweils fünf inokulierte Embryonen und eine Mock-

Kontrolle mittels RT-PCR untersucht. Zehn (Gruppe 1 und 2), beziehungsweise fünf (Gruppe 3 und 4) weitere Embryonen je Gruppe wurden histologisch und immunhistochemisch untersucht. Jeweils fünf Embryonen aus allen Gruppen sowie jeweils eine Mock-Kontrolle wurden für die Virus-Isolierung verwendet.

Bei acht der zehn infizierten Embryonen (Gruppe 1), 8/10 der Gruppe 2, 4/5 der Gruppe 3 und 5/5 der Gruppe 4 konnte PaBV-RNA im Gehirn nachgewiesen werden. 9/10 Embryonen der Gruppe 1, 10/10 der Gruppe 2, 5/5 der Gruppe 3 und 5/5 der Gruppe 4 wiesen PaBV-Antigen im Gehirn nicht jedoch in den Organen auf. Alle Kontrollen waren negativ.

In allen Gruppen war eine präferierte Verteilung von PaBV-Antigen im Kleinhirn (*Arbor vitae*) und Gehirnarealen mit Ventrikelschnitt, gegenüber dem Großhirn zentral ohne Ventrikelschnitt zu sehen. Eine genaue Differenzierung der infizierten Zellen mittels verschiedenen Zellmarkern gelang bislang nicht.

Histologisch konnten in keinem Embryo pathologische Veränderungen gefunden werden. Aus keinem der inokulierten Embryonen und aus den Kontrolltieren gelang eine PaBV-Isolierung.

Die Untersuchung von Eiern von natürlich PaBV infizierten *Pyrrhura spp.* verlief negativ.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine vertikale Übertragung von PaBV grundsätzlich möglich scheint, wenn PaBV-RNA auf natürlichem Weg ins Ei gelangt. Anhand eines kontrollierten Infektionsversuchs wurde erstmalig gezeigt, dass PaBV nur im Gehirn der Embryos vorkommt.

Die fehlende Pathologie in der Histologie deutet auf die Möglichkeit latent infizierter Träger oder einen abortivem Infektionsverlauf hin, welches durch weitere Untersuchungen geklärt werden muss.

7 SUMMARY

In 2008 the *Psittaciform 1 bornavirus* has been described to be the cause for an often fatal disease with gastrointestinal and neurological symptoms (Honkavuori et al., 2008; Kistler et al., 2008). To stop the disease from spreading, it is crucial to know its transmission routes. For breeding programs and species conservation it is particularly important to know if vertical transmission occurs.

In this work vertical transmission of PaBV was investigated in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). To examine possible infectivity of embryonic cockatiel cells, *in vitro* embryonic cockatiel brain-cell cultures (NEB) and embryonic cockatiel fibroblast cell culture (NEF) of 10 days old cockatiel-embryos were established. These cells were inoculated with PaBV-4 (Ps34) or PaBV-2 (Ps39). Both PaBV-isolates were propagated on NEB but not on NEF cells. In contrast to the results of previous studies, PaBV-2 showed a significantly larger growth in comparison to the CEC-32 cells.

In a preliminary test a 3% hydrogen peroxide was determined as an appropriate disinfectant for the egg shell against PaBV.

In study one 32 fertilized eggs were inoculated with PaBV-4 into the yolk sac between the third and the fifth day of incubation and incubated until days 12-14 p.i.. The organs of the embryos were examined with RT-PCR, histology, immunohistochemistry and virus-isolation. Nine embryos demonstrated PaBV-4 RNA and 26/32 PaBV-antigen in the brain. None of the embryos showed pathological signs in the histology. Virus-isolation was not possible.

Subsequently embryos were inoculated in the yolk sac (group 1: n = 25 + 2-Mock-controls, with PaBV-4; group 3: n = 15 + 2-Mock-controls, with PaBV-2) on day three to five and on the chorioallantoic membrane (group 2: n = 25 + 2-Mock-controls, with PaBV-4; group 4: n = 15 + 2-Mock-controls, with PaBV-2) on day five to seven of incubation. In each of group 1 and 2, ten and in group 3 and 4 five inoculated embryos and one control were examined through RT-PCR. Furthermore ten embryos each (group 1 and 2) and five embryos each (group 3 and 4) were histologically and immunohistochemically examined. Of each of the four groups five embryos as well as one Mock-control were used for virus-isolation.

In eight out of ten infected embryos (group 1), 8/10 of group 2, 4/4 of group 3 and 5/5 of group 4 PaBV-RNA was detected in the brain. 9/10 infected embryos of group 1,

10/10 of group 2, 5/5 of group 3 and 5/5 of group 4 showed PaBV-antigen in the brain but not in the organs. All controls remained negative.

All groups showed a preferred allocation of PaBV-antigen in the cerebellum (*Arbor vitae*) and in brain areas with ventricles in comparison to the central large cerebrum without ventricles. So far, there was no success in differentiating the infected cells with various cell markers.

There were no pathological alterations of any embryo in the histological examination. It was not possible to isolate PaBV from any of the inoculated embryos nor of the control group.

The examination of eggs of *Pyrrhua spp.*, which were naturally infected with PaBV, remained negative.

The results of these studies underline, that vertical transmission may be possible if PaBV-RNA can naturally be transferred into the egg. In the present study it was demonstrated for the first time, that PaBV is only found in the brain of the infected embryos.

