

MANON BOURG

VIRUSÖKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
BORNASCHEN KRANKHEIT IN BAYERN



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christiane Herden

Virusökologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit in Bayern

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MANON BOURG

Tierärztin aus Luxemburg (L)

Gießen 2018

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Christiane Herden

Prof. Dr. Friedemann Weber

Tag der Disputation: 11. Juni 2018

Meinen Eltern

„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.“

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis Kleinsäuger	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Veröffentlichungen	IX
1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Definition und Bedeutung von Virusreservoirien	3
2.2 Borna Disease Virus 1 (BoDV-1) und die Bornasche Krankheit	5
2.2.1 Historisches und Taxonomie	5
2.2.2 Wirtsspektrum und Epidemiologie der Bornaschen Krankheit	7
2.2.3 Charakterisierung des Erregers	11
2.2.4 Pathogenese und Klinik der Bornaschen Krankheit bei natürlichen und experimentellen Infektionen	13
2.2.4.1 Natürliche BoDV-1-Infektionen bei Kleinsäugetieren	13
2.2.4.2 BoDV-1-Infektion bei Labornägern	15
2.2.4.3 Natürliche BoDV-1-Infektion der Pferde und Schafe	17
2.2.5 Diagnostik der BoDV-1-Infektion	19
2.3 Die BoDV-1-Infektion bei der Feldspitzmaus (<i>Crocidura leucodon</i>)	20
2.3.1 Verbreitung, Lebensweise und Charakteristika der Feldspitzmaus	20
2.3.2 Natürliche BoDV-1-Infektion der Feldspitzmaus	24
2.4 BoDV-1-Infektion bei kleinen Karnivoren	28
2.4.1 BoDV-1-Infektionen bei kleinen Karnivoren mit Augenmerk auf den Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	28
2.4.1.1 Verbreitung und Lebensweise des Rotfuchses	28
2.4.1.2 Natürliche BoDV-1-Infektion bei kleinen Karnivoren	29
2.4.2 Ursachen von nicht-eitrigen Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren	31
2.4.2.1 Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren	31
2.4.2.2 Infektiöse Ursachen	32
2.4.2.3 Nicht-infektiöse Ursachen	34
3 Veröffentlichung 1	36
4 Veröffentlichung 2	40

5	Zusätzliche Untersuchungen	53
5.1	Charakterisierung der Betriebe in Bayern mit Vorkommen der Bornaschen Krankheit beim Pferd	53
5.2	Untersuchung auf potentielle BoDV-1-Infektionen bei Kleinsäu- gern in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen	55
5.3	Untersuchung auf potentielle BoDV-1-Infektionen bei Füchsen (<i>Vulpes</i> <i>vulpes</i>), Dachsen (<i>Meles meles</i>) und Marderartigen (<i>Mustelidae</i>).....	67
6	Diskussion	69
6.1	Charakterisierung des Reservoirs für BoDV-1 in Bayern	69
6.1.1	Die Feldspitzmaus als Reservoir für BoDV-1.....	69
6.1.1.1	Vorkommen von BoDV-1-positiven Feldspitzmäusen in Endemiegebieten in Bayern.....	69
6.1.1.2	Unterschiedliche Infektionsmuster bei Feldspitzmäusen.....	70
6.1.1.3	Bestätigung der Feldspitzmaus als Reservoir für BoDV-1	73
6.1.1.4	Weitere potentielle Kleinsäugerreservoirs	74
6.1.2	Nachweis von BoDV-1-spezifischen Antikörpern bei wildlebenden Kleinsäu- gern	75
6.1.3	Betriebe mit dem Vorkommen sowohl der Feldspitzmaus als auch der Bornaschen Krankheit beim Pferd.....	77
6.1.3.1	Charakterisierung der Betriebe mit dem Vorkommen von equiner BD.....	77
6.1.3.2	Mögliche Übertragungswege von der Feldspitzmaus auf das Pferd... 78	
6.2	Verlauf von BoDV-1-Infektionen bei kleinen Karnivoren (Rotfuchs, Dachs, Marderartige).....	80
6.2.1	Vorkommen von anti-BoDV-1-Antikörpern bei kleinen Karnivoren.....	80
6.2.2	Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren.....	80
6.2.2.1	Untersuchung auf BoDV-1-Infektion	80
6.2.2.2	Mögliche Ursachen der Enzephalitiden	81
6.2.2.3	Füchse als Reservoir für BoDV-1?	83
6.3	Potentieller Zusammenhang zwischen BoDV-1-Infektionen der Feldspitzmaus und der kleinen Karnivoren	83
7	Zusammenfassung	85
8	Summary	87
9	Literaturverzeichnis.....	89
10	Anhang	113
10.1	Arbeitsblatt „Betriebsinformationen“	113
10.2	Informationen zu den einzelnen Pferdebetrieben mit dem Vorkommen der Bornaschen Krankheit beim Pferd	117

10.3	Untersuchung von 100 Kleinsäugetern auf anti-BoDV-1-Antikörper und BoDV-1-RNA	121
10.4	Kein Nachweis von anti-BoDV-1-spezifischen Antikörpern bei 107 Kleinsäugetern	124
	Eigenanteil.....	127
	Danksagung	129

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BD	<i>Borna Disease</i> (deutsch: Bornasche Krankheit)
Bgw.	Bindegewebe
BoDV-1	<i>Borna Disease Virus 1</i> (deutsch: Virus der Bornaschen Krankheit)
BoDV-1-RNA	Ribonukleinsäure des Virus der Bornaschen Krankheit
BW	Baden-Württemberg
BY	Bayern
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> (deutsch: Zerebrospinalflüssigkeit)
EBLN	endogenous bornavirus-like nucleoprotein elements (deutsch: Endogene Bornavirus-ähnliche Nukleoprotein-Elemente)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	<i>et alii, et aliae, et alia</i> (deutsch: und andere)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (deutsch: Saures Gliafaserprotein)
ggf.	gegebenenfalls
GME	Granulomatöse Meningoenzephalitis
ha	Hektar
HE	Hessen
IHC	Immunohistochemie
IIFT	indirekter Immunofluoreszenztest
ISH	In-situ-Hybridisierung
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i> (deutsch: Weltnaturschutzunion)
J	Jahre
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
LKR	Landkreis
m	Meter
MDCK-Zellen	<i>Mady-Darby canine kidney cells</i> (deutsch: Hundenierenzellen)
MRL-Mäuse	„ <i>Murphy Roth's Large</i> “-Mäuse

n	Anzahl der Tiere
nested PCR	<i>Nested polymerase chain reaction</i> (deutsch: nested Polymerase-Kettenreaktion)
NLE	Nekrotisierende Leukoenzephalitis
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NME	Nekrotisierende Meningoenzephalitis
Nr.	Nummer
ORF	<i>Open reading frame</i> (deutsch: Offener Leserahmen)
p24	BoDV-1-Phosphoprotein p24
p38/40	BoDV-1-Nukleoprotein p38/40
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (deutsch: Polymerase-Kettenreaktion)
PNS	Peripheres Nervensystem
PTI-Ratten	persistent infizierte, immuntolerante Ratten
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (deutsch: Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion)
S.	Seite
T. gondii	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tab.	Tabelle
u.	und
ü. NN	Über Normalnull
v.a.	vor allem
VSBV-1	<i>Variiegated Squirrel Bornavirus 1</i> (deutsch: Bunthörnchen-Borna-Virus 1)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungsverzeichnis Kleinsäuger

Feldspitzmaus	<i>Crocidura leucodon</i>	<i>C. leucodon</i>
Hausspitzmaus	<i>Crocidura russula</i>	<i>C. russula</i>
Gartenspitzmaus	<i>Crocidura suaveolens</i>	<i>C. suaveolens</i>
Waldspitzmaus	<i>Sorex araneus</i>	<i>S. araneus</i>
Schabrackenspitzmaus	<i>Sorex coronatus</i>	<i>S. coronatus</i>
Zwergspitzmaus	<i>Sorex minutus</i>	<i>S. minutus</i>
Wasserspitzmaus	<i>Neomys fodiens</i>	<i>N. fodiens</i>
Sumpfspitzmaus	<i>Neomys anomalus</i>	<i>N. anomalus</i>
Feldmaus	<i>Microtus arvalis</i>	<i>Microtus sp.</i>
Erdmaus	<i>Microtus agrestis</i>	<i>Microtus sp.</i>
Nordische Wühlmaus	<i>Microtus oeconomus</i>	<i>M. oeconomus</i>
Rötelmaus	<i>Myodes glareolus</i>	<i>M. glareolus</i>
Scherm Maus	<i>Arvicola terrestris</i>	<i>A. terrestris</i>
Waldmaus	<i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>A. sylvaticus</i>
Gelbhalsmaus	<i>Apodemus flavicollis</i>	<i>A. flavicollis</i>
Zwergmaus	<i>Micromys minutus</i>	<i>M. minutus</i>
Hausmaus	<i>Mus musculus</i>	<i>M. musculus</i>

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Nachweise von BoDV-1-Antigen und -RNA bei <i>C. leucodon</i>	27
Tab. 2 Auflistung der Fälle von BD beim Pferd in den teilnehmenden Betrieben.....	53
Tab. 3 Anzahl der Kleinsäuger aus den jeweiligen Betrieben in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen	56
Tab. 4 Übersicht der veröffentlichten und unveröffentlichten Kleinsäugerdaten (n=337).....	56
Tab. 5 Zusammenfassung aller verfügbaren Kleinsäugerproben und Resultate (n=337).....	57
Tab. 6 Bisher unveröffentlichte BoDV-1-positive Kleinsäuger aus Bayern, Baden- Württemberg und Hessen.....	61
Tab. 7 Verteilung von BoDV-1-Antigen und -RNA in <i>C. leucodon</i> #5071 und #5077	63
Tab. 8 Anzahl an seropositiven Dachsen und Marderartigen aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen	68

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Taxonomie der <i>Bornaviridae</i>	7
Abb. 2 Virus der Bornaschen Krankheit	11
Abb. 3 Genomorganisation von Bornaviren.....	12
Abb. 4 Verbreitung der Feldspitzmaus in Europa	21
Abb. 5 Nachweise von Feldspitzmäusen in Bayern von 1990 bis 2004.....	22
Abb. 6 Charakteristika der Feldspitzmaus (<i>C. leucodon</i>)	23
Abb. 7 Verbreitung des Rotfuchses in Europa	28
Abb. 8 Seropositive Kleinsäuger und BoDV-1-positive <i>C. leucodon</i> in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen	59
Abb. 9 Nachweis von Anti-BoDV-1-Antikörpern bei <i>C. leucodon</i> #2001 (400x)	60
Abb. 10 Nachweis von Anti-BoDV-1-Antikörpern bei <i>S. minutus</i> #11001 (400x)	60
Abb. 11 Nachweis von BoDV-1-Antigen, von genomischer und messenger BoDV-1- RNA im Gehirn von <i>C. leucodon</i> #5071 und im Trigeminalganglion von <i>C.</i> <i>leucodon</i> #5077 (S.63)	64
Abb. 12 Nachweis von BoDV-1-Antigen in der Nase von <i>C. leucodon</i> #5077	66
Abb. 13 Nachweis von anti-BoDV-1-Antikörpern beim Fuchs.....	67

Veröffentlichungen

Als Erst-Autor

Originalartikel

- *BOURG M, HERZOG S, ENCARNAÇÃO JA, NOBACH D, LANGE-HERBST H, EICKMANN M, HERDEN C. Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany [letter]. Emerg Infect Dis. 2013;19(12):2064–6.
- *BOURG M, NOBACH D, HERZOG S, LANGE-HERBST H, NESSELER A, HAMANN HP, BECKER S, HÖPER D, HOFFMANN B, EICKMANN M, HERDEN C. Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis. Virol J. 2016;13:151. doi: 10.1186/s12985-016-0608-1

Veröffentlichungen von Kongressbeiträgen

- BOURG M, HERZOG S, EICKMANN M, NOBACH D, ENCARNAÇÃO JA, HERDEN C. Nachweis von Borna Disease Virus bei Feldspitzmäusen (*Crocidura leucodon*) in Bayern. Tierärztl Prax G N. 2013;41(3):A2.
- BOURG M, HERZOG S, ENCARNAÇÃO JA, NOBACH D, LANGE-HERBST H, EICKMANN M, HERDEN C. The role of small mammals especially bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus in Bavaria, Germany. Mamm Biol. 2014;79(Suppl):6.
- BOURG M, HERZOG S, NOBACH D, LANGE-HERBST H, EICKMANN M, HERDEN C. Bornavirus-Infektionen beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*)? Tierärztl Prax K H. 2015;43(3):A25.

Weitere Kongressbeiträge

- BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ULRICH RG, NOBACH D, ENCARNAÇÃO JA, EICKMANN M, HERDEN C. Bicoloured white-toothed shrews

as reservoir for Borna disease in Bavaria. National Symposium on Zoonoses Research 2013, 19.–20.09.2013, Berlin (D), Vortrag.

- BOURG M, HERZOG S, NOBACH D, NESSELER A, HOFFMANN B, LANGE-HERBST H, EICKMANN M, HERDEN C. Borna disease virus 1 in the red fox (*Vulpes vulpes*)? National Symposium on Zoonoses Research 2015, 12.–14.10.2014, Berlin (D), Postervorstellung.

Als Co-Autor

Originalartikel

- #NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ENCARNAÇÃO JA, EICKMANN M, HERDEN C. Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. PLoS One. 2015;10(8):e0137018. doi: 10.1371/journal.pone.0137018

Veröffentlichungen von Kongressbeiträgen

- NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ENCARNAÇÃO JA, EICKMANN M, HERDEN C. Natürliche Borna-Disease-Virus-Infektion im Reservoirwirt *Crocidura leucodon*. Tierärztl Prax G N. 2014;42(2):A7.
- NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ENCARNAÇÃO JA, EICKMANN M, HERDEN C. Investigation on living, natural BDV-infected bicoloured white-toothed shrews. Mamm Biol. 2014;79(Suppl.):14.
- NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ENCARNAÇÃO JA, EICKMANN M, HERDEN C. Shedding of infectious Borna disease virus in living bicoloured white-toothed shrews. J Comp Pathol. 2015;152(1):52.
- NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, ENCARNAÇÃO JA, SCHEMKEN G, EICKMANN M, HERDEN C. Haltung von Insektivoren als neue Tiermodelle. Tierärztl Praxis K H. 2015;43(3):A27.

Weitere Kongressbeiträge

- NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ENCARNAÇÃO JA, EICKMANN M, HERDEN C. Various ways of shedding of Borna disease virus in living bicoloured white-toothed shrews. National Symposium on Zoonoses Research 2014, 16.–17.10.2014, Berlin (D), Vortrag.
- NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, ENCARNAÇÃO JA, SCHEMKEN G, EICKMANN M, HERDEN C. Husbandry of insectivores as new animal model. National Symposium on Zoonoses Research 2015, 12.–14.10.2015, Berlin (D), Postervorstellung.

*Diese Artikel wurden für die vorliegende Dissertation verwendet.

#Ein Teil dieses Artikels wurde für die Dissertation verwendet.

1 Einleitung und Fragestellung

Die Bornasche Krankheit (BD) ist eine virale Infektionskrankheit, die hauptsächlich bei Pferden und Schafen auftritt. Der Auslöser ist das Virus der Bornaschen Krankheit (Borna disease virus 1, BoDV-1). Fälle von Bornascher Krankheit sind auch bei Haus-, Nutz- und Zootieren bekannt (zusammengefasst in Herden et al., 2013). Außerdem lässt sich mit dem Bornavirus ein breites Wirtsspektrum experimentell infizieren. Die BoDV-1-Infektion kann bei immunkompetenten Tieren über eine T-Zell-medierte Immunopathogenese eine nicht-eitrige Meningoenzephalitis auslösen. In deren Folge treten vor allem neurologische Symptome auf, die beim Pferd in den meisten Fällen zum Tod führen. Das BoDV-1 gehört zur Ordnung der *Mononegavirales*, der viele Viren mit hohem zoonotischen Potential wie Rhabdo- und Filoviren angehören und die eine schwere Krankheit mit Viruspersistenz auslösen können. Kürzlich wurde ein neues, zoonotisches Bornavirus bei Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*) und Prevost-Hörnchen (*Callosciurus prevostii*) in Deutschland und den Niederlanden (Variegated Squirrel Bornavirus 1, VSBV-1) mit bislang unbekanntem Virusreservoir entdeckt (Hoffmann et al., 2015; Schlottau et al., 2017). Dies unterstreicht die Notwendigkeit von virusökologischen Untersuchungen zur Herkunft der Bornaviren zum Schutz von Tier- und öffentlicher Gesundheit, auch im Sinne des ‚One Health‘-Ansatzes.

Epidemiologische Faktoren, wie beispielsweise eine säkulare und saisonale Inzidenz, sowie das endemische Vorkommen der BD deuten schon lange auf das Vorhandensein von einem oder mehreren Reservoiren hin. Untersuchungen aus der Schweiz (Hilbe et al., 2006; Puorger et al., 2010) beschreiben erstmalig den Nachweis von BoDV-1 bei Feldspitzmäusen (*Crocidura leucodon*). Bislang fehlten aber Untersuchungen von wildlebenden Kleinsäugetieren in weiteren Endemie- und Nichtendemiegebieten in Deutschland, wie z.B. in Bayern, welche die generelle Rolle von Feldspitzmäusen als Reservoir von BoDV-1 bestätigen. Hierfür sollen in dieser Arbeit Virusnachweise dargelegt und Daten zur Viruspersistenz gesammelt werden. Einen weiteren Ansatz liefern Fragebögen, um Betriebe, in denen die equine BD vorkommt, besser charakterisieren zu können. Als weitere potentielle Reservoirspezies kommen der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) sowie andere kleine Karnivoren in Frage. Sie sind auf die Prädation von Kleinsäugetieren spezialisiert und empfänglich für Infektionen mit Viren der Ordnung *Mononegavirales*. Ob sie

sich durch den Kontakt mit positiven Feldspitzmäusen mit BoDV-1 infizieren können oder gar ein weiteres Reservoir darstellen, war bislang nicht bekannt. Im Hinblick auf das vermehrte Vorkommen von Füchsen in der Nähe des Menschen hat dies eine wichtige Frage dargestellt. Weiterhin galt es, unklare, nicht-eitrige Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren weiterführend auf mögliche Infektionen mit BoDV-1 oder anderen Erregern zu untersuchen.

Das Ziel dieser initialen Studie war die Identifikation von BoDV-1-Reservoiren in Deutschland, vor allem in Endemiegebieten in Bayern. Das Augenmerk lag auf der gezielten Untersuchung von wildlebenden Kleinsäugetern und kleinen Karnivoren. Der Nachweis von BoDV-1 in potentiellen Reservoirwirten und die Charakterisierung des Reservoirs, die Rolle der Feldspitzmaus als Reservoir und der Zusammenhang zwischen equinen Fällen von Bornascher Krankheit und Reservoirwirten sollten dargestellt werden. Außerdem sollten mögliche unterschiedliche Infektionsverläufe bei Kleinsäugetern und kleinen Karnivoren aufgezeigt werden.

Die Überwachung von Wildtieren zur Abschätzung der Inzidenz und der möglichen Ausbreitung von zoonotischen Krankheitserregern hat das Ziel, eine Übertragung von Tier zu Tier sowie eine potentielle Übertragung auf den Menschen zu verhindern. Die vorliegende Arbeit soll zudem eine wesentliche Grundlage für eine fundierte Risikobewertung für Pferde in Endemiegebieten darstellen. Aufgrund der Ergebnisse aus den Untersuchungen von Kleinsäugetern und kleinen Karnivoren können Handlungsanweisungen zum Schutz der Pferde vor BoDV-1-Infektionen beziehungsweise anderen Viren ausgearbeitet werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Definition und Bedeutung von Virusreservoirien

Für die meisten Infektionserreger von Menschen sowie Haus- und Wildtieren wird das Vorhandensein von Reservoirien vermutet (Daszak et al., 2000). Allerdings sind die Reservoirien selten bekannt (Haydon et al., 2002), wobei es keinen Konsensus zu der Definition des Terminus des Reservoirs gibt. Ashford (2003) definiert ein Reservoir als ein ökologisches System, in dem ein Infektionserreger dauerhaft überleben kann. Wird ein Wirt durch einen Erreger infiziert, für dessen Erhalt er nicht erforderlich ist, wird er als Zufallswirt bezeichnet. Haydon et al. (2002) beschränken die Definition auf praktische Betrachtungen und definieren ein Reservoir durch das Vorkommen von einer oder mehreren epidemiologisch verbundenen Populationen oder Umgebungen, in denen ein bestimmtes Pathogen dauerhaft erhalten bleibt und aus welcher sich die Infektion auf einen definierten Endwirt überträgt. Erregerreservoirien können somit einfach bis sehr komplex aufgebaut sein, je nach Vernetzung der einzelnen beteiligten Populationen oder Umgebungen (Haydon et al., 2002).

Von den neu auftretenden Krankheiten beim Menschen sind 60,3% Zoonosen und 71,8% der Pathogene stammen ursprünglich von wildlebenden Tieren (Jones et al., 2008). Jones et al. (2008) gehen davon aus, dass Viren und Prionen die Ursache von 25,4% der neu auftretenden Krankheiten beim Menschen sind. Bornaviren sind einzelsträngige, nicht-segmentierte, negativ-orientierte RNA-Viren, die zu der Ordnung *Mono-negavirales* gehören, zu denen auch Viren der Gattungen *Lyssavirus*, *Henipavirus* und *Marburgvirus* gehören. Die humanpathogenen Viren dieser Gattungen verursachen unter anderem Enzephalitiden und hämorrhagische Fieber und sind charakterisiert durch ökologische Virusreservoirien. Die Reservoirien sind Wirbeltiere wie Chiroptera, Carnivora und Eulipotyphla (Mackenzie et al., 2008; Drexler et al., 2012; Blackwood et al., 2013; MacLachlan u. Dubovi, 2017). Im Sinne des disziplinübergreifenden ‚One Health‘-Ansatzes dient die Untersuchung von potentiellen Erregerreservoirien in der Natur dazu, die Übertragungswege besser zu verstehen, Risikoanalysen zu ermöglichen und somit potentiellen Zoonosen vorzubeugen.

Einige Viren wie Hantaviren und Bornaviren führen zu persistenten Infektionen in mindestens einem Teil der Population, der dann als Virusreservoir fungiert (Schlegel, 2012; Randall u. Griffin, 2017). Diese persistierenden Virusinfektionen verlaufen im Reservoir in der Regel inapparent (Randall u. Griffin, 2017). Es gibt zwei wichtige Voraussetzungen für die Viruspersistenz: Das Immunsystem des Wirtes darf das Virus nicht erkennen beziehungsweise eliminieren und das Virus muss einen nicht-zytolytischen Lebenszyklus aufweisen (Randall u. Griffin, 2017).

Bei Viren spielen koevolutionäre Mechanismen, bei denen sich Virus und Wirt gegenseitig in ihrer Evolution beeinflussen, eine große Rolle (Streicker et al., 2012; Geoghegan et al., 2017). Anhand der Untersuchungen von Infektionen mit Rhabdoviren (*Rhabdoviridae*) bei Fledermäusen konnten Streicker et al. (2012) feststellen, dass sich die WirtsbioLOGIE und das Klima in dem der Wirt lebt auf das Tempo der molekularen Evolution eines RNA-Virus auswirkt. Für ein besseres Verständnis der Virusevolution müssen also saisonbedingte und epidemiologische Dynamiken in der Wirt-Virus-Interaktion in Betracht gezogen werden (Streicker et al., 2012). Die Koevolution der Viren und ihrer Wirte kann einerseits bedingen, dass die Viren sich Mechanismen aneignen, die eine Persistenz ermöglichen. Diese können beispielsweise eine Immunevasion, eine Unterdrückung oder Veränderung der antiviralen, proinflammatorischen und zellulären Immunantwort des Wirtes oder das Auslösen von regulatorischen Reaktionen im Wirt sein. Andererseits gibt es auch Adaptationen der Wirte, um die schädlichen Auswirkungen der Viren einzugrenzen, wie das Ansprechen des Immunsystems auf Steroide oder durch genetische Wirtsfaktoren (Easterbrook et al., 2008). Die Immunantwort von Hantavirus-infizierten Nagern kann beispielsweise durch die Viren moduliert werden, indem diese die Typ-1-Interferon-Antwort im Wirt verändern (Easterbrook et al., 2008).

RNA-Viren zeichnen sich zudem durch die Übertragung über Speziesgrenzen hinweg aus (Geoghegan et al., 2017). Die Fähigkeit eines Pathogens, mehrere Wirte, insbesondere Wirte aus einer anderen taxonomischen Ordnung oder Wildtiere zu infizieren, gilt als Risikofaktor für Übertragung auf den Menschen oder z.B. auf Nutztiere. Hierfür sind vor allem RNA-Viren prädestiniert (Cleaveland et al., 2001; Woolhouse et al., 2005, Geoghegan et al., 2017). Schlegel (2012) zeigte, dass natürliche Spill-over-Infektionen bei der Evolution der Hantaviren (*Hantaviridae*) eine bedeutende Rolle spielen. Diese Spill-

over-Infektionen könnten eine erste Etappe zum Wirtswechsel beziehungsweise zu einem genetischen Reassortment darstellen (Schlegel et al., 2012). Auch das Canine Staupevirus (*Paramyxoviridae*) ist bekannt für Spill-over-Infektionen, die regelmäßig zu einem Massensterben in diversen Wildtierpopulation führen (Beineke et al., 2015).

Zu weiteren Überlebensstrategien von RNA-Viren zählen die Entstehung von verschiedenen Antigenvarianten durch hohe Mutationsraten und die Infektion über Schleimhäute, die eine langanhaltende Immunität erschwert (Randall und Griffin, 2017).

Um ein Virusreservoir zu charakterisieren und Präventionsmaßnahmen ausarbeiten zu können, geben Haydon et al. (2002) folgende praktische Empfehlungen an. In einem ersten Schritt werden epidemiologische Daten gesammelt, die auf eine Assoziation zwischen einem Reservoir und einem Endwirt hindeuten. Dies können einzelne Nachweise, sowie Informationen aus Fall-Kontroll- oder Kohortenstudien sein. In einem zweiten Schritt folgt die Bestätigung der natürlichen Infektion in der Reservoirpopulation durch ein serologisches Screening und die Isolierung des Erregers beziehungsweise von Teilen seines Genoms. Es folgen die Charakterisierung des isolierten Erregers aus dem Reservoir und der Vergleich mit Daten von Endwirten. Anhand verschiedener Methoden, wie beispielsweise durch phylogenetische Studien oder mit Hilfe von Simulationen und Modellen, kann eine potentielle Übertragung des Erregers aus dem Reservoir auf den Endwirt festgestellt und das Übertragungsrisiko abgeschätzt werden (Haydon et al., 2002; Viana et al., 2014). Um das Reservoir zu bestätigen, wird anhand von Interventionsstudien getestet, ob spezifische Maßnahmen eine Übertragung des Erregers aus dem Reservoir auf den Endwirt verhindern können (Haydon et al., 2002).

2.2 Borna Disease Virus 1 (BoDV-1) und die Bornasche Krankheit

2.2.1 Historisches und Taxonomie

Der Name der Bornaschen Krankheit (BD) geht auf einen seuchenhaften Ausbruch der Gehirn- und Rückenmarksentzündung in der sächsischen Stadt Borna in den Jahren 1894 bis 1896 zurück, bei dem mehrere hunderte Kavalleriepferde starben. Autenrieth

beschrieb schon 1823 die „hitzige Kopfkrankheit“ der Pferde und auch Wörz schrieb 1858 über die „halbakute Gehirnentzündung oder Kopfkrankheit der Pferde“ (zusammengefasst in Heinig 1969; Dürrwald u. Ludwig 1997; Richt et al., 2000). Joest und Degen vermuteten seit 1909 eine Virusätiologie der Erkrankung (Joest u. Degen, 1909, 1911). Diese Wissenschaftler führten histopathologische Untersuchungen durch und beschrieben auch zum ersten Mal die intranukleären Einschlusskörperchen, die bis heute Joest-Degensche Einschlusskörperchen genannt werden (Joest u. Degen, 1909). Zwick und Seifried (1924, 1925) konnten, gemäß den Henle-Koch-Postulaten, Viren als Ursache der Erkrankung bestätigen. Sie konnten mithilfe eines bakterienfreien Gehirnhomogenates eines an BD erkrankten Pferdes die Infektion auf ein Kaninchen übertragen (Zwick u. Seifried, 1925).

In den letzten zehn Jahren wurden aufgrund moderner molekularbiologischer Nachweismethoden und metagenomischer Analysen viele neue *Bornaviridae* bei einer Reihe Vogel-, Reptilien- und Hörnchenarten gefunden (zusammengefasst von Herden et al., 2013; MacLachlan u. Dubovi, 2017; More et al., 2017). Davor hatte sich die Forschung auf das Borna Disease Virus 1 (BoDV-1), den Erreger der Bornaschen Krankheit beim Pferd und Schaf, beschränkt. Die aviären Bornaviren wurden erstmals 2008 beschrieben und zeigen eine Homologie von weniger als 70% zu den klassischen Bornaviren der Säugetiere (Honkavuori et al., 2008, Kistler et al., 2008). Sie sind weltweit verbreitet und verursachen die neuropathische Drüsenmagendilatation bei Psittaziden. Bislang ist unklar, ob Wildvögel ein natürliches Reservoir darstellen (zusammengefasst in Herden et al., 2013, Rubbenstroth et al., 2016). 2015 kam es zu der Entdeckung eines weiteren Vertreters der *Bornaviridae*. Das neuartige Bunthörnchen-Borna-Virus 1 (VSBV-1) ist das erste Bornavirus mit belegtem zoonotischen Potential und unterscheidet sich von den bisher bekannten Säugerbornaviren (Hoffmann et al., 2015). Phylogenetische Analysen ergaben eine Nukleotidsequenzhomologie von 68% zwischen dem *Mammalian Bornavirus 1* und VSBV-1 (Hoffmann et al., 2015, Supplement). Durch die Entdeckung der neuen Bornaviren kam es 2015, 2016 und 2017 zu einer taxonomischen Reorganisation der *Bornaviridae* (Kuhn et al., 2015; Afonso et al., 2016, Amarasingue et al., 2017). Seit 2017 werden acht Spezies unterschieden: das *Mammalian 1 Bornavirus* (zu dem BoDV-1 gehört), das *Mammalian 2 Bornavirus* (mit VSBV-1 als bisher einzigen Vertreter), das *Psittaciform 1* und *2 bornavirus*, das *Passeriform 1* und *2 bornavirus*, das *Waterbird 1 bornavirus* und das *Elapid 1 bornavirus* (siehe Abb. 1). Fundamental war

auch die Entdeckung von endogenen Bornavirus-ähnlichen N-Elementen im Genom von vielen Vertebraten (Horie et al., 2010).