The absence of histopathological alterations in the infected embryos can be interpreted as the possibility of latent infected birds or maybe the virus infection was abortive. Further investigations into these questions are recommended.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Afonso, C.L., Amarasinghe, G.K., Bányai, K., Bào, Y., Basler, C.F., Bavari, S., Bejerman, N., Blasdell, K.R., Briand, F.-X., Briese, T., 2016, Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of virology*, 1-10.
- Altmann, D., Kronberger, H., Schüppel, K., Lippmann, R., Altmann, I., 1976. Bornasche Krankheit (Meningo-Encephalomyelitis simplex enzootica equorum) bei Neuwelttylopoden und Equiden. In: *Verh. bericht XIII Int. Symp. Erkrankg Zootiere (R. Ippen & H.-D. Schröder, eds)*, pp. 16-20.
- Arndt, T., 1983, Südamerikanische Sittiche. Band 4: Rotschwanzsittich – *Pyrrhura*. Müller, Bomlitz, ISBN 3-923269-07-2.
- Autenrieth, C.F., 1823, Ueber die hitzige Kopfkrankheit der Pferde: auf Verlangen des Münsinger-Vereins zur Beförderung der Pferdezucht auf der Alp, und zunächst für diese Gegend. Heinrich Laupp.
- Bähr, M., Frotscher, M., 2014, Neurologisch-topische Diagnostik: Anatomie - Funktion - Klinik Thieme; Auflage: 10 ISBN-13: 978-3135358109.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., 1992, Eier, In: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, pp. 494-506.
- Berg, M., Johansson, M., Montell, H., Berg, A.-L., 2001, Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiology and infection* 127, 173-178.
- Bode, L., Durrwald, R., Ludwig, H., 1994, Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Veterinary Record* 135, 283-284.
- Bourg, M., Herzog, S., Encarnação, J.A., Nobach, D., Lange-Herbst, H., Eickmann, M., Herden, C., 2013, Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis* 19, 2064-2066.
- Boutette, J.B., Taylor, M., 2004. Proventricular Dilatation Disease: A Review of Research, Literature, Species Differences, Diagnostics, Prognosis, and Treatment. In: *Conference of the Association of Avian Veterinarians*, New Orleans, Louisiana, USA, pp. 175-181.
- Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A.J., Park, Y.S., Kim, S., Ludwig, H., Lipkin, W.I., 1994, Genomic organization of Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4362-4366.
- Busche, R., K., F., Weingarten, M., 1985. Zur Pathologie des Macaw Wasting-Syndrom. In: *Verhandlungsbericht 27. Symposium über Erkrankungen der Zootiere*, St. Vincent/Toronto, pp. 325-329.
- Caplazi, P., Waldvogel, A., Stitz, L., Braun, U., Ehrensperger, F., 1994, Borna disease in naturally infected cattle. *Journal of comparative pathology* 111, 65-72.
- Carbone, K., Duchala, C., Griffin, J., Kincaid, A., Narayan, O., 1987, Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *Journal of Virology* 61, 3431-3440.
- Carbone, K., Trapp, B., Griffin, J., Duchala, C., Narayan, O., 1989, Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 48, 631-644.
- Clark, F.D., 1984, Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. *Avian Diseases*, 813-815.
- Cubitt, B., Oldstone, C., de la Torre, J.C., 1994, Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J. Virol.* 68, 1382-1396.

- Dahlhausen, B., Aldred, S., Colaizzi, E., 2002. Resolution of Clinical Proventricular Dilatation Disease by Cyclooxygenase 2 Inhibition. In: 23rd Conference of the Association of Avian Veterinarians, Monterey, California, USA, pp. 9-12.
- Danner, K., Mayr, A., 1973, Fluoreszenzserologische Untersuchungen über das Auftreten von Borna-Virusantigenen in Zellkulturen aus Gehirnexplantaten infizierter Kaninchen. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 20, 497-508.
- Dantschakoff, W., 1908, Untersuchungen über die Entwicklung des Blutes und Bindegewebes bei den Vögeln: Die erste Entstehung der Blutzellen beim Hühnerembryo u. der Dottersack als blutbildendes Organ. JF Bergmann.
- de Kloet, A.H., Kerski, A., de Kloet, S.R., 2011, Diagnosis of Avian bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami. J. Vet. Diagn. Invest. 23, 421-429.
- De Kloet, S.R., Dorrestein, G.M., 2009, Presence of Avian Bornavirus RNA and Anti-Avian Bornavirus Antibodies in Apparently Healthy Macaws. Avian Diseases 53, 568-573.
- de la Torre, J.C., 1994, Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. Journal of Virology 68, 7669-7675.
- Delnatte, P., Berkvens, C., Kummrow, M., Smith, D.A., Campbell, D., Crawshaw, G., Ojkic, D., DeLay, J., 2011, New genotype of avian bornavirus in wild geese and trumpeter swans in Canada. Vet Rec 169, 108.
- Delnatte, P., Nagy, É., Ojkic, D., Crawshaw, G., Smith, D.A., 2014, Investigation into the possibility of vertical transmission of avian bornavirus in free-ranging Canada geese (*Branta canadensis*). Avian Pathology 43, 301-304.
- Delnatte, P., Ojkic, D., DeLay, J., Campbell, D., Crawshaw, G., Smith, D.A., 2013, Pathology and diagnosis of avian bornavirus infection in wild Canada geese (*Branta canadensis*), trumpeter swans (*Cygnus buccinator*) and mute swans (*Cygnus olor*) in Canada: a retrospective study. Avian Pathology 42, 114-128.
- Doneley, R.J.T., Miller, R.I., Fanning, T.E., 2007, Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. Australian Veterinary Journal 85, 119-123.
- Donner, E., 1998, Epizootiologische und labordiagnostische Untersuchungen zur Ausscheidung des Virus der Bornaschen Krankheit und zur Antikörperkinetik bei Pferden aus Beständen mit Infektion. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Doolen, M., 1994. Crop biopsy - A Low Risk Diagnosis for Neuropathic Gastric Dilatation. In: Conference of the Association of Avian Veterinarians, Reno, Nevada, USA, pp. 193-196.
- Dunon, D., Imhof, B., 1996, T cell migration during ontogeny and T cell repertoire generation, In: Immunology and Developmental Biology of the Chicken. Springer, pp. 79-93.
- Dürwald, R., Kolodziejek, J., Herzog, S., Nowotny, N., 2007, Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. Reviews in Medical Virology 17, 181-203.
- Dürwald, R., Kolodziejek, J., Muluneh, A., Herzog, S., Nowotny, N., 2006, Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date