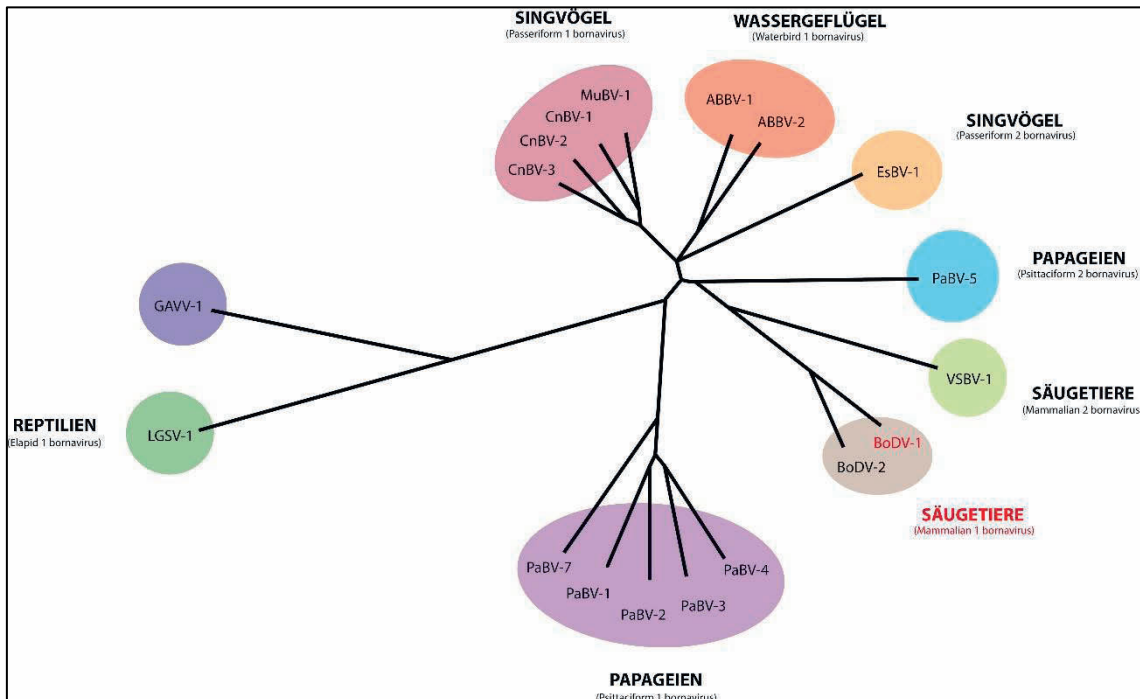


Abb. 1 Taxonomie der *Bornaviridae* (modifiziert nach Rubbenstroth et al., 2016). ABBV = Aquatic bird bornavirus, BoDV = Borna disease virus, CnBV = Canary bornavirus, EsBV = Estrildid finch bornavirus, GaVV = Gabon viper virus, LGSV = Loveridge's garter snake virus, MuBV = Munia bornavirus, PaBV = Parrot bornavirus, VSBV = Variegated squirrel bornavirus.

2.2.2 Wirtsspektrum und Epidemiologie der Bornaschen Krankheit

Pferde und Schafe sind die Hauptwirte des Virus der Bornaschen Krankheit und entwickeln eine schwere neurologische Erkrankung mit Viruspersistenz (Heinig 1969, Staeheli et al., 2000, Grabner et al., 2002, Vahlenkamp et al., 2002; zusammengefasst in Herden et al., 2013). Es können allerdings auch eine Vielzahl anderer Nutz-, Zoo-, und Haustiere mit BoDV-1 infiziert werden (zusammengefasst in Rott u. Becht, 1995; Dürrwald u. Ludwig, 1997; Staeheli et al., 2000; Herden et al., 2013). Bekannt sind Fälle von BD unter anderem bei Kaninchen (Metzler et al., 1978), Rindern (Caplazi et al., 1994), Alpakas (Jacobson et al., 2010), einem Zwergflusspferd und einem Zwergfaultier (Schüppel et al., 1994), Luchsen (Degiorgis et al., 2000) und Hunden (Weissenböck et al., 1998). Die Beschreibungen von BoDV-1-Nachweisen bei Füchsen (Dauphin et al.,

2001) und Katzen mit Staggering Disease (Lundgren et al., 1995; Wensmann et al., 2014) werden kontrovers diskutiert. Beim Menschen wurden BoDV-1-Antikörper vor allem in Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen nachgewiesen (Rott et al., 1985; Richt et al., 1997; Billich et al., 2002; Schwemmler u. Billich, 2004). Die Nachweise von BoDV-1-RNA-Sequenzen und -Antigen in humanen Blut- und Gehirnproben werden heute von der Scientific Community als Laborkontaminationen angesehen (Schwemmler et al., 1999; Billich et al., 2002; Dürrwald et al., 2007; Lipkin et al., 2011).

Die klassischen Endemiegebiete der Bornaschen Krankheit sind Regionen in Mittel- und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen und Hessen), in der Schweiz (Ostschweiz), Österreich (Vorarlberg und Steiermark) und Liechtenstein (Heinig 1969; Herzog et al., 1994; Staeheli et al., 2000; Kolodziejek et al., 2005; Dürrwald et al., 2006). In nahezu allen europäischen Ländern, aber auch außerhalb von Europa, gibt es seropositive Tiere. Vereinzelt gibt es auch klinische Fälle von BD (zusammengefasst in Staeheli et al., 2000; Herden et al., 2013). Seropositive Pferde konnten in ganz Europa (Herzog et al., 1994; Rott u. Becht, 1995; Kinnunen et al., 2007; Björnsdóttir et al., 2013), aber auch außerhalb, beispielsweise in den USA (Kao et al., 1993), Israel und Russland (Herzog et al., 1994) nachgewiesen werden. Der Nachweis von BoDV-1-RNA und -Antigen außerhalb der Endemiegebiete wird allerdings kontrovers diskutiert. Teilweise sind die Isolate identisch zu Laborisolaten aus den Endemiegebieten in Zentraleuropa, zudem können Laborkontaminationen nicht ausgeschlossen werden (Staeheli et al., 2000; Kolodziejek et al., 2005; Dürrwald et al., 2007). Teilweise sind die Fälle aber auch auf eine Infektion in einem Endemiegebiet zurückzuführen. Dies war der Fall bei einem an klinischer BD erkrankten Alpakahengst in Hessen und bei einem Pferd in England (Jacobson et al., 2010; Priestnall et al., 2011).

Die starke Sequenzkonservierung der Bornaviren (mit Ausnahme des Subtypes No/98 aus Österreich) ist sehr außergewöhnlich für RNA-Viren. Die Nukleinsäuresequenzen unterscheiden sich generell nur bis zu 5% von einander (Staeheli et al., 2000; Kolodziejek et al., 2005). Phylogenetische Analysen (1824 Nukleotide, vor allem BoDV-N, -X und -P Gene) von Feld-, Impf- und Laborstämmen beschreiben fünf verschiedene genetische Cluster des BoDV-1 innerhalb der Endemiegebiete in Mitteleuropa. Diese sind unabhängig von der Wirtsspezies (Pferd, Schaf und Esel) und dem Isolationsjahr (1985 bis 1998)

(Kolodziejek et al., 2005). Bornaviren aus dem ersten VirusCluster stammen aus Liechtenstein, Österreich, der Schweiz und dem Rheintal. Das Cluster Bayern II und Baden-Württemberg, auch He/80-Gruppe genannt, beinhaltet Viren aus Westdeutschland, vor allem aus Bayern und Baden-Württemberg aber auch aus Niedersachsen und Sachsen-Anhalt. Bornaviren aus den Endemiegebieten in Bayern bilden das Cluster Bayern I, das auch RW98 Gruppe genannt wird. Die Dessau-Gruppe besteht aus Viren aus Ostdeutschland, vor allem aus Sachsen-Anhalt. Einige Isolate der Gruppe stammen aus Thüringen, Sachsen und Hessen. Die Viren aus dem gemischten Cluster „*strain V*“ stammen aus verschiedenen Bundesländern, hauptsächlich aber aus Thüringen und Niedersachsen. Innerhalb der Cluster sind die Nukleotidsequenzen zu mindestens 96% identisch (Kolodziejek et al., 2005). Der divergente Subtyp No/98 aus der Steiermark, einem Nichtendemiegebiet in Österreich, kann keinem dieser fünf Cluster zugeordnet werden (Nowotny et al., 2000, Kolodziejek et al., 2005). Er variiert in seiner Nukleotidsequenz um mehr als 15% im Vergleich zu den bekannten mitteleuropäischen BoDV-1-Isolaten (Nowotny et al., 2000). Die rezent entdeckten Bornaviren (BoDV-1) in einem neuen Endemiegebiet in Oberösterreich lassen sich dem Cluster „*strain V*“ zuordnen. Die Sequenzhomologie zu den Viren der „*strain V*“ Gruppe beträgt zwischen 97,6% und 98,5% (Weissenböck et al., 2017).

Reichelt (2009) bearbeitete alle verfügbaren Fälle equiner Bornascher Krankheit, die bei der Tierseuchenkasse in Bayern gemeldet wurden und konnte somit einen wichtigen Beitrag zur Epidemiologie der Bornaschen Krankheit in Bayern zwischen 1990 und 2008 leisten. Als Hauptendemiegebiete in Bayern konnten Regionen in den Regierungsbezirken Mittelfranken, Oberpfalz, Oberbayern und Schwaben ausgemacht werden. Eine Verschiebung der Endemiegebiete in den Südwesten und Südosten von Bayern konnte im Zeitraum von 2000 bis 2009 beobachtet werden. Zudem stellte Reichelt eine Zunahme der BD-Fälle in der Region um Augsburg und Landshut fest. In den Oberbayerischen und Allgäuer Alpen, dem Oberallgäu, dem Berchtesgadener Land, sowie dem Bayerischen Wald und dem Fichtelgebirge wurden bis 2009 keine BD-Fälle registriert (Reichelt et al, 2009). Die Meldepflicht für die Bornasche Krankheit in Bayern wurde jedoch 2011 aufgehoben. Für die Jahre 2015 und 2016 stehen Daten von 41 Pferden mit BD aus Endemiegebieten in Bayern zur Verfügung, von denen Proben zur Diagnostik an das Institut für Virologie in Gießen geschickt wurden. Dabei handelte es sich um acht Pferde

aus Oberbayern, drei aus Niederbayern, fünf aus der Oberpfalz, zwei aus Oberfranken, vier aus Mittelfranken und 19 aus Schwaben (persönliche Mitteilung, Herzog.).

Die Inzidenz bei Pferden in Bayern lag 1998 bei 0,02% bis 0,04% (Grabner et al., 2002). Kolodziejek et al. (2005) gehen von weniger als 100 Fällen pro Jahr von BD in Mitteleuropa aus. In Deutschland sind 11,5% der Pferde seropositiv, allerdings steigt diese Zahl in Endemiegebieten auf 22,5% und in betroffenen Ställen sogar auf 50% (Herzog et al., 1994; Grabner et al., 2002).

Viele Faktoren deuten auf ein natürliches Virusreservoir für BoDV-1 hin wobei vor allem Kleinsäuger als potentielles Reservoir vermutet wurden (Staeheli et al., 2000; Degiorgis et al., 2000; Sauder u. Staeheli, 2003; Kolodziejek et al., 2005; Dürrwald et al., 2006). Dafür sprechen die fünf geographischen Cluster, und auch, dass die BD trotz zunehmendem Handel von Tieren größtenteils auf die Endemiegebiete beschränkt bleibt (Kolodziejek et al., 2005). Auch das saisonale Auftreten der BD mit Erkrankungsgipfeln im Frühjahr und Sommer (Herzog et al., 1994; Reichelt, 2009) und die säkularen Erkrankungsgipfel alle drei bis fünf Jahre sind weitere Hinweise (Dürrwald et al., 2006; Reichelt, 2009). Diese territorialen und saisonalen Faktoren, sowie das simultane Vorkommen von Erkrankungsgipfeln bei Pferden und Schafen sind kompatibel mit einem Kleinsäugerreservoir (Dürrwald et al., 2006). Schlechte Hygienebedingungen und das Halten von mehreren Tierarten auf einem Betrieb begünstigen weiterhin das Vorkommen der Bornaschen Krankheit beim Pferd (Dürrwald et al., 2006). Desweiteren wurde anhand von experimentellen BoDV-1-Infektionen bei Lewis-Ratten gezeigt, dass es zu einer horizontalen Transmission im Zuge einer Kohabitation kommen kann (Morales et al., 1988; Sauder u. Staeheli, 2003).

In der Schweiz wurde erstmals epidemiologisch eine Assoziation mit einem potentiellen Reservoir bewiesen, durch die Entdeckung von BoDV-1 in wildlebenden Feldspitzmäusen (*Crocidura leucodon*, *C. leucodon*) in der Nähe von Chur, in einem Endemiegebiet für die BD (Hilbe et al., 2006; Puorger et al., 2010). Weitere BoDV-1-positive *C. leucodon* in Endemiegebieten in Bayern und Sachsen-Anhalt für Deutschland und Oberösterreich folgten (Dürrwald et al., 2014; Nobach et al., 2015; Weissenböck et al., 2017). Weissenböck et al. (2017) beschrieben zudem das erste Mal eine BoDV-1-positive Waldspitzmaus (*Sorex araneus*, *S. araneus*). Dabei handelt es sich aber vermutlich um einen Spillover-Wirt (Weissenböck et al. 2017).

2.2.3 Charakterisierung des Erregers

Der Erreger der BD ist das Virus der Bornaschen Krankheit (Borna Disease Virus 1, BoDV-1). Es gehört zur Familie der *Bornaviridae* und bildet zusammen mit den *Paramyxoviridae*, den *Filoviridae* und den *Rhabdoviridae* die Ordnung der *Mononegavirales*. Wie viele Vertreter der *Mononegavirales* zeichnet sich das BoDV-1 durch seinen neurotrophen Charakter im Endwirt aus (Carbone et al., 1987; Herden et al., 2013, Tizard et al., 2016). Bornaviren sind sphärische, behüllte Viren, die eine Größe zwischen 80 bis 100 nm aufweisen (Danner und Mayr, 1979; Richt et al., 1993, Kohno et al., 1999). Der Aufbau eines Viruspartikels ist in Abb. 2 dargestellt.

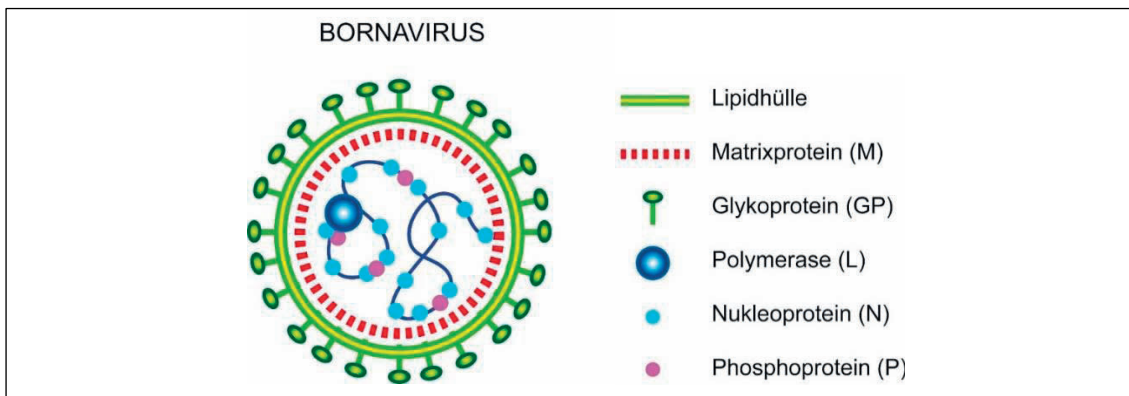


Abb. 2 Virus der Bornaschen Krankheit

Bornaviren besitzen ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom (ssRNA) von negativer Polarität. Die genomische RNA weist eine Größe von 8,9 Kilobasen auf (De la Torre, 1994, Kohno et al., 1999). Bornaviren sind zellassoziiert und replizieren sich im Gegensatz zu anderen Vertretern der Ordnung *Mononegavirales* im Zellkern der infizierten Zellen (Briese et al., 1992, De la Torre, 1994, Übersicht bei Tizard et al., 2016). Die Gen-Expression ist komplex reguliert. Im Gegensatz zu anderen Viren mit ssRNA haben Bornaviren keine intergenischen Regionen und zeichnen sich durch überlappende offene Leserahmen (Open reading frames, ORF's) aus. Es gibt drei Transkriptionseinheiten und sechs ORF's, welche für die viralen Proteine kodieren. Das Nukleoprotein BoDV-N (ORF I) existiert in zwei Isoformen p38 (38 kDa) und p40 (40 kDa). Pypers und Clement (1994) zeigten, dass BoDV-N 50% der Proteine in den Virionen darstellen. Weitere virale Proteine sind das Phosphoprotein BoDV-P (ORF II), das Matrixprotein

BoDV-M (ORF III), das Glykoprotein BoDV-GP (ORF IV) und das BoDV-L (ORF V) als RNA-abhängige RNA-Polymerase. Das X-Protein (ORF x1) ist ein regulatorisches Protein (De la Torre, 1994; Kiermayer et al., 2002, Poenisch et al., 2009). In Abb. 3 ist die Genomorganisation graphisch dargestellt. Weitere einzigartige Strategien von Bornaviren sind das Überlesen von Transkriptionsterminationsignalen und das alternative Spleißen (Tomonaga et al., 2002). Die kleinste infektiöse Einheit der Bornaviren sind die helikalen Ribonukleoproteinkomplexe, die aus BoDV-N, BoDV-P, und BoDV-L sowie der viralen RNA bestehen (Cubitt et al., 1994).

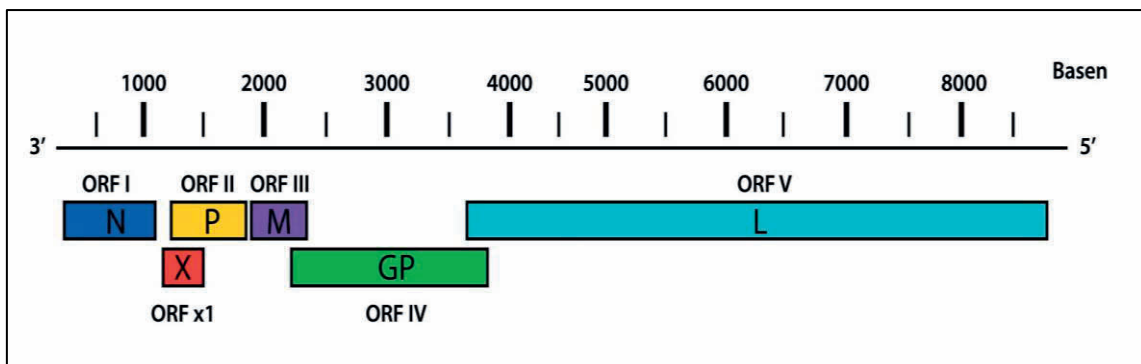


Abb. 3 Genomorganisation von Bornaviren

Eine weitere Besonderheit ist, dass die Sequenzen lokaler BoDV-1-Isolate über mehrere Jahrzehnte stabil bleiben (Kolodziejek et al., 2005, Herden et al., 2013). Zudem besteht eine für RNA-Viren ungewöhnlich hohe Sequenzhomologie zwischen den Isolaten aus natürlichen und experimentellen Infektionen (Schneider et al., 1994; Briese et al., 1994; Staeheli et al., 2000). Eine Ausnahme ist der Bornavirus-Subtyp No/98, der lediglich eine Sequenzhomologie von etwa 85% zu anderen mitteleuropäischen Isolaten aufweist (Nowotny et al., 2000) (siehe dazu auch Kapitel 2.2.2).

Horie et al. beschrieben 2010 zum ersten Mal endogene Bornavirus-ähnliche N-Elemente (EBLN, Borna-like N elements) im Genom von Nagern, Primaten, Elefanten und Menschen (Horie et al., 2010). Weitere Funde von EBLN in vielen anderen Spezies wie z.B. in Insektivoren (Spitzmäuse und Fledermäuse), Wirbellosen, Fischen und Reptilien folgten (Belyi et al., 2010; Horie et al., 2013). Außerdem wurden auch endogene Borna-ähnliche M- und L-Elemente im Genom von Vertebraten nachgewiesen (Belyi et al., 2010). Die Integration der EBLN während einer persistenten Infektion mit Bornaviren ist

speziesunabhängig und fand bei den Primaten vermutlich vor über 40 Millionen Jahren statt (Horie et al., 2010). Auch im Genom von natürlich BoDV-1-infizierten *C. leucodon* und experimentell infizierten *M. glareolus* (Rötelmäusen) konnten EBLN nachgewiesen werden wobei nicht klar ist, ob diese auch eine Genomintegration darstellen (Kinnunen et al., 2011; Dürrwald et al., 2014; Weissenböck et al., 2017) (siehe dazu auch Kapitel 2.3.2).

Bornaviren sind empfindlich gegenüber Hitze (Deaktivierung bei 56°C über 30 Minuten), Säure, UV-Strahlung und Lipidlösungsmitteln. Allerdings sind sie bei 4°C für drei Monate und bei -70°C über Jahre hinweg weiter infektiös (Danner und Mayr, 1979, Rott u. Becht, 1995, zusammengefasst in Herden et al., 2013). Bornaviren können pH-Werte von 5 bis 12 überleben (Rott u. Becht, 1995).

2.2.4 Pathogenese und Klinik der Bornaschen Krankheit bei natürlichen und experimentellen Infektionen

2.2.4.1 Natürliche BoDV-1-Infektionen bei Kleinsäugetieren

Metzler et al. (1978) berichten über eine natürliche BoDV-1-Infektion mit nicht-eitriger Meningoenzephalitis bei zwei Kaninchen mit zentralnervösen Symptomen in der Ostschweiz. Es konnten sowohl anti-BoDV-1-Antikörper im Blut und Gehirnextrakt mittels „fluoreszenzserologischer Methoden“, sowie Virusantigen im Gehirn und infektiöses Virus über die Zellkultur nachgewiesen werden (Metzler et al., 1978).

In einem dreijährigen Untersuchungszeitraum in einem Betrieb in Südostdeutschland mit dem Vorkommen von BD bei Schafen untersuchten Vahlenkamp et al. (2002) auch eine unbekannte Zahl an Mäusen. Es konnten allerdings weder virale RNA noch anti-BoDV-1-Antikörper nachgewiesen werden.

In Finnland wurden Anti-BoDV-Antikörper anhand eines Immunfluoreszenz-Tests im Serum oder Brusthöhlenexsudat bei drei von 1111 untersuchten, wildlebenden Kleinsäugetieren festgestellt. Bei den drei Tieren handelte es sich um eine Nordische Wühlmaus (*M. oeconomus*) und zwei Rötelmäuse (*M. glareolus*) (Kinnunen et al., 2007). Bei zwei von drei seropositiven Wühlmäusen konnte das Resultat mittels Peptidarray-Techniken und/oder durch Immunoblot bestätigt werden (Kinnunen et al., 2007).

In einem Endemiegebiet in der Schweiz untersuchten Hilbe et al. (2006) acht Wühlmäuse (Cricetidae), drei Spitzmäuse (Soricidae) und 87 andere Mäuse (Muridae) auf das Vorkommen von BoDV-1-Infektionen. Bei drei Feldspitzmäusen (*C. leucodon*) konnte BoDV-1-RNA und -Antigen mittels RT-PCR und Immunhistochemie (IHC) nachgewiesen werden (Hilbe et al., 2006). In diesem Endemiegebiet wurden 2010 weitere 12 Spitzmäuse, darunter sechs *C. leucodon* und sechs *S. araneus* untersucht. Auch in dieser Studie konnte BoDV-1-RNA und -Antigen mittels RT-PCR und IHC in zwei *C. leucodon* nachgewiesen werden (Puorger et al., 2010). Weder bei den *S. araneus* noch bei den anderen Kleinsäugetieren konnte eine BoDV-1-Infektion festgestellt werden. In deutschen Endemiegebieten in Sachsen-Anhalt, Thüringen, Niedersachsen und Sachsen wurden 107 Spitzmäuse mittels RT-PCR und IHC auf BoDV-1-RNA und -Antigen untersucht. Insgesamt war BoDV-1 bei 14 *C. leucodon* zu finden. Neben 58 *C. leucodon* wurden auch 28 Hausspitzmäuse (*C. russula*), 16 *S. araneus* und fünf weitere Rotzahnspitzmäuse (vier *S. minutus* und eine *S. alpinus*) untersucht, die keine Hinweise auf eine BoDV-1-Infektion zeigten (Dürwald et al., 2014).

Weissenböck et al. (2017) untersuchten in den Jahren 2015 und 2016 insgesamt 28 Spitzmäuse mittels RT-PCR und IHC in Oberösterreich. Bei den Tieren handelte es sich um neun *C. leucodon*, 13 *S. araneus*, drei *N. anomalus*, zwei *C. suaveolens* und eine *S. minutus*. Neben sechs BoDV-1 positiven *C. leucodon* wurde auch eine positive *S. araneus* festgestellt. Die restlichen Spitzmäuse wiesen keine BoDV-1-Infektion auf. Es konnte allerdings ein anderes Verteilungsmuster von BoDV-1-Antigen bei der *S. araneus* als bei den *C. leucodon* festgestellt werden (Weissenböck et al., 2017). Das BoDV-1-Antigen war hauptsächlich in den Neuronen und Gliazellen im Gehirn und in einzelnen Nervenfasern der *S. araneus* nachzuweisen. Das neuronale Muster ist ähnlich wie bei der Infektion der Endwirte und könnte auf eine Spill-over-Infektion hindeuten. Die Abwesenheit von Entzündungszeichen gibt einen Hinweis auf eine mögliche natürliche Resistenz (Weissenböck et al., 2017).

Die natürliche BoDV-1-Infektion der Feldspitzmaus und die Resultate der molekularbiologischen und immunochemischen Analysen sind im Kapitel 2.3.2 beschrieben.

2.2.4.2 BoDV-1-Infektion bei Labornagern

Experimentell können viele Kleinsäuger mit BoDV-1 infiziert werden. Kaninchen und Ratten sind hoch empfänglich für eine BoDV-1-Infektion (zusammengefasst von Heinig 1969). Auch Meerschweinchen sind sehr empfänglich und erkranken an BD, während Hamster selbst nach einer intrazerebralen Infektion keine Klinik zeigen (Rott u. Becht, 1995). Je nach genetischem Hintergrund verändert sich die Empfänglichkeit der Kleinsäuger für eine BoDV-1-Infektion. Lewis-Ratten sind hoch empfänglich für BoDV-1-Infektionen und gelten als klassisches Modell für Studien zur Immunpathogenese und Viruspersistenz (Narayan et al., 1983). Sie zeigen schwerere neurologische Krankheits-symptome als Wistar-Ratten (Rott u. Becht, 1995). Black-Hooded-(Schwarzkappen-) und Sprague-Dawley-Ratten gelten jedoch als resistent gegenüber BoDV-1-Erkrankungen (Herzog et al., 1991; Wu et al., 2013). Auch bei den Mausstämmen gibt es, je nach genetischem Hintergrund, unterschiedliche Verläufe der BoDV-1-Infektion. So erkranken z.B. MRL-Mäuse (Murphy Roths Large) schwerer als C57BL/6-Mäuse (Hallensleben et al., 1998).

Immunkompetente Lewis-Ratten, die intrazerebral mit BoDV-1 infiziert werden, erkranken an einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis aufgrund einer Hypersensibilitätsreaktion des verzögerten Typs mit Beteiligung von CD8+ und CD4+ T-Zellen (Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983; Carbone et al., 1987; Deschl et al., 1990; Richt et al. 1994; Herden et al., 2000; Stitz et al., 2002; Herden et al., 2013; Wu et al., 2013). Das Alter und der Immunstatus der Ratten, der genetische Hintergrund, die Inokulationsmethode sowie die Virulenz des Erregers bestimmen das Ausmaß der Läsionen durch die BoDV-1-Infektion (Narayan et al., 1983; Herzog et al., 1991; Herden et al., 2000; Werner-Keiřs et al., 2008; Wu et al., 2013). Der Verlauf nach der BoDV-1-Infektion ist biphasisch. In den ersten drei Wochen nach der Infektion dominiert eine Hyperaktivität, die durch massive perivaskuläre mononukleäre Infiltrate vor allem im limbischen System gekennzeichnet ist. Danach folgen Apathie und Depression als Leitsymptome der chronischen Infektion, während die entzündlichen Veränderungen im ZNS trotz Viruspersistenz rückläufig sind. Viele Tiere erblinden und es kann ein interner Hydrozephalus entstehen. (Hirano et al., 1993; Narayan et al., 1983; Rott u. Becht, 1995). Eine BoDV-1-Variante löst eine Adipositas ohne neurologische Symptome aus (Herden et al., 2000). Anti-BoDV-1-Anti-

körper können im Serum und im CSF nachgewiesen werden. Die Virusreplikation beschränkt sich auf das ZNS (Narayan et al., 1983; Carbone et al., 1987). Viele Ratten sterben innerhalb von einem bis vier Monaten, während je nach immunologischem Status 50 bis 80% überleben und Verhaltensstörungen zeigen (Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983).

Im Gegensatz zu der BoDV-1-Infektion bei immunkompetenten Ratten kommt es bei neonatal intrazerebral infizierten, thymusaplastischen oder immunsupprimierten Lewis-Ratten zu einer persistenten Infektion mit Virusausbreitung im gesamten Organismus und Virusausscheidung (Hirano et al., 1983; Herzog et al., 1984; Morales et al., 1988). Trotz eines hohen Levels an BoDV-1 im Gehirn von neonatalen Ratten werden nur eine transiente Entzündung nach der Infektion, Störungen der postnatalen Gehirnentwicklung und milde Verhaltensstörungen ausgelöst (Narayan et al., 1983; Herzog et al., 1984; Hornig et al., 1999). Virales Antigen findet sich bei den neonatal infizierten Tieren in nahezu allen peripheren Organen, auch in den Ausscheidungsorganen (Herzog et al., 1984). Zudem bilden die neonatal infizierten Ratten im Gegensatz zu den immunsupprimierten Ratten virusspezifische Antikörper (Narayan et al., 1983).