- unknown endemic reservoir host populations. *Microbes and Infection* 8, 917-929.
- Dürwald, R., Kolodziejek, J., Weissenböck, H., Nowotny, N., 2014, The bicolored white-toothed shrew *Crocidura leucodon* (HERMANN 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *Plos One* 9.
- Dürwald, R., Ludwig, H., 1997, Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 44, 147-184.
- Encinas-Nagel, N., Enderlein, D., Piepenbring, A., Herden, C., Heffels-Redmann, U., Felipe, P.A., Arns, C., Hafez, H.M., Lierz, M., 2014, Avian Bornavirus in free-ranging psittacine birds, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 20, 2103.
- Enderlein, D., Herzog, S., Herden, C., Neumann, D., Briese, T., Kaleta, E.F., Lierz, M., Heffels-Redmann, U., Müller, H., 2009. Antikörper- und Genomnachweis in PDD-positiven Vögeln. In: 1.DVG-Tagung über Vogel- und Reptilienkrankheiten, Leipzig, Germany, pp. 18-20.
- Freeman, B.M., Vince, M.A., 1974, Development of the avian embryo. A behavioural and physiological study. Chapman and Hall.
- Galiberti, J.B.R.T.G.z.n.D.R.u.L.H.B.D.V.B., a (Zoonotic?) Worldwide Pathogen. A Review of the History of the Disease and the Virus Infection with Comprehensive Bibliography (1997) *J of Vet Med, B* (44), Frontispiz und S.42. , 1660.
- Gancz, A., Elbaz, D., Farnoushi, Y., Lublin, A., 2012. Clinical Recovery from Proventricular Dilatation Disease following treatment with Cyclosporine-A in an African Grey Parrot (*Psittacus erithacus*). In: 17. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, München, pp. 130-133.
- Gancz, A.Y., Clubb, S., Shivaprasad, H., 2010, Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 13, 471-494.
- Gancz, A.Y., Kistler, A.L., Greninger, A.L., Farnoushi, Y., Mechani, S., Perl, S., Berkowitz, A., Perez, N., Clubb, S., DeRisi, J.L., Ganem, D., Lublin, A., 2009, Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Virology Journal* 6, 100.
- Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., de la Torre, J.C., 1998, Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *Journal of Virology* 72, 783-788.
- Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Grasser, F.A., de la Torre, J.C., 1997, Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *Journal of Virology* 71, 3208-3218.
- Grabner, A., Fischer, A., 1991, Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years. *Tierärztliche Praxis* 19, 68-73.
- Graham, D., 1991. Wasting/proventricular dilatation disease: a pathologist's view. In: Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, pp. 43-44.
- Graham, D.L., 1984. An Update on Selected Petbird Virus Infections: Infiltrative splanchnic Neuropathy - A Component of the "Wasting Macaw" Complex? In: Conference of the Association of Avian Veterinarians, Toronto, Canada, pp. 275-280.
- Gray, P., 2010, Use of Avian Bornavirus Isolates to Induce Proventricular Dilatation Disease in Conures. *Emerging Infectious Diseases* 16.