Erstaunlicherweise erkranken adulte, intrazerebral infizierte MRL-Labormäuse nicht in Folge einer BoDV-1-Infektion, während intrazerebral infizierte neonatale MRL-Mäuse vier bis sechs Wochen nach der Infektion an einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis erkranken (Hallensleben et al., 1998; Kramer et al., 2012).

Neben der intrazerebralen Infektion haben sich auch die intranasale und die intraokulare Infektion als sehr effektive Methoden zur Virusübertragung erwiesen (Carbone et al., 1987, zusammengefasst von Herden et al., 2013). Sobald das Virus Kontakt zu Nervenendigungen hat, kommt es zu einer zentripetalen, axonalen und transneuronalen Ausbreitung in Richtung Hippocampus. Dies geschieht über die olfaktorischen Nerven oder den Sehnerv beziehungsweise über die Spinalganglien, den Nucleus gracilis in der Medulla und die Pyramidalneuronen der Großhirnrinde (Carbone et al., 1987). Die intravenöse Injektion von BoDV-1 bei Lewis-Ratten konnte keine BoDV-1-Infektion auslösen (Carbone et al., 1987). Die Bedeutung der Virämie nach der Inokulation wird derzeit als gering eingestuft (Herden et al., 2013). Im Gegensatz zu BoDV-1, kann eine intravenöse Infektion mit aviären Bornaviren bei Nymphensittichen zu einer persistenten Infektion führen (Piepenbring et al., 2012).

Kinnunen et al. (2011) infizierten neonatale Rötelmäuse (*M. glareolus*) intrazerebral mit BoDV-1 (He80, rattenadaptiertes Virus). Während bei 76% der BoDV-1-infizierten Rötelmäuse keine klinischen Symptome festgestellt wurden, zeigten die restlichen Tiere (26%) neurologische Verhaltensstörungen wie Tremor, Ataxie und eine Hyperaktivität in unterschiedlich starken Ausprägungen. Bei 41% der Rötelmäuse kam es zu einer Seroconversion und bei allen wurde BoDV-1-RNA und -Antigen im Gehirn nachgewiesen. Es gab keine relevanten histopathologischen Veränderungen. Die BoDV-1-Infektion der intrazerebral infizierten Rötelmäuse war primär neurotrop, breitete sich aber zentrifugal auch in periphere Nerven und Ganglien aus. Bei 17% der infizierten Tiere konnte BoDV-1-RNA mittels RT-PCR im Urin und bei 54% im Kot nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Genomintegration von BoDV-1-Sequenzen festgestellt. Kinnunen et al. (2011) gehen daher davon aus, dass Rötelmäuse ein Reservoir darstellen können.

2.2.4.3 Natürliche BoDV-1-Infektion der Pferde und Schafe

Die natürlichen Endwirte der BD sind Pferde und Schafe. Während die BD bei Pferden eher sporadisch als Einzeltierkrankung auftritt, erkranken bei den Schafen oft mehrere Tiere aus einem Stall (Rott u. Becht, 2005). Es gibt aber auch Nachweise von BD in anderen Spezies. Das Wirtsspektrum der BD ist in Kapitel 2.2.2 genauer beschrieben.

Bei Pferden und Schafen werden perakute, akute, subakute und chronische (inapparente) Verläufe von BD unterschieden (Richt et al., 2000; Grabner et al., 2002). Reichelt (2009) stellte bei 93,1% der 451 untersuchten equinen BD Fälle in Bayern einen akuten bis subakuten Verlauf und bei 3,5% der Fälle einen perakuten Verlauf fest. Bei 3,4% der betroffenen Pferde kam es zu Spontanheilungen (Reichelt, 2009). Der schwere Krankheitsverlauf ist durch Veränderungen der Psyche, des Sensoriums sowie des Empfindungs- und Bewegungsvermögens in unterschiedlichen Ausprägungen gekennzeichnet. Die klinischen Symptome sind Fieber, Stupor, Somnolenz, Apathie, Depression, Ataxie, propriozeptive Defizite und Dysphagie (Grabner et al., 2002). Ein typisches Bild der BD ist das „Pfeifenrauchen“, das eine langsame und durch Unterbrechungen geprägte Futteraufnahme darstellt. Auch Leerkauen und ständiges Gähnen werden beobachtet. Beim Hengst und Wallach ist der Penis häufig ausgeschachtet. Im Endstadium ist mit Störungen des Gleichgewichtes und der Hirnnervenfunktionen, einem neurogenen Torticollis, Vorwärtsdrängen, konvulsiven Krämpfen, Blindheit und Koma zu rechnen (Katz et al., 1998; Grabner et al., 2002; Richt et al., 2007; Herden u. Richt, 2009). Das Krankheitsbild

der BD variiert geringgradig bei Schafen, bei denen Verhaltensauffälligkeiten und Bewegungsstörungen im Vordergrund stehen (Heinig 1969; Rott u. Becht, 1995). Die multifokale Verteilung der Läsionen im ZNS führt zu einer Variabilität der klinischen Ausprägung bei betroffenen Pferden und Schafen (Grabner et al., 2002). Sowohl bei den Pferden als auch bei den Schafen bleibt ein Großteil der Tiere mit Anti-BoDV-1-Serumantikörpern asymptomatisch (Herzog et al., 1994; Grabner et al., 2002; Herden et al., 2013).

Die natürliche Infektion erfolgt rhinogen mit dem olfaktorischen Epithel als Eintrittspforte (Heinig, 1969; Morales et al., 1988; Sauder u. Staeheli, 2003; Kupke et al., 2016). Die Inkubationszeit bei natürlich infizierten Pferden ist variabel und kann von zwei Wochen bis über mehrere Monate dauern (Rott u. Becht, 1995; Herden u. Richt, 2009). Katz et al. (1998) konnten in einem Infektionsversuch nach intrazerebraler Inokulation eine Inkubationszeit von 15 bis 26 Tagen bei drei Ponys feststellen. Sowohl die horizontale wie auch die vertikale Virusübertragung werden von einem Großteil der Autoren ausgeschlossen (Staeheli et al., 2000; Werner et al., 2000; Dürrwald et al., 2006; Herden et al., 2013; Weissenböck et al., 2017). Bei 80 bis 90% der erkrankten Pferde und bei 50% der Rinder und Schafe verläuft die Infektion in einem Zeitraum von einer bis vier beziehungsweise sechs Wochen letal (Rott u. Becht, 1995; Grabner et al., 2002; Richt et al., 2007, Herden et al., 2013).

Viele Erkenntnisse zur Pathogenese der BoDV-1-Infektion bei natürlicher BoDV-1-Infektion basieren auf Erkenntnissen aus dem Rattenmodell (Narayan et al., 1983). Die BD der Pferde und Schafe ist keine direkte Folge der Virusreplikation, sondern wird durch eine virusinduzierte, verzögerte immunpathologische Reaktion provoziert. Durch die T-Zell-vermittelte Immunpathogenese induziert die Entzündung keine Immunabwehr mit Viruseliminierung (Stitz et al., 2002). In Neuronen, Astrozyten und gelegentlich auch in Ependymzellen sowie Oligodendrozyten sind BoDV-1-Antigen und -RNA nachzuweisen (Carbone et al., 1991; Herden et al., 2000; Werner-Keišs et al., 2008; zusammengefasst in Herden u. Richt, 2009; Herden et al., 2013).

Makroskopisch können im Gehirn teilweise eine leptomeningeale Hyperämie, ein Gehirnödem und im Endstadium auch ein Hydrocephalus internus festgestellt werden (Heinig 1969; Rott u. Becht, 1995; Katz et al., 1998; Herden et al., 2013). Die histopathologischen Veränderungen sind vor allem in der grauen Gehirns substanz (Großhirnrinde, Hippocampus, Thalamus, Bulbus olfactorius, Nucleus caudatus, periventrikuläre Areale

der Medulla oblongata), der Retina und dem Rückenmark zu finden (Herden et al., 2013). Eine nicht-eitrige Poliomeningoenzephalitis und Myelitis, Immunzellinfiltrate im Parenchym, perivaskuläre Infiltrate, eine Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung und die pathognomonischen intranukleären eosinophilen Einschlusskörperchen (Joest-Degenschen-Kerneinschlusskörperchen) in den Neuronen vor allem im Hippocampus charakterisieren die BD (Joest u. Degen 1909 u. 1911). Die perivaskulären und parenchymatösen Infiltrate bestehen überwiegend aus T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+ T-Zellen) und Makrophagen mit einer Beteiligung von Plasmazellen im späten Krankheitsstadium (Deschl et al., 1990; Caplazi u. Ehrensperger, 1998; Herden et al., 1999). Sowohl auf den Entzündungszellen wie auch teilweise auf den Neuronen und Astrozyten können MHC-I- und MHC-II-Antigene dargestellt werden (Caplazi u. Ehrensperger, 1998).

2.2.5 Diagnostik der BoDV-1-Infektion

Die neurologischen Symptome sind aufgrund ihrer Variabilität nicht pathognomonisch für die BD (Grabner et al., 2002). *Intra vitam* kann die BD beim neurologisch auffälligen Pferd durch das Vorhandensein von Anti-BoDV-Antikörpern im Liquor cerebrospinalis und im Serum bestätigt werden (Grabner et al., 2002). Eine hochspezifische Methode ist dabei der indirekte Immunofluoreszenztest (IIFT), bei dem die Sensitivität bei 88% liegt (Herzog u. Rott, 1980; Herzog et al., 1994; Herden et al., 1999; Grabner et al., 2002; Fluss, 2002; Herzog et al., 2008, 2010). Neben dem IIFT stehen weitere serologische Testverfahren wie der Immunoblot oder der ELISA zur Verfügung. In der Frühphase oder nach dem Einsatz von Kortikosteroiden kann es zu falsch-negativen Resultaten kommen (Grabner et al., 2002). Die Titer der Pferdeseren liegen zwischen 1:5 und 1:1280 und die des Liquors zwischen 1:2 und 1:1024. Die Höhe der Antikörpertiter korreliert aber nicht mit der klinischen Symptomatik (Herzog et al. 1994; Grabner et al., 2002). Klinisch unauffällige Pferde können Anti-BoDV-Antikörper im Serum, jedoch nie im CSF aufweisen (Grabner et al., 2002). Der Western Blot kann die Spezifität der anti-BoDV-1-Antikörper beweisen (Herzog et al., 1994, 2008). Im Anfangsstadium kann auch eine Pleozytose im CSF ein Hinweis auf die BD sein (Grabner et al., 2002). Eine Serokonversion oder ein Titeranstieg um drei bis vier Stufen gelten auch als Nachweise für die BD (Grabner et al., 2002). Einige Autoren geben Nachweise von zirkulierenden Immunkomplexen und

von BoDV-1-Antigen und RNA in mononukleären Zellen des peripheren Blutes als Diagnosemöglichkeit an (Bode et al., 2001). Diese *ante mortem* Nachweise sind allerdings umstritten und der Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen als unspezifisch belegt (Herzog et al. 1994; Grabner et al., 2002; Wolff et al., 2006).

Post mortem wird die klinische Verdachtsdiagnose BD in erster Linie mit Hilfe der typischen histopathologischen Veränderungen sowie durch den Nachweis von BoDV-1-Antigen mit Hilfe von mono- und polyklonalen Antikörpern in der Immunhistologie oder mittels Western Blot bestätigt (Herden et al., 1999; Grabner et al., 2002; Herden et al., 2013). BoDV-1-RNA wird mit Hilfe von PCR-Methoden (RT-PCR, nested-RT-PCR und realtime RT-PCR) und der In-situ-Hybridisierung dargestellt. Die Virusisolation aus Gehirn oder Retina von infizierten Pferden rundet die Diagnostik ab (Herden et al., 1999). Die RT-PCR von Gehirnproben BoDV-1-infizierter Pferde hat eine Sensitivität von 100%, während diese bei der Virusisolierung 87% und beim RNA-Nachweis im Liquor lediglich 28% beträgt (Grabner et al., 2002). Diese Diskrepanz ist größtenteils auf den Zustand des Probenmaterials (z.B. Transportbedingungen und Probengefäße) zurückzuführen (Grabner et al., 2002).

2.3 Die BoDV-1-Infektion bei der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*)

2.3.1 Verbreitung, Lebensweise und Charakteristika der Feldspitzmaus

Die Feldspitzmaus (*C. leucodon*) gehört zu den Weißzahnspeziesmäusen (*Crocidura*) in der Ordnung der Insektenfresser (*Eulipotyphla*). Feldspitzmäuse kommen in großen Teilen Europas und im südwestlichen Asien vor (Nagel und Nagel, 2005; Kraft, 2008, Shenbrot et al., 2017). Die Verbreitung der Feldspitzmaus in Europa ist in Abb. 4 dargestellt.



Abb. 4 Verbreitung der Feldspitzmaus in Europa (modifiziert nach Shenbrot et al. 2017, IUCN)

In den flachen Landesteilen von Bayern ist die Feldspitzmaus flächendeckend und mit einer hohen Stetigkeit zu finden (Kraft, 2008). Auf Abb. 5 sind die Nachweise von *C. leucodon* in Bayern in den Jahren 1990 bis 2004 dargestellt. Es gibt eine Verbreitungslücke, die sich von Böhmen bis zu den französisch-italienischen Westalpen erstreckt und die bayrischen Alpen sowie die Gebiete südlich der oberbayrischen Seen einschließt. Der höchste Nachweisort in Bayern liegt mit 680 m ü. NN in Kaufbeuren im Ostallgäu (Kraft, 2008). In Baden-Württemberg gilt die westliche Schwäbische Alb mit 830 m ü. NN als höchster Nachweisort (Nagel u. Nagel, 2005). In Malix in der Schweiz gibt es aber auch Nachweise von Feldspitzmäusen auf 1130 m ü. NN (Hilbe et al., 2006).

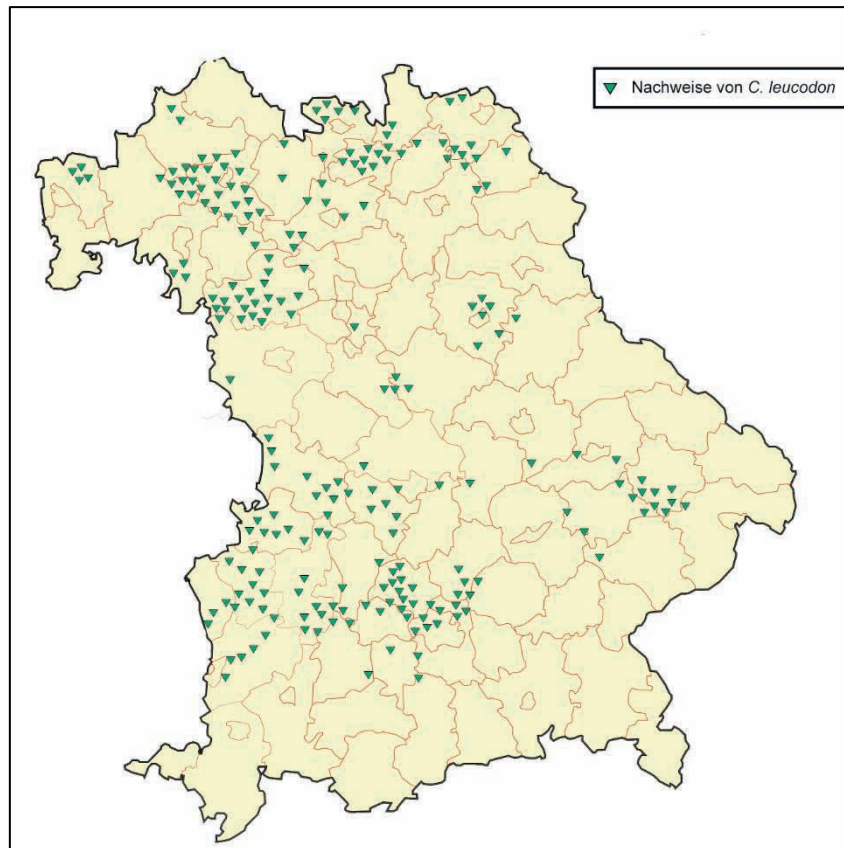


Abb. 5 Nachweise von Feldspitzmäusen in Bayern von 1990 bis 2004 (modifiziert nach Kraft, 2008)

Feldspitzmäuse bevorzugen eine schütterere Vegetation und eine hohe Sonneneinstrahlung. Sie sind an extensiv genutzte Flächen gebunden und ziehen sich vor allem im Herbst und Winter zum Schutz vor der Witterung in Ställe und Häuser zurück (Kraft 2008; Blatt u. Resch, 2107). Es besteht eine Tendenz von *C. leucodon* zur Siedlungsfolge (Kraft, 2008; Jenrich et al., 2010).

Die Feldspitzmaus ist 54 bis 82 mm groß, hat eine Schwanzlänge von 28 bis 40 mm und wiegt 6,5 bis 13 g (Kraft, 2008; Jenrich et al., 2010). Eine scharfe Farbgenze trennt die schiefergraue Oberseite von der hellen Unterseite. An den Haarspitzen ist ein metallischer Glanz zu erkennen (Jenrich et al., 2010; Blatt u. Resch, 2017). Weitere morphologische Charakteristika sind die weißlichen abstehenden Wimpernhare (3 bis 6 mm) und die aus dem Fell ragenden nackten Ohren (Kraft 2008; Jenrich et al., 2010). Auf Abb. 6 ist eine Feldspitzmaus mit ihren Charakteristika dargestellt. Der Tast- und Geruchssinn

sowie die akustischen Wahrnehmungen (inklusive Ultraschalltöne) sind gut ausgebildet, während das Sehvermögen gering ist (Churchfield 1990; Jenrich et al., 2010). Der charakteristische Geruch, der zur Kommunikation und Abwehr von Feinden dient, wird durch Hautdrüsen verursacht (Churchfield 1990). Die größte dieser Hautdrüsen ist die Flankendrüse, die sich beidseits vom Rippenbogen bis zu den Hinterläufen erstreckt und sich aus Schweiß- und Talgdrüsen zusammensetzt (Churchfield 1990).

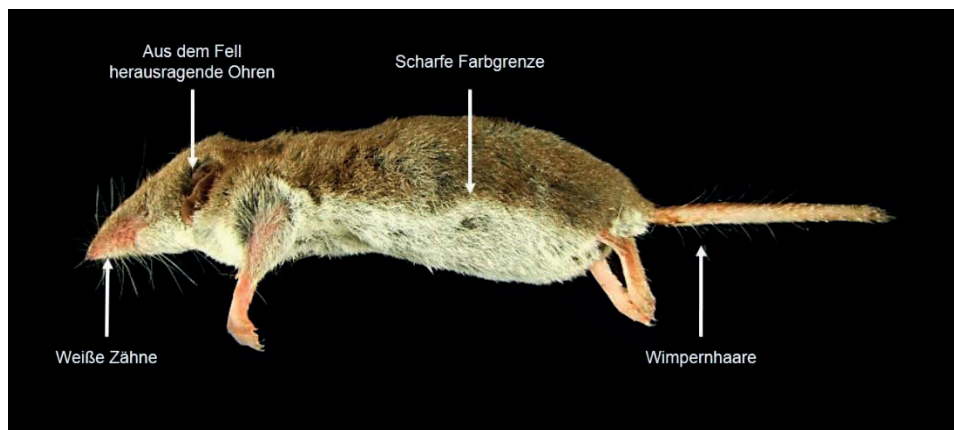


Abb. 6 Charakteristika der Feldspitzmaus (*C. leucodon*)

C. leucodon sind Einzelgänger und leben territorial. Die Reviere einzelner Individuen, die eine Größe von 60 bis 400 m² aufweisen können, überlappen sich meist deutlich. Bei einem Treffen von zwei sich unbekanntem Feldspitzmäusen kann es neben Drohgebärden sogar zu Beißereien kommen (Nagel u. Nagel, 2005). Ihre Hauptaktivität entfalten sie in den frühen Morgen- und Abendstunden (Nagel u. Nagel, 2005). Die Feldspitzmäuse ernähren sich hauptsächlich von weichhäutigen Insekten (Insecta), von deren Larven, aber auch von Schnecken (Gastropoda), Asseln (Isopoda), Spinnentieren (Arachnida) und anderen Gliederfüßern (Arthropoda), sowie von Wenigborstern (Oligochaeta) wie Regenwürmern (Lumbricidae). Teilweise werden auch kleine Wirbeltiere (Vertebrata) wie junge Spitz- oder Feldmäuse gefressen (Nagel u. Nagel, 2005).

Der natürliche Hauptfeind der Feldspitzmaus ist die Schleiereule (*Tyto alba*). Darüber hinaus stellen den Feldspitzmäusen auch andere Eulen (Strigiformes) sowie kleinere Raubtiere (Carnivora) aus den Familien der Marderartigen (Mustelidae), der Katzen (Fe-

lidae) und der Hunde (Canidae) nach (Nagel u. Nagel, 2005). Laut Naturschutzorganisation IUCN gilt die Feldspitzmaus als nicht gefährdet. In landwirtschaftlichen Regionen zählt die Ausbringung von Pestiziden und Insektiziden zu den größten Bedrohungen. Ansonsten geht auch von der allgemeinen Vernichtung und Zersiedelung der Lebensräume eine große Gefahr aus (Shenbrot et al., 2016). Nobach et al. (2015) beschreiben eine erfolgreiche Haltung und Zucht von Feldspitzmäusen, die sich durch den Zuchterfolg bis zur F2-Generation auszeichnet.

2.3.2 Natürliche BoDV-1-Infektion der Feldspitzmaus

Die ersten Nachweise einer BoDV-1-Infektion in *C. leucodon* stammen aus einem Endemiegebiet in der Schweiz (Hilbe et al., 2006). Bei drei *C. leucodon* aus Malix, in der Gegend von Chur, konnte im Gehirn und im Herz BoDV-1-RNA und -Antigen mittels RT-PCR und Immunhistologie (IHC, mit Antikörpern gegen BoDV-N und BoDV-P) nachgewiesen werden. Die Virussequenz einer *C. leucodon* entsprach zu 99,9% der Sequenz eines an BD verstorbenen Pferdes aus der gleichen Gegend über eine Länge von 2041 Nukleotiden. Damit sind das BoDV-N, -X und -P des Genoms abgedeckt (Hilbe et al., 2006).

Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zwischen 2004 und 2006 weitere sechs *C. leucodon*, davon zwei weitere BoDV-1-positive Tiere, aus Seewis, in der Nähe von Chur in der Schweiz, untersuchen (Puorger et al., 2010). Dabei konnte BoDV-1-Antigen in der IHC mit zwei monoklonalen Antikörpern (gegen BoDV-N und BoDV-P) im zentralen (ZNS) sowie im peripheren Nervensystem (PNS) nachgewiesen werden. Das Antigen befand sich nicht nur in den Neuronen sondern auch in den Oligodendrozyten, Astrozyten, im Neuropil und in den Purkinjezellen. Auch im Sehnerv konnte virales Antigen detektiert werden. In der Peripherie war das Virus-Antigen in den Tubuluszellen der Niere, Hepatozyten, Leydigzellen, Myokardzellen, Epithelzellen der Epidermis, Speichel- und Talgdrüsen, im Übergangsepithel der Urethra und im bronchiolären Epithel in der Lunge zu finden. Nicht aufgeführt waren Informationen zum BoDV-1-Antigen in mesenchymalen Zellen (glatte Muskulatur, Bindegewebe).

Die beiden BoDV-1-infizierten Feldspitzmäuse zeigten keine histopathologischen Veränderungen im ZNS oder den Organen. BoDV-1-RNA wurde mittels RT-PCR im Gehirn, in

der Niere, in der Leber, in der Lunge und im Herzen nachgewiesen. Die Haut und der Urin wurden negativ in der RT-PCR getestet. In Tab. 1 sind die Nachweise von BoDV-1-Antigen und -RNA in den jeweiligen Organen dargestellt. Im Rahmen der Studie von Puorger et al. (2010) wurde keine serologische Untersuchung oder In-situ-Hybridisierung durchgeführt. Die Sequenzierung über 1824 Nukleotide beinhaltete die Gene BoDV-N, X und P. Die Analyse der Sequenzen von zwei Feldspitzmäusen und einem Schaf aus demselben Betrieb ergab eine Differenz von lediglich sechs bis neun Nukleotiden zwischen den beiden Spezies und zwischen den beiden Feldspitzmäusen (Puorger et al., 2010).

Dürwald et al. (2014) fanden in Sachsen-Anhalt 14 BoDV-1-positive *C. leucodon*. Insgesamt wurden 107 Spitzmäuse, davon 58 *C. leucodon*, untersucht. Es gab keine histopathologisch relevanten Befunde bei den positiven Tieren. BoDV-1-Antigen konnte mittels IHC im ZNS und PNS, im Bronchialepithel, im Speicheldrüsenepithel, im exokrinen Pankreas, in den Epithelzellen der Maulhöhle, in den Keratinozyten, im Haarfollikel-epithel, in der glatten Muskulatur (auch im Darm), im Myokard, in der Skelettmuskulatur und im Fettgewebe bei 12 der 14 *C. leucodon* detektiert werden. In den anderen Organen, außer in einigen Hepatozyten, konnten Dürwald et al. (2014) kein BoDV-1-Antigen nachweisen. Mittels RT-PCR konnte bei 12 der 14 *C. leucodon* BoDV-1-RNA im Gehirn, im Herz, in der Lunge, Leber und Milz, im Magendarmtrakt und in der Harnblase festgestellt werden. Dürwald et al. (2014) konnten allerdings bei zwei Feldspitzmäusen BoDV-1-RNA nur im Gehirn, im Magen und in der Lunge amplifizieren. Bei diesen zwei Feldspitzmäusen konnte auch kein Antigen mittels IHC nachgewiesen werden. In der Tab. 1 ist eine Übersicht über die positiven Befunde bei den Feldspitzmäusen zu finden. Auch in dieser Studie konnte die BoDV-1-Sequenz der *C. leucodon* über 1824 Nukleotide, die Gene für BoDV-N, X und P komplett abdecken, mit anderen BoDV-1-Isolaten aus der Region verglichen werden. Es konnte eine hohe Sequenzhomologie zwischen den *C. leucodon* und BoDV-1-infizierten Pferden aus der gleichen Region festgestellt werden. Dürwald et al. (2014) konnten zum ersten Mal BoDV-1 N Elemente im Genom von natürlich infizierten *C. leucodon* nachweisen. Insgesamt konnte bei drei der 14 BoDV-1 infizierten *C. leucodon* eine Genomintegration des Virus festgestellt werden (Dürwald et al., 2014).

In Oberösterreich wurden von 2015 bis 2016 insgesamt 28 Spitzmäuse untersucht (Weissenböck et al., 2017). Bei sechs von neun untersuchten *C. leucodon* konnte eine BoDV-1-Infektion festgestellt werden. Virales Antigen konnte mittels IHC (mit Antikörpern gegen BoDV-N) im Gehirn, im PNS, in der Epidermis, den Speicheldrüsen, dem Bronchialepithel, in der glatten Muskulatur, im Myokard und im Fettgewebe detektiert werden. In der Leber, den Nieren, der Milz und der Lunge konnte kein BoDV-1-Antigen nachgewiesen werden. Bei keinem der Tiere wurden entzündliche Veränderungen im Gehirn oder den Organen mittels histologischer Untersuchung gefunden. Der Vergleich von Nukleotidsequenzen von vier an BD-erkrankten Pferden und sieben Spitzmäusen aus der Region in Oberösterreich ergab eine Homologie von 99,6% bis 99,9%. Die Sequenz über 1824 Nukleotide, die BoDV-N, -P und -X abdeckt, zeigt die stärkste Homologie (97.6% bis 98.5%) zum Cluster „*strain V*“, der vor allem Thüringen und Niedersachsen in Deutschland abdeckt. Weissenböck et al. (2017) verzeichnen zudem eine Integration von Borna-ähnlichen N und P Elementen in das Genom von zwei BoDV-1-infizierten *C. leucodon* (Weissenböck et al., 2017).

Tab. 1 Nachweise von BoDV-1-Antigen und -RNA bei *C. leucodon*

Organ	BoDV-1-Antigen-Nachweis (IHC)*	RNA-Nachweis (PCR)	Referenz
Gehirn	Neurone, Purkinjezellen, Neuropil, Astrozyten, Oligodendrozyten	Ja	Hilbe et al. (2008), Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014), Weissenböck et al. (2017)
Periphere Nerven	Nervenfasern	Ja	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014), Weissenböck et al. (2017)
Auge	Sehnerv, Neurone	Ja	Puorger et al. (2010)
Nase	Respiratorisches u. olfaktorisches Epithel	Nein	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014)
Lunge	Bronchialepithel	Ja	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014), Weissenböck et al. (2017)
Herz	Myokardiozyten	Ja	Hilbe et al. (2006), Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014), Weissenböck et al. (2017)
Niere	Tubuluszellen	Ja	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014)
Nebenniere	Medulläre Zellen	Nein	Puorger et al. (2010)
Leber	Hepatozyten	Ja	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014)
Penis	Epithelzellen	Nein	Puorger et al. (2010)
Hoden	Leydigzellen	Nein	Puorger et al. (2010)
Nebenhoden	Myoepitheliale Zellen	Nein	Puorger et al. (2010)
Urethra	Übergangsepithel	Nein	Puorger et al. (2010)
Blase	Epithelzellen	Ja	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014)
Uterus	Myoepitheliale Zellen	Nein	Puorger et al. (2010)
Milz	/	Ja	Dürrwald et al. (2014)
Speicheldrüsen	Epithelzellen, myoepitheliale Zellen	Nein	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014), Weissenböck et al. (2017)
Magen	Hauptzellen	Ja	Dürrwald et al. (2014)
Darm	glatte Muskelzellen, Zellen des Plexus myentericus u. submucosus	Ja	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014)
Pankreas	Drüsenzellen	Nein	Dürrwald et al. (2014)
Maulhöhle	Epithelzellen	Nein	Dürrwald et al. (2014)
Skelettmuskulatur	Muskelzellen	Nein	Dürrwald et al. (2014)
Glatte Muskulatur	Muskelzellen	Nein	Weissenböck et al. (2017)
Fettgewebe	Fettzellen	Nein	Dürrwald et al. (2014), Weissenböck et al. (2017)
Haut	Epidermis (v.a. Keratinozyten)	Ja	Puorger et al. (2010), Dürrwald et al. (2014), Weissenböck et al. (2017)
Talgdrüsen	Drüsenzellen	Nein	Puorger et al. (2010)
Haarfollikel	Epithelzellen	Nein	Dürrwald et al. (2014)
Blutgefäße	Glatte Muskelzellen	Nein	Dürrwald et al. (2014)

*IHC mit Antikörpern gegen BoDV-N und BoDV-P bei Hilbe et al. (2006), Puorger et al. (2010) und Dürrwald et al. (2014). Immunhistologie mit Antikörpern gegen BoDV-N bei Weissenböck et al. (2017)

2.4 BoDV-1-Infektion bei kleinen Karnivoren

2.4.1 BoDV-1-Infektionen bei kleinen Karnivoren mit Augenmerk auf den Rotfuchs (*Vulpes vulpes*)

2.4.1.1 Verbreitung und Lebensweise des Rotfuchses

Rotfüchse (*Vulpes vulpes*) haben ein großes geographisches Verbreitungsgebiet und kommen in ganz Europa mit Nachweisgebieten von 3000 m ü. NN vor (Dieterlen, 2005).