- Gregory, C., 1995, Proventricular dilatation disease. Avian viruses, function and control. Lake Worth (FL): Wingers Publishing Inc, 439-448.
- Gregory, C.R., Latimer, K.S., Campagnoli, R.P., Ritchie, B.W., 1996, Histologic evaluation of the crop for diagnosis of proventricular dilatation syndrome in psittacine birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 76-80.
- Gregory, C.R., Latimer, K.S., Niagro, F.D., Ritchie, B.W., Campagnoli, R.P., Norton, T.M., McManamon, R., Greenacre, C.B., 1994, Review of Proventricular Dilatation Syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* 8, 69-75.
- Grund, C.H., Ritter, H., 2004. Retrospektive feingewebliche Untersuchung von Psittaziden mit der Verdachtsdiagnose Neuropathische Magendilatation. In: 14. Tagung über Vogelkrankheiten, München, pp. 147-153.
- Guo, J., Covaleda, L., Heatley, J., Baroch, J., Tizard, I., Payne, S., 2012, Widespread avian bornavirus infection in mute swans in the Northeast United States. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 3, 49-52.
- Guo, J., Shivaprasad, H.L., Rech, R.R., Heatley, J.J., Tizard, I., Payne, S., 2014, Characterization of a new genotype of avian bornavirus from wild ducks. *Virology Journal* 11, 1-7.
- Guo, J., Tizard, I., Baroch, J., Shivaprasad, H., Payne, S.L., 2015, Avian Bornaviruses in North American Gulls. *Journal of wildlife diseases* 51, 754-758.
- Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H., Ikuta, K., 2000, Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Veterinary Microbiology* 72, 207-216.
- Hallensleben, W., Schwemmler, M., Hausmann, J., Stütz, L., Volk, B., Pagenstecher, A., Staeheli, P., 1998, Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *Journal of Virology* 72, 4379-4386.
- Hammer, S., Watson, R., 2012, The challenge of managing Spix Macaws (*Cyanopsitta spixii*) at Qatar-an eleven-year retrospection. *Der Zoologische Garten* 81, 81-95.
- Heatley, J.J., Villalobos, A., 2012, Avian bornavirus in the urine of infected birds. *Vet Med Res Rep* 3, 19-23.
- Heckmann, J., Enderlein, D., Piepenbring, A., Herzog, S., 2015. Investigation on different routes of transmission of Avian bornavirus in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). In: International Conference on Avian, Herpetological, and Exotic Mammal Medicine.
- Heffels-Redmann, U., Enderlein, D., Herzog, S., Herden, C., Piepenbring, A., Neumann, D., Müller, H., Capelli, S., Müller, H., Oberhäuser, K., 2011, Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology* 40, 419-426.
- Heffels-Redmann, U., Enderlein, D., Herzog, S., Piepenbring, A., Burkle, M., Neumann, D., Herden, C., Lierz, M., 2012, Follow-up investigations on different courses of natural avian bornavirus infections in psittacines. *Avian Diseases* 56, 153-159.
- Herden, C., Herzog, S., Richt, J., Nessler, A., Christ, M., Failing, K., Frese, K., 2000, Distribution of Borna Disease Virus in the Brain of Rats Infected with an Obesity-inducing Virus Strain. *Brain Pathology* 10, 39-48.

- Herden, C., Herzog, S., Wehner, T., Zink, C., Richt, J., Frese, K., 1999, Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem, In: Wernery, U., Wade, J., Mumford, J., Kaaden, O. (Eds.) *Equine infectious diseases VIII*. R&W Publications, Newmarket, UK, pp. 286-290.
- Herden, C., Schluesener, H., Richt, J., 2005, Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. *Neuropathology and applied neurobiology* 31, 512-521.
- Herzog, S., Enderlein, D., Heffels-Redmann, U., Piepenbring, A., Neumann, D., Kaleta, E.F., Müller, H., Lierz, M., Herden, C., 2010, Indirect Immunofluorescence Assay for Intra Vitam Diagnosis of Avian Bornavirus Infection in Psittacine Birds. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2282-2284.
- Herzog, S., Frese, K., Rott, R., 1991, Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *Journal of General Virology* 72, 535-540.
- Herzog, S., Kompter, C., Frese, K., Rott, R., 1984, Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Medical microbiology and immunology* 173, 171-177.
- Herzog, S., Wonigeit, K., Frese, K., Hedrich, H., Rott, R., 1985, Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. *Journal of General Virology* 66, 503-508.
- Hiepe, T. 1958. Die Bornasche Krankheit: Klinisch-diagnostische Untersuchungen an Pferden und Schafen mit bes. Berücks. d. Liquor cerebrospinalis.
- Hilbe, M., Herrsche, R., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K., Ehrensperger, F., 2006, Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg Infect Dis* 12, 675-677.
- Hoffmann, B., Tappe, D., Höper, D., Herden, C., Boldt, A., Mawrin, C., Niedersträßer, O., Müller, T., Jenckel, M., van der Grinten, E., 2015, A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *New England Journal of Medicine* 373, 154-162.
- Honkavuori, K.S., Shivaprasad, H., Williams, B.L., Quan, P.-L., Hornig, M., Street, C., Palacios, G., Hutchison, S.K., Franca, M., Egholm, M., 2008, Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 14, 1883-1886.
- Hoppes, S., Gray, P.L., Payne, S., Shivaprasad, H., Tizard, I., 2010, The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 13, 495-508.
- Hoppes, S., Heatley, J.J., Guo, J., Turner, D., Shivaprasad, H., Tizard, I., 2013a, Meloxicam treatment in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) infected with avian bornavirus. *Journal of Exotic Pet Medicine* 22, 275-279.
- Hoppes, S., Tizard, I., Shivaprasad, H., Guo, J., Heatley, J., 2012, Treatment of avian bornavirus-infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) with oral meloxicam and cyclosporine. In: *Proceedings of the 33rd Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*, p. 27.
- Hoppes, S.M., Tizard, I., Shivaprasad, H., 2013b, Avian bornavirus and proventricular dilatation disease: diagnostics, pathology, prevalence, and control. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 16, 339-355.
- Hughes, P., 1984, The pathology of myenteric ganglioneuritis, psittacine encephalomyelitis, proventricular dilatation of psittacines, and macaw wasting syndrome. In: *Proceedings of the 33rd Western Poultry Disease Conference*, pp. 85-87.

- Ihlenburg, H., 1962, Experimentelle Prüfung der Empfänglichkeit der Ziege für das Virus der Bornaschen Krankheit. *Vet. Med* 17, 337-341.
- Jacobsen, B., Algermissen, D., Schaudien, D., Venner, M., Herzog, S., Wentz, E., Hewicker-Trautwein, M., Baumgärtner, W., Herden, C., 2010, Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *Journal of comparative pathology* 143, 203-208.
- Joest, E., Degen, K., 1909, Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde.
- Joest, S.W., 1911, Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung (Borna'sche Krankheit) des Pferdes mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsweges und der Kereinschlüsse. *Z Inf Krkh Haustiere*, 293.
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., Frisén, J., 1999, Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.
- Kao, M., Ludwig, H., Gosztonyi, G., 1984, Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *Journal of General Virology* 65, 1845-1849.
- Kehr, K., 2016, Ausbreitungs-und Persistenzstrategien des Virus der Bornaschen Krankheit in primären corticalen Astrozytenkulturen von Lewis-Ratten.
- Kerski, A., De Kloet, A.H., De Kloet, S.R., 2012, Vertical transmission of avian bornavirus in Psittaciformes: avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in eggs, embryos, and hatchlings obtained from infected sun conures (*Aratinga solstitialis*). *Avian Diseases* 56, 471-478.
- Kistler, A.L., Gancz, A., Clubb, S., Skewes-Cox, P., Fischer, K., Sorber, K., Chiu, C.Y., Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, Y., 2008, Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology Journal* 5, 1.
- Kistler, A.L., Smith, J.M., Greninger, A.L., DeRisi, J.L., Ganem, D., 2010, Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *Journal of Virology* 84, 2176-2179.
- Kolodziejek, J., Dürwald, R., Herzog, S., Ehrensperger, F., Lussy, H., Nowotny, N., 2005, Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *Journal of General Virology* 86, 385-398.
- Kuhn, J.H., Durrwald, R., Bao, Y., Briese, T., Carbone, K., Clawson, A.N., deRisi, J.L., Garten, W., Jahrling, P.B., Kolodziejek, J., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Stenglein, M., Tomonaga, K., Weissenböck, H., Nowotny, N., 2015, Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Archives of Virology* 160, 621-632.
- Lantermann, W., 1999, Nymphensittiche - Artgerechte Haltung, Pflege und Zucht. Oertel + Spörer ISBN-13: 978-3886272310.
- Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Jackson, D., Leitch, I.J., 1994, In situ-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Liebich, H.-G., 2010, Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis; mit 4 Tabellen und 21 Übersichten zu differenzialdiagnostischen Merkmalen;+ Histologie online: die Bilddatenbank mit dem Plus. Schattauer Verlag.

- Lierz, M., 2005, Proventricular Dilatation Disease, In: Harcourt-Brown, N., Chitty, J. (Eds.) BSAVA Manual of Psittacine Birds. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, pp. 161-163.
- Lierz, M., Hafez, H.M., Honkavuori, K.S., Gruber, A.D., Olias, P., Abdelwhab, E.M., Kohls, A., Lipkin, W.I., Briese, T., Hauck, R., 2009, Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathology* 38, 491-496.
- Lierz, M., Piepenbring, A., Herden, C., Oberhauser, K., Heffels-Redmann, U., Enderlein, D., 2011, Vertical transmission of avian bornavirus in psittacines. *Emerg Infect Dis* 17.
- Lilienthal, S., 2014. Veränderungen der Proteinsekundärstruktur in Eigelb, Eigelbfraktionen und Eiklar von Hühnereiern während der frühen Brutphase. Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover,
- Ludwig, H., Becht, H., Groh, L., 1973, Borna disease (BD), a slow virus infection biological properties of the virus. *Medical microbiology and immunology* 158, 275-289.
- Ludwig, H., Bode, L., 2000, Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology pages 259-288. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 19, 2.
- Ludwig, H., Bode, L., Gosztonyi, G., 1988, Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Progress in Medical Virology* 35, 107-151.
- Lundgren, A.-L., Zimmermann, W., Bode, L., Czech, G., Gosztonyi, G., Lindberg, R., Ludwig, H., 1995, Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *Journal of General Virology* 76, 2215-2222.
- Lutz, M.E., Wilson, R.B., 1991, Psittacine proventricular dilatation syndrome in an umbrella cockatoo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 1962-1964.
- Malkinson, M., Weisman, Y., Ashash, E., Bode, L., Ludwig, H., 1993, Borna disease in ostriches. *Vet Rec* 133.
- Mannl, A., Gerlach, H., Leipold, R., 1987, Neuropathic gastric dilatation in psittaciformes. *Avian Diseases*, 214-221.
- Marton, S., Bányai, K., Gál, J., Ihász, K., Kugler, R., Lengyel, G., Jakab, F., Bakonyi, T., Farkas, S.L., 2015, Coding-complete sequencing classifies parrot bornavirus 5 into a novel virus species. *Archives of virology* 160, 2763-2768.
- Masteller, E.L., Pharr, G.T., Funk, P.E., Thompson, C.B., 1997, Avian B cell development. *International reviews of immunology* 15, 185-206.
- Mayr, A., Danner, K., 1974, Persistent infections caused by Borna virus. *Infection* 2, 64-69.
- Metzler, A., Ehrensperger, F., Wyler, R., 1978, Natürliche Bornavirus-Infektion bei Kaninchen. *Zentralblatt fuer Veterinaermedizin Reihe B* 25, 161-164.
- Monaco, E., Hoppes, S., Guo, J., Tizard, I., 2012a, The detection of avian bornavirus within psittacine eggs. *J Avian Med Surg* 26, 144-148.
- Monaco, E., Hoppes, S., Guo, J., Tizard, I., 2012b, The detection of avian bornavirus within psittacine eggs. *J Avian Med Surg* 26.
- Morales, J., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K., Rott, R., 1988, Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Medical microbiology and immunology* 177, 51-68.
- Morales, J.A., 1988, Immunhistologische Verlaufsuntersuchungen über die Ausbreitung des Virus der Bornaschen Krankheit bei der Lewis-Ratte nach perinataler intrazerebraler Infektion. Justus-Liebig-Universität.

- Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H., Rott, R., 1983a, Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent Borna virus in the brain. *Science* 220, 1401-1403.
- Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H., Rott, R., 1983b, Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *Journal of Infectious Diseases* 148, 305-315.
- Nitzschke, E., Rott, R., 1957, Züchtung des Virus der Bornaschen Krankheit im bebrüteten Hühnerrei. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 70, 101-102.
- Nobach, D., Bourg, M., Herzog, S., Lange-Herbst, H., Encarnação, J.A., Eickmann, M., Herden, C., 2015, Shedding of infectious borna disease virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. *Plos One* 10, e0137018.
- Nowotny, N., Weissenböck, H., 1995, Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis ("staggering disease") and studies of its etiology. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1668-1669.
- Okamoto, M., Hagiwara, K., Kamitani, W., Sako, T., Hirayama, K., Kirisawa, R., Tsuji, M., Ishihara, C., Iwai, H., Kobayashi, T., 2003, Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Archives of virology* 148, 1557-1568.
- Olbert, M., 2016, Impfprophylaxe gegen aviäre Bornaviren mit Hilfe rekombinanter viraler Vektorvakzinen. INAUGURAL-DISSERTATION Zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Ovanesov, M.V., Ayhan, Y., Wolbert, C., Moldovan, K., Sauder, C., Pletnikov, M.V., 2008, Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *Journal of neuroinflammation* 5, 50.
- Payne, S., Covalada, L., Jianhua, G., Swafford, S., Baroch, J., Ferro, P.J., Lupiani, B., Heatley, J., Tizard, I., 2011, Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (*Branta canadensis*). *Journal of Virology* 85, 12053-12056.
- Payne, S.L., Delnatte, P., Guo, J., Heatley, J.J., Tizard, I., Smith, D.A., 2012, Birds and bornaviruses. *Anim Health Res Rev* 13.
- Phalen, D., 1986. An outbreak of psittacine proventricular dilatation syndrome (PPDS) in a private collection of birds and an atypical form of PPDS in a nanday conure. In: *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*, pp. 27-34.
- Philadelpho, N.A., Rubbenstroth, D., Guimarães, M.B., Ferreira, A.J.P., 2014, Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. *Veterinary Microbiology* 174, 584-590.
- Piepenbring, A., 2017, Untersuchungen zu Kausalität und Pathogenität von zwei verschiedenen Isolaten des Psittaciform 1 bornavirus als Ursache der Psittazinen Drüsenmagendilatation (PDD) am Beispiel des Nymphensittichs (*Nymphicus hollandicus*). Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Piepenbring, A.K., Enderlein, D., Herzog, S., Al-Ibadi, B., Heffels-Redmann, U., Heckmann, J., Lange-Herbst, H., Herden, C., Lierz, M., 2016, Parrot Bornavirus (PaBV)-2 isolate causes different disease patterns in cockatiels than PaBV-4. *Avian Pathology* 45, 156-168.
- Piepenbring, A.K., Enderlein, D., Herzog, S., Kaleta, E.F., Heffels-Redmann, U., Ressemeyer, S., Herden, C., Lierz, M., 2012, Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerg Infect Dis* 18, 234-241.