Abb. 7 Verbreitung des Rotfuchses in Europa (modifiziert nach IUCN 2017)

Neben Füchsen sind in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen noch Dachse (*Meles meles*), Hermeline (*Mustela erminea*), Mauswiesel (*Mustela nivalis*), Waldiltise (*Mustela putorius*), Fischotter (*Lutra lutra*), Amerikanische Nerze (*Mustela vison*), Baummarder (*Martes martes*), Steinmarder (*Martes foina*), Wildkatzen (*Felis silvestris*), Marderhunde

(*Nyctereutes procyonides*) und Waschbären (*Procyon lotor*) heimisch. In Teilen Bayerns und Baden-Württembergs kommen neben den kleinen Karnivoren auch Luchse (*Lynx lynx*) und Wölfe (*Canis lupus*) vor (Dieterlen, 2005).

Beim Rotfuchs ist die Variabilität der Streifgebietsgrößen aufgrund seiner großen Verbreitung und des genetischen Polymorphismus groß. Territorien sind „private“ Streifgebiete, die gegen Artgenossen verteidigt werden (Macdonald, 1993). Die durchschnittliche jährliche Streifgebietsgröße für Rotfüchse in Mecklenburg-Vorpommern beträgt $177,22 \pm 36,82$ ha (Zoller, 2010). Allgemein reichen die Größenangaben von zehn ha in den urbanen Bereichen bis zu Streifgebietsgrößen zwischen 50 und 500 ha (Durchschnitt 40 ha) in gemäßigten klimatischen Bereichen außerhalb städtischer Ballungszentren (Macdonald, 1993).

Als Nahrungsopportunisten stellen Füchse keine großen Anforderungen an ihren Lebensraum. Sie leben in Wäldern, auf Äckern und im Grasland und ziehen immer mehr Richtung Siedlungsgebiete, wo sie von anthropogenen Ressourcen profitieren (Macdonald, 1993; Contesse et al., 2004). Füchse ernähren sich hauptsächlich von reichlich vorhandenen Nagetieren, insbesondere von Feldmäusen (Lanszki u. Heltai, 2002; Kidawa u. Kowalczyk, 2011). Mehrere Autoren beschreiben Funde von Spitzmausüberresten in Fäzes von Füchsen (Kauhala et al., 1998; Lanszki u. Heltai 2002, Padial et al., 2002). Dachse (*Meles meles*) ernähren sich hauptsächlich von Wirbellosen, können sich aber in Zeiten der Nahrungsknappheit auch von Spitzmäusen ernähren (Kauhala et al., 1998). Auch bei Iltissen und Wieselstehen Spitzmäuse auf dem Speiseplan (Dieterlen, 2005). Es gibt demzufolge regelmäßig Kontaktpunkte zwischen kleinen Karnivoren und Feldspitzmäusen.

Die Erhebung von serologischen Daten ist ein wirkungsvolles Mittel um die Gesundheit in den Wildtierpopulationen zu überwachen (Åkerstedt et al., 2010; Gilbert et al., 2013).

2.4.1.2 Natürliche BoDV-1-Infektion bei kleinen Karnivoren

Es gibt nur wenige Literaturdaten über BoDV-1-Infektionen bei kleinen Karnivoren, zudem werden einige Berichte kontrovers diskutiert. Bei Untersuchungen von Rotfüchsen in Frankreich konnte bei sechs von 59 Füchsen BoDV-1-RNA mittels nested-RT-PCR festgestellt werden (Dauphin et al., 2001). Diese Resultate waren allerdings von anderen

Arbeitsgruppen nicht reproduzierbar. Es wurden auch vier Hunde mittels nested-RT-PCR auf BoDV-1 getestet. Diese wiesen kein Anzeichen einer BoDV-1-Infektion auf (Dauphin et al., 2001). Bei einer zweijährigen Husky-Hündin aus Vorarlberg, einem Endemiegebiet in Österreich, die an einer schweren, nicht-eitrigen Meningoenzephalitis erkrankt war, wurden BoDV-1-RNA und -Antigen mittels nested-RT-PCR, Immunohistologie (IHC, monoklonale Antikörper gegen BoDV-N) und In-situ-Hybridisierung (ISH) im Gehirn detektiert. Die Nukleotidsequenzhomologie zwischen dem Hund, der 1994 erkrankt war, und einem an BD-erkrankten Pferd aus dem Jahr 1997 aus der gleichen Region, betrug 97% (Weissenböck et al., 1998). Auch in Japan wurde bei einem Welsh Corgi mit akuter, schwerer neurologischer Erkrankung BoDV-1 mittels nested-RT-PCR, IHC und ISH nachgewiesen. Allerdings wurde in diesem Fall keine Virussequenz veröffentlicht (Okamoto et al., 2002). In Deutschland können bei 10% der Hunde anti-BoDV-Antikörper festgestellt werden (persönliche Mitteilung, Herzog). Im nicht endemischen Finnland wiesen einer von 92 untersuchten Hunden und zwei von 283 untersuchten Katzen anti-BoDV-1 Antikörper im Serum auf (Kinnunen et al., 2007).

Immer wieder wird ein Zusammenhang zwischen einer BoDV-1-Infektion und der „Staggering disease“ bei Katzen beschrieben (Lundgren et al., 1995; De Bosschere et al., 2004; Wensman et al., 2014; Lutz et al., 2015). Lundgren et al. (1995) konnten bei Katzen, die von einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis betroffen waren, BoDV-1 mittels RT-PCR, IHC und Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) feststellen. Nowotny et al. (1995) hingegen können zwar die Präsenz von anti-BoDV-Antikörper im Serum der erkrankten Tiere bestätigen, allerdings konnte weder BoDV-1-RNA noch -Antigen im Gehirn von betroffenen Katzen nachgewiesen werden.

In Schweden wurde ein verhaltensauffälliger Luchs (*Lynx lynx*) mit einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis positiv auf BoDV-1 getestet. BoDV-1-RNA und -Antigen konnten mittels IHC, ISH und RT-PCR im Gehirn detektiert werden, allerdings wurden keine Anti-BoDV-1 Antikörper im Serum gefunden (Degiorgis et al., 2000). Die BoDV-P-Sequenz des Luchses zeigt auf dem Nukleotidlevel eine Homologie von 96,9% zu Sequenzen aus der He/80-Gruppe und 97,7% zu Sequenzen aus dem Cluster „*strain V*“.

Aus Japan wird über BoDV-1 positive Waschbären (*Procyon lotor*) berichtet, die im Zuge der Schädlingsbekämpfung untersucht wurden (Hagiwara et al., 2009). Insgesamt wie-

sen 11 von 549 mittels Antigen-ELISA untersuchten Waschbären anti-BoDV-1-Serumantikörper auf. Dieser Befund wurde mittels Western Blot bestätigt. Bei fünf untersuchten Gehirnproben der seropositiven Waschbären wurden drei mittels nested-RT-PCR positiv auf BoDV-1-RNA getestet. Die BoDV-P-Sequenzen (über 361 Nukleotide) der drei japanischen Waschbären wurden veröffentlicht. Es wurde kein Antigen-Nachweis mittels IHC durchgeführt (Hagiwara et al., 2009).

2.4.2 Ursachen von nicht-eitrigen Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren

2.4.2.1 Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren

Enzephalitiden können viral, bakteriell, parasitär oder durch Pilze und Algen bedingt sein. Auch degenerative, ischämische und hypoxische Schäden bedingt durch Vaskulitiden, Medikamente, Toxine, Autoimmunerkrankungen und Stoffwechselstörungen können Enzephalitiden begünstigen beziehungsweise auslösen (Summers et al., 1995; Love et al., 2008; Amude et al., 2010). Allerdings spielen nicht nur Erreger mit einem starken Neurotropismus, sondern auch systemische Infektionen eine Rolle (Maxie u. Sameh, 2007).

Bei Füchsen gibt es immer wieder Berichte über unklare Enzephalitiden (Green et al., 1930; Berg et al., 2007; Lempp et al., 2017). Berg et al. (2007) konnten trotz intensiver Bemühungen und der Untersuchung auf neun verschiedene Erreger keine Ursache für die nekrotisierenden Enzephalitiden bei acht Polarfüchsen (*Vulpes lagopus*) finden. In Norddeutschland konnten kürzlich bei neun von 79 untersuchten Füchsen, bei vier von 17 Steinmardern (*Martes foina*) und bei drei von zehn Marderhunden (*Nyctereutes procyonoides*) eine Enzephalitis festgestellt werden (Lempp et al., 2017). Alle Tiere bis auf einen Marderhund zeigten histopathologisch eine gering- bis mittelgradige, multifokale, nicht-eitrige Enzephalitis. Ein Marderhund zeigte eine granulomatöse Enzephalitis. Bei keinem der Tiere konnte mittels IHC oder PCR die Ursache der Enzephalitiden geklärt werden. Einzig ein Fuchs wies einen Serumantikörper-Titer von 1:160 gegen Canine Staupeviren auf (Lempp et al., 2017). Bei den metagenomischen Untersuchungen konnten bei zwei Füchsen mit einer Meningoenzephalitis einige Reads von Anelloviren festgestellt werden. Die Bedeutung dieser Reads ist aber noch unklar (Lempp et al., 2017).

Auch bei Hunden und Katzen bleiben viele nicht-eitrige Meningoenzephalitiden ungeklärt (Hoff et al., 1981; Tipold, 1995; Callanan et al., 2002; Schwab et al., 2007; Amude et al., 2010). Schwab et al. (2007) untersuchten 56 Hunde und 34 Katzen mit ungeklärter nicht-eitriger Meningoenzephalitis auf 18 verschiedene Erreger. Die Klärung gelang bei 25% der Hunde und bei 38,2% der Katzen. Auch bei der Untersuchung von nicht-eitrigen Meningoenzephalitiden von jungen Greyhounds konnte die Ursache nicht ermittelt werden. Es wird eine familiäre Prädisposition vermutet (Callanan et al., 2002).

Das Signalement, die Anamnese, frühere Ergebnisse, die Symptomatik und die Lokalisation der Läsion im ZNS helfen oft nur wenig, um zur Diagnose zu führen (Tipold, 1995). Oft kann erst anhand der *post mortalen* Untersuchungen zwischen infektiösen und nicht infektiösen Meningoenzephalitiden unterschieden werden. Aber auch hier sind die Verteilung der Läsionen im ZNS und das Vorhandensein von Einschlusskörperchen lediglich Anhaltspunkte und keine definitiven Diagnosekriterien (Maxie u. Sameh, 2007).

2.4.2.2 Infektiöse Ursachen

Neurotrophe Viren nutzen den retrograden axonalen Transport entlang motorischer und olfaktorischer Neurone sowie den hämatogenen Weg für die Infektion des Wirtes (Maxie u. Sameh, 2007; Ludlow et al., 2015; van Riel et al., 2015). Es sind unterschiedliche virale Strategien beschrieben: das Überwinden der Blut-Hirn- beziehungsweise Blut-Liquor-Schranke, die direkte Infektion der Zellen die die Barriere ausmachen wie z.B. das Endothel, die Infektion über die Meningen und der Transport der Viren über infizierte Leukozyten, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Ludlow et al., 2015). Neurotrophe Viren lösen in der Regel nicht-eitrige Meningoenzephalitiden aus, die durch perivaskuläre mononukleäre Zellinfiltrate, Gliaproliferation, Satellitose und neuronale Degeneration charakterisiert sind (Summers et al., 1995; Maxie u. Sameh, 2007).

Als virale Erreger von (Meningo-) Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren sind Rhabdoviren (Finnegan et al., 2012); Paramyxoviren (Van Moll et al., 1995; Frölich et al., 2000; Maxie u. Sameh, 2007; Origi et al., 2012; Denzin et al., 2013; Beineke et al., 2015), Herpesviren (Schwab et al., 2007; Widén et al., 2012); Bornaviren (Weissenböck et al., 1998); Parvoviren (Truyen et al., 1998; Schwab et al., 2007; Schaudien et al., 2010), Circoviren (Bexton et al., 2015); Flaviviren (Tipold et al., 1995; Lichtensteiger et al., 2003; Schwab et al., 2007), Arboviren (Amundson et al., 1981), Influenzaviren (Klopfleisch et

al., 2007; Reperant et al., 2008), Astroviren (Maxie u. Sameh, 2007) und Alphaviren (Blomström et al., 2010) beschrieben.

Lyssaviren, die Erreger von Tollwut, sind die bekanntesten Vertreter der Familie der Rhabdoviren. Bei den Paramyxoviren müssen neben den Caninen Staupeviren (Van Moll et al, 1995; Frölich et al., 2000; Origgi et al., 2012; Denzin et al., 2013; Beineke et al., 2015) auch Nipah-Viren als Erreger von Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren genannt werden (Maxie u. Sameh, 2007). Zu den Herpesviren, die eine Enzephalitis bei Karnivoren auslösen, gehören das Suide Herpesvirus 1, als Erreger der Aujeszky'schen Krankheit, das Canine Herpesvirus 1 (Maxie u. Sameh, 2007) und noch nicht weiter charakterisierte α -Herpesviren (Widén et al., 2012). Zu den Flavivirus-induzierten Enzephalitiden gehören z.B. die Frühsommer-Meningoenzephalitis, West-Nil-Enzephalitis und Louping Ill (Tipold et al., 1995; Wurm et al., 2000; Lichtensteiger et al., 2003; Maxie u. Sameh, 2007; Schwab et al., 2007). Bei den Arbovirus-induzierten Enzephalitiden ist das La Crosse Virus zu nennen (Amundson et al., 1981). Karnivoren können sich aber auch mit dem Japanische-Enzephalitis-Virus infizieren (Maxie u. Sameh, 2007). Schwab et al. (2007) fanden immunhistologisch im ZNS von Hunden Hinweise auf Infektionen mit dem caninem Parainfluenzavirus, einem weiteren Paramyxovirus und dem Enzephalomyokarditisvirus, einem Picornavirus. Maxie und Sameh (2007) geben zusätzlich an, dass Karnivoren empfänglich sind für das Östliche-, Westliche- und Venezolanische-Pferdenzephalomyelitis-Virus. Viren, die zu den Alphaviren gehören. Klopffleisch et al. (2007) beschreiben eine Enzephalitis durch Influenza-A-Viren (H5N1) bei einem Steinmarder. Auch Füchse können nach einer experimentellen intratrachealen Infektion mit Influenza-A-Viren eine Enzephalitis bekommen (Reperant et al., 2008). Bei Nerzen können neu entdeckte Astroviren neurologische Symptome auslösen (Blomström et al., 2010).