- Puorger, M., Hilbe, M., Müller, J.-P., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K., Ehrensperger, F., 2010, Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocicuda leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Veterinary Pathology Online* 47, 236-244.
- Raghav, R., Taylor, M., DeLay, J., Ojtic, D., Pearl, D.L., Kistler, A.L., DeRisi, J.L., Ganem, D., Smith, D.A., 2010, Avian Bornavirus is Present in Many Tissues of Psittacine Birds with Histopathologic Evidence of Proventricular Dilatation Disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 495-508.
- Reavill, D., Schmidt, R., 2007. Lesions of the proventriculus/ventriculus of pet birds: 1640 cases. In: *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*, pp. 89-93.
- Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L., Dammacco, F., 2004, The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 40, 1189-1197.
- Richt, J., Herzog, S., Haberzettl, K., Rott, R., 1993, Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Medical microbiology and immunology* 182, 293-304.
- Richt, J., VandeWoude, S., Zink, M.C., Narayan, O., Clements, J.E., 1991, Analysis of Borna disease virus-specific RNAs in infected cells and tissues. *Journal of General Virology* 72, 2251-2255.
- Richt, J.A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K., Herzog, S., 1997, Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging Infectious Diseases* 3, 343-352.
- Ridgway, R., Gallerstein, G., 1983. Proventricular dilatation in psittacines. In: *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*, pp. 228-230.
- Rinder, M., Ackermann, A., Kempf, H., Kaspers, B., Korbel, R., Staeheli, P., 2009, Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *J Virol* 83, 5401-5407.
- Rinder, M., Högemann, C., Hufen, H., Brosinski, K., Kaspers, B., Rubbenstroth, D., Staeheli, P., Korbel, R., 2014. Experimentelle Infektion von Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus erithacus*) mit aviären Bornaviren: Klinische und pathologische Veränderungen. In: 1. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe "Zier-, Zoo- und Wildvögel, Reptilien und Amphibien", München, pp. 61-63.
- Rott, R., Becht, H., 1995, Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190, 17-30.
- Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W., Koprowski, H., 1985, Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228, 755-757.
- Rott, R., Nitzschke, E., 1958, Untersuchungen über die Züchtung des Virus der Bornaschen Krankheit im bebrüteten Hühnerrei unter verschiedenen Bedingungen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 5, 629-633.
- Rowlett, K., Simkiss, K., 1987, Explanted embryo culture: in vitro and in ovo techniques for domestic fowl. *British poultry science* 28, 91-101.
- Rubbenstroth, D., Brosinski, K., Rinder, M., Olbert, M., Kaspers, B., Korbel, R., Staeheli, P., 2014a, No contact transmission of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and domestic canaries (*Serinus canaria forma domestica*). *Veterinary Microbiology* 172, 146-156.

- Rubbenstroth, D., Rinder, M., Kaspers, B., Staeheli, P., 2012, Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Veterinary Microbiology* 161, 36-42.
- Rubbenstroth, D., Rinder, M., Stein, M., Hoper, D., Kaspers, B., Brosinski, K., Horie, M., Schmidt, V., Legler, M., Korbel, R., Staeheli, P., 2013, Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Veterinary Microbiology* 165, 287-295.
- Rubbenstroth, D., Schmidt, V., Rinder, M., Legler, M., Corman, V.M., Staeheli, P., 2014b, Discovery of a new avian bornavirus genotype in estrilid finches (*Estrilidae*) in Germany. *Veterinary Microbiology* 168, 318-323.
- Rubin, S., Waltrip, R., Bautista, J., Carbone, K., 1993, Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *Journal of Virology* 67, 548-552.
- Sachs, L., 2013, *Angewandte statistik: anwendung statistischer methoden*. Springer-Verlag.
- Sauder, C., Staeheli, P., 2003, Rat model of Borna disease virus transmission: epidemiological implications. *Journal of Virology* 77, 12886-12890.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., Reed, M.W., 2000, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical biochemistry* 285, 194-204.
- Schneemann, A., Schneider, P.A., Lamb, R.A., Lipkin, W.I., 1995, The remarkable coding strategy of Borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* 210, 1-8.
- Schüppel, K., Kinne, J., Reinacher, M., 1994, Bornavirusantigennachweis bei alpakas (*Lama pacos*) sowie bei einem faultier (*Choloepus didactylus*) und einem zwergflußferd (*Choeropsis liberiensis*). In: *Verhandlungsberichte des 36. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo-und Wildtiere*.
- Schüppel, K.F., Kinne, J., Lebelt, J., Reinacher, M., 1995, Zwei Fälle von Borna'scher Krankheit bei Varis (*Memur variegatus*). In: *38. Tagung der Fachgruppe "Pathologie" der DVG, Hamburg*.
- Shivaprasad, H., Barr, B., Woods, L., Daft, B., Moore, J., Kinde, H., 1995, Spectrum of lesions (pathology) of proventricular dilation syndrome. In: *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians*, pp. 507-508.
- Speer, B., 2015, *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*. Elsevier Health Sciences.
- Sprankel, H., Richarz, K., Ludwig, H., Rott, R., 1978, Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Medical microbiology and immunology* 165, 1-18.
- Staeheli, P., Rinder, M., Kaspers, B., 2010, Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *J Virol* 84, 6269-6275.
- Staeheli, P., Sentandreu, M., Pagenstecher, A., Hausmann, J., 2001, Alpha/beta interferon promotes transcription and inhibits replication of Borna disease virus in persistently infected cells. *Journal of Virology* 75, 8216-8223.
- Stitz, L., Bilzer, T., Planz, O., 2002, The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci* 7, 541-555.
- Stoyloff, R., Bode, L., Borchers, K., Ludwig, H., 1998, Neutralization of Borna disease virus depends upon terminal carbohydrate residues (α -D-Man, β -D-GlcNAc) of glycoproteins gp17 and gp94. *Intervirology* 41, 135-140.

- Suedmeyer, W.K., 1992, Diagnosis and clinical progression of three cases of proventricular dilatation syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 159-163.
- Swiss Institute of Bioinformatics, S., 2010, Bornavirus. Retrieved 30.05.2017 http://viralzone.expasy.org/279?outline=all_by_species.
- Toivanen, A., Toivanen, P., 1987, Avian immunology: basis and practice. Volume I. Volume II. CRC Press, Inc.
- Turner, R., 1984, Macaw fading or wasting syndrome. In: *Proc 33rd West Poul Dis Conf*, p. 88.
- Vice, C.A., 1992, Myocarditis as a component of psittacine proventricular dilatation syndrome in a Patagonian conure. *Avian Diseases* 36, 1117-1119.
- Villanueva, I., Gray, P., Mirhosseini, N., Payne, S., Hoppes, S., Honkavuori, K.S., Briese, T., Turner, D., Tizard, I., 2010, The diagnosis of proventricular dilatation disease: use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Borna virus. *Vet Microbiol* 143, 196-201.
- Weissenböck, H., 2009, Avian Bornaviruses in Psittacine Birds from Europe and Australia with Proventricular Dilatation Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 1453-1459.
- Weissenböck, H., Bakonyi, T., Sekulin, K., Ehrensperger, F., Doneley, R.J., Dürrwald, R., Hoop, R., Erdélyi, K., Gál, J., Kolodziejek, J., 2009, Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases* 15, 1453-1459.
- Weissenböck, H., Fragner, K., Nedorost, N., Mostegl, M.M., Sekulin, K., Maderner, A., Bakonyi, T., Nowotny, N., 2010, Localization of avian bornavirus RNA by in situ hybridization in tissues of psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Veterinary Microbiology* 145, 9-16.
- Weissenböck, H., Nowotny, N., Caplazi, P., Kolodziejek, J., Ehrensperger, F., 1998, Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2127-2130.
- Weissenböck, H., Sekulin, K., Bakonyi, T., Hogler, S., Nowotny, N., 2009, Novel Avian Bornavirus in a Nonpsittacine Species (Canary; *Serinus canaria*) with Enteric Ganglioneuritis and Encephalitis. *Journal of Virology* 83, 11367-11371.
- Wensman, J.J., Jäderlund, K.H., Holst, B.S., Berg, M., 2014, Borna disease virus infection in cats. *The Veterinary Journal* 201, 142-149.
- Werner, B., 2000, Untersuchungen zur vertikalen Übertragung des Virus der Bornaschen Krankheit beim Pferd. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Woerpel, R., Roskopf, W., 1984, Clinical and pathological features of macaw wasting disease (proventricular dilatation syndrome). In: *Proc 33rd West Poul Dis Conf*, pp. 89-90.
- Woerpel, R.W., Roskopf, W.J., Hughes, P.E., 1984, Proventricular Dilatation and Wasting Syndrome: Myenteric Ganglioneuritis and Encephalomyelitis of Psittacines; an update. In: *Conference of the Association of Avian Veterinarians*, Toronto, Canada, pp. 25-28.
- Wünschmann, A., Honkavuori, K., Briese, T., Lipkin, W.I., Shivers, J., Armien, A.G., 2011, Antigen tissue distribution of Avian bornavirus (ABV) in psittacine birds with natural spontaneous proventricular dilatation disease and ABV genotype 1 infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 716-726.

- Wüst, E., Mahlberg, S., Enderlein, D., Heffels-Redmann, U., Herzog, S., Herden, C., Lierz, M., 2015, Experimentally infection of cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) eggs with Avian Bornavirus. Proceedings: International Conference on avian herpetological and exotic mammal medicine, 285.
- Zimmermann, W., Breter, H., Rudolph, M., Ludwig, H., 1994, Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *Journal of Virology* 68, 6755-6758.
- Zwick, W., 1939, Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere, In: Gildenmeister, E., Haagen, E., Waldmann, O. (Eds.) *Handbuch der Viruserkrankungen*. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 252-354.
- Zwick, W., Seifried, O., 1925, Uebertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornaschen Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). *Berl Tierarztl Wochenschr* 41, 129-132.
- Zwick, W., Seifried, O., Witte, J., 1927, Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn- und Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). *Z. Infkrkh. Haustiere*. 30, 42 136.
- Zwick, W., Seifried, O., Witte, J., 1928, Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). *Z Infkrkh Haustiere* 32, 150-179.

9 DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Michael Lierz für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien danken. Ganz besonders bedanken möchte ich mich für die jederzeit gewährte Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Helene Pendel für die vielen Ratschläge und die allgemeine Einführung zur Auswertung der histologischen Untersuchungen.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Dirk Enderlein für seine Laboreinweisung und Hilfe bei vielen Fragestellungen rund um die PCR.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sibylle Herzog für die Bereitstellung der PaBV-Isolate und Hilfestellung bei der Herstellung der NEB und NEF Zellen, der Virus-Isolierung und Auswertung des IIFT.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Christiane Herden und den Mitarbeitern des Institutes für Veterinärpathologie der JLU-Gießen für die Hilfe bei Anfertigung, Färbung und Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Schnittpräparate.

Danken möchte ich auch meinen Kollegen der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische für die jederzeit gewährte Unterstützung, die bei der Durchführung eines solchen Projektes dringend notwendig ist.

Schließlich möchte ich auch ganz besonders meinen Eltern danken für die uneingeschränkte Unterstützung, die sie mir all die Jahre vorbehaltlos gegeben haben. Darüber hinaus gilt besonderer Dank meiner Schwester Ann-Kathrin, die zu jeder Zeit Hilfe bei technischen Problemen gewährt hat.

10 ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den 02.06.2017

Elisa Maria Wüst



ISBN 978-3-86345-379-4



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvf.de · Internet: www.dvf.de