Bakterielle oder mykotische Infektionen sind in der Regel gekennzeichnet durch eitrige beziehungsweise granulomatöse und gelegentlich auch fibrinöse Entzündungen (Summers et al., 1995; Maxie u. Sameh, 2007). Infektionen mit *Listeria monocytogenes* beim Hund sind beschrieben (Schroeder u. van Rensburg, 1993). *Cryptococcus neoformans* ist der häufigste Erreger von ZNS-Mykosen bei Hunden (Malik et al., 1995). Dagegen wird auch eine ätiologische Beteiligung von Chlamydien an Enzephalitiden des Hundes als möglich erachtet (Werth, 1989). Bei Schwab et al. (2007) konnte allerdings mittels

IHC kein Hinweis auf Chlamydien bei Hunden mit unklarer Enzephalitis gefunden werden.

Die wichtigsten protozoären Erreger bei kleinen Karnivoren sind: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* und *Enzephalityzoon cuniculi* (Sørensen et al., 2005; Maxie u. Sameh, 2007; De Craeye et al., 2011) Diese Erreger können eine lymphohistiozytäre bis granulomatöse Enzephalitis, teils mit hochgradigen Nekrosen, induzieren. Die Protozoen *Acanthamoeba encephalitis* und *Sarcocystis canis* sowie Babesien können sporadisch eine Enzephalitis beziehungsweise zerebrale Infarkte oder Blutungen bei Karnivoren auslösen (Maxie u. Sameh, 2007). Gelegentlich wird auch die cerebrospinale Nematodiasis bei Hunden beschrieben, die durch aberrante Wanderungen von Nematoden wie beispielsweise *Angiostrongylus vasorum* verursacht werden kann (Maxie u. Sameh, 2007). Bei Katzen sind auch Meningomyelitiden durch *Gurltia paralyzans* bekannt (Goméz et al., 2010).

2.4.2.3 Nicht-infektiöse Ursachen

Nicht-infektiöse Ursachen einer Enzephalitis können angeboren beziehungsweise genetisch bedingt oder immunmediert sein. Enzephalitiden können auch als Reaktion auf thermische Schäden oder post-traumatisch auftreten.

Beim Hund gibt es eine Reihe unklarer Enzephalitiden. Die granulomatöse Meningoenzephalitis (GME) tritt vor allem bei kleinen Hunderassen, wie Terriern, Pudeln, Chihuahuas und Maltesern auf und macht 5 bis 25% der ZNS-Erkrankungen von Hunden aus (Amude et al., 2010). Zu den rassespezifischen, nekrotisierenden Enzephalitiden gehören die nekrotisierende Meningoenzephalitis (NME, „Pug-type“) und die nekrotisierende Leukoenzephalitis (NLE „Yorkshire-type“). Die NME und NLE treten gehäuft bei kleinen Hunderassen insbesondere bei Möpsen beziehungsweise Yorkshire Terriern, auf (zusammengefasst in Amude et al., 2010; Ushida et al., 2016). Histopathologisch sind die Enzephalomalazie und Enzephalitis bei der NME und NLE im Prosencephalon und teilweise im Mesencephalon zu finden, während die GME hauptsächlich im Rhombencephalon lokalisiert ist (Park et al., 2012). Es werden sowohl autoimmune als auch hereditäre Mechanismen für die Pathogenese der GME, NME und NLE diskutiert (Amude et al., 2010; Ushida et al., 2016). Immunhistologisch sind die Anteile der verschiedenen Entzündungszellen im Zuge der Enzephalitiden vergleichbar bei GME, NME und NLE,

wobei Makrophagen und CD3+ T-Zellen überwiegen (Kipar et al., 1998; Park et al., 2012). Daher wird eine ähnliche Pathogenese dieser Erkrankungen vermutet (Park et al., 2012). Bei Hunden mit einer GME oder NME wurden Autoantikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) im CSF festgestellt (Shibuya et al., 2007; Toda et al., 2007; Ushida et al., 2016). GFAP ist der Hauptbestandteil der Intermediärfilamente im Zytoplasma von Gliazellen, hauptsächlich von Astrozyten. Es wird angenommen, dass der Verlust von GFAP eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der NME und eventuell auch bei der GME spielt (Ushida et al., 2016).

Das Krankheitsbild der idiopathischen eosinophilen Meningoenzephalitis wird hauptsächlich bei Golden Retrievern und Rottweilern beschrieben (Williams et al., 2008). Das Ansprechen auf eine Steroidtherapie läßt eine immunvermittelte Erkrankung vermuten (Maxie u. Sameh, 2007). Auch bei Beaglen, Berner Sennenhunden, Boxern, Deutsch-Drahthaar und gelegentlich auch bei anderen Rassen sind steroid-responsive Meningitiden beschrieben, die durch eine nekrotisierende Vaskulitis charakterisiert sind und zu den wichtigsten entzündlichen ZNS-Erkrankungen bei jungen Hunden gehören (Tipold, 1995).

Bei dem Eisbär (*Ursus maritimus*) Knut aus dem Berliner Zoo ist der erste nicht humane Fall einer Autoimmunenzephalitis in Form einer anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis beschrieben worden (Prüss et al., 2015). Knut zeigte epileptische Anfälle, Bewusstseins- und Verhaltensstörungen und eine schwere, multifokale, lymphoplasmatische und eosinophile Panmeningoencephalomyelitis (Szentiks et al., 2014). Es konnte ein hoher Titer an anti-NMDA-Rezeptor-Antikörpern im CSF festgestellt werden (Prüss et al., 2015). Bislang ist noch unbekannt, ob diese Form der Enzephalitis auch bei Karnivoren auftreten kann.

3 Veröffentlichung 1

BOURG M, HERZOG S, ENCARNAÇÃO JA, NOBACH D, LANGE-HERBST H, EICKMANN M, HERDEN C.

Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany [letter].

Emerg Infect Dis 2013;19(12):2064–6.

LETTERS

Bicolored White-toothed Shrews as Reservoir for Borna Disease Virus, Bavaria, Germany

To the Editor: Borna disease (BD) is a fatal neurologic disorder in horses and sheep. The etiologic agent, Borna disease virus (BDV), belongs to the order Mononegavirales, which is composed of many reservoir-bound, highly pathogenic, and zoonotic viruses.

To investigate whether small mammals, especially bicolored white-toothed shrews (*Crocidura leucodon*), which act as BDV reservoirs in Switzerland (1,2), harbor BDV in disease-endemic areas in Bavaria, Germany, we screened 120 small mammals (53

from the family Cricetidae, 41 from the family Muridae, and 26 from the family Soricidae) (Table). We also determined whether BDV infections in small mammals might have different disease courses and whether shrew-to-horse virus transmission occurs.

The small mammals were captured during pest control efforts in stables in Upper Bavaria and Swabia that had a history of acute equine BD during 1997–2012. These stables also had a high probability for presence of *C. leucodon* shrews as documented by a recent distribution model (3).

BDV-specific serum antibodies were identified by using an indirect immunofluorescence test and blood samples or thoracic or abdominal effusions as described (4). Antibodies against BDV were found in 8/105

specimens (Table) at serum dilutions ranging from 1:40 for *Mus musculus* mouse #1008, 1:80 for *M. musculus* mouse #1014, 1:2,560 for *C. leucodon* shrew #5063, 1:10,240 for *C. leucodon* shrew #2001, and 1:20,480 for *C. leucodon* shrew #5017.

Amplification of viral RNA was conducted by using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) (5) or nested RT-PCR (6) on 119/120 brain samples. In 2/4 BDV-seropositive *C. leucodon* shrews (#2001 and #5017) BDV RNA was amplified from the brain. The remaining 117 mice and insectivores were negative for BDV RNA, including 6/8 BDV-seropositive animals (Table).

Histologic and immunohistochemical (IHC) analyses for detection of BDV antigen were performed for

Table. Small mammals from 7 stables tested for Borna disease virus infection, Bavaria, Germany, 1997–2012*

Stable, species	Common name	No. tested	No. positive for antibodies against BDV	No. positive for BDV RNA by RT-PCR
A				
<i>Sorex araneus</i>	Common shrew	2	0/2	0/2
<i>Mus musculus</i>	House mouse	17	2/13†	0/17
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Wood mouse	1	0/1	0/1
<i>Microtus</i> sp.	Vole	1	0/1	0/1
B				
<i>Crocidura leucodon</i>	Bicolored white-toothed shrew	1	1/1	1/1
<i>Mus musculus</i>	House mouse	2	0/2	0/2
C				
<i>Micromys minutus</i>	Harvest mouse	1	1/1	0/1
<i>Mus musculus</i>	House mouse	3	0/2†	0/3
<i>Myodes glareolus</i>	Bank vole	1	0/1	0/1
<i>Microtus</i> sp.	Vole	1	0/1	0/1
D				
<i>Microtus</i> sp.	Vole	2	0/2	0/2
E				
<i>Crocidura leucodon</i>	Bicolored white-toothed shrew	19	3/13†	1/19
<i>Crocidura russula</i>	Greater white-toothed shrew	1	0/1	0/1
<i>Sorex araneus</i>	Common shrew	3	1/3	0/3
<i>Micromys minutus</i>	Harvest mouse	1	0/1†	0/1
<i>Mus musculus</i>	House mouse	6	0/6	0/6
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Wood mouse	5	0/5	0/5
<i>Apodemus flavicollis</i>	Yellow-necked mouse	1	0/1	0/1
<i>Arvicola terrestris</i>	European water vole	1	0/1	0/1
<i>Microtus</i> sp.	Vole	34	0/32†	0/34
F				
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Wood mouse	1	0/1	0/1
<i>Myodes glareolus</i>	Bank vole	1	0/1	0/1
<i>Arvicola terrestris</i>	European water vole	7	0/6†	0/7
<i>Microtus</i> sp.	Vole	2	0/1†	0/1†
G				
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Wood mouse	3	0/3	0/3
<i>Apodemus flavicollis</i>	Yellow-necked mouse	1	0/1	0/1
<i>Arvicola terrestris</i>	European water vole	1	0/1	0/1
<i>Microtus</i> sp.	Vole	1	0/1	0/1

*BDV, Borna disease virus; RT-PCR, reverse transcription PCR.
†No blood or brain samples were available.

small mammals that had antibodies against BDV or BDV RNA. In addition, histologic and IHC analyses were used to test 36/112 small mammals negative for BDV (by indirect immunofluorescence test and RT-PCR), including 15/16 *C. leucodon* shrews from 3 stables (B, C, and E), in which BDV-positive mammals were captured. None of the small mammals showed obvious gross or histologic lesions, even in the brain.

IHC analysis was performed by using monoclonal antibody Bo18 against BDV nucleoprotein (BDV-N) as described (7). The 2/2 *C. leucodon* shrews (#2001 and #5017) harboring viral RNA had BDV antigen in the central and peripheral nervous system (brain, spinal cord, spinal trigeminal ganglia, and peripheral nerves). Immunostaining of the skin showed evidence of BDV infection, mainly in epidermal keratinocytes and sebaceous glands, as well as in squamous epithelium and connective tissue of the esophagus. In shrew #5017, renal tubuli and glomeruli, as well as nuclei of bronchiolar epithelial cells, had BDV-N. No evidence for viral antigen was found in the other 42/44 small mammals tested.

In situ hybridization was performed by using established protocols (8). Viral genomic RNA and mRNA encoding for the BDV-N gene were found in the brain, spinal cord, ganglia, parotid gland, and sebaceous glands of the skin of 2 shrews positive for BDV by RT-PCR. Thus, BDV antigen and RNA were found in nervous tissue and peripheral organs of 2 *C. leucodon* shrews, as reported for shrews in Switzerland (1,2).

Viral dissemination into peripheral organs represents a prerequisite for successful viral excretion and transmission to other susceptible species. Simultaneous detection of viral genomic RNA and mRNA can indicate viral replication and transcription in peripheral organs. RNA from brains of the 2 BDV-positive *C. leucodon*

shrews (#2001 and #5017) and from 1 horse that had BD and lived in the same stable as shrew #5017 was sequenced as described (2). Comparison of BDV sequence (GenBank accession no. KF275185) from *C. leucodon* shrew #5017 with sequence (GenBank accession no. KF275184) from the affected horse showed 100% identity in a 2,150-nt region (nt 17–2161 covering the N, X, and P genes and half of the M gene). Moreover, the BDV sequence showed 98% homology with those of the BDV isolates of the Baden-Württemberg and Bavaria II group (9).

The 2 BDV-positive shrews were trapped in April (#2001) and July (#5017) 2012 in different stables in the feeding area for hay (B for #2001) or in the storage area for feed (stable E for #5017), which probably indicates that this food was contaminated with BDV. Viral shedding in shrews might occur from skin, kidney, or gastrointestinal tract, which is similar to shedding by persistently infected, immunotolerant, neonatal Lewis rats (10).

In conclusion, BDV RNA, viral antigen, and serum antibodies against BDV were detected in 2/20 *C. leucodon* shrews, indicating that this shrew is reservoir of BDV in Bavaria. Whether seropositivity without other evidence of BDV infection indicates different courses of infection in small mammals, as known for horses, is not known and warrants further investigation. The absolute homology of shrew and equine BDV suggests successful interspecies virus transmission. Our study provides reliable evidence that *C. leucodon* shrews acts as reservoirs for BDV in disease-endemic areas in Bavaria, Germany, argues for a general role of this shrew as a reservoir for mammalian bornaviruses.

Acknowledgments

We thank R. Ulrich for providing IgG against *Suncus* sp. shrews and M. Stechele and B. Werner for help and cooperation.

**Manon Bourg, Sibylle Herzog,
Jorge A. Encarnaçao,
Daniel Nobach,
Hildburg Lange-Herbst,
Markus Eickmann, and
Christiane Herden**

Author affiliations: Justus-Liebig-University, Giessen, Germany (M. Bourg, S. Herzog, J.A. Encarnaçao, D. Nobach, H. Lange-Herbst, C. Herden); and Philipps University, Marburg, Germany (M. Eickmann)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1912.131076>

References

- Hilbe M, Herrsche R, Kolodziejek J, Nowotny N, Ehrensperger F. Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:675–7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1204.051418>
- Puorger ME, Hilbe M, Müller JP, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinsky K, et al. Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicoloured white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol*. 2010;47:236–44. <http://dx.doi.org/10.1177/0300985809351849>
- Encarnaçao JA, Herzog S, Eickmann M, Becker NI, Hermes N, Herden C. Landscape features and reservoir occurrence affecting the risk for equine infection with Borna disease virus. *J Wildl Dis*. 2013;49:860–8.
- Herzog S, Enderlein D, Heffels-Redmann U, Piepenbring A, Neumann D, Kaleta EF, et al. Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian Borna disease virus infection in psittacine birds. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2282–4. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00145-10>
- Schindler AR, Vogtlin A, Hilbe M, Puorger M, Zlinsky K, Ackermann M, et al. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes*. 2007;21:47–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2006.08.001>
- Sorg I, Metzler A. Detection of Borna disease virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissues by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:821–3.
- Herden C, Herzog S, Richt JA, Nesselner A, Christ M, Failing K, et al. Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol*. 2000;10:39–48. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00241.x>
- Werner-Keiß N, Garten W, Richt JA, Porombka D, Algemissen D, Herzog S, et al. Restricted expression of Borna

LETTERS

disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34:590-602. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00940.x>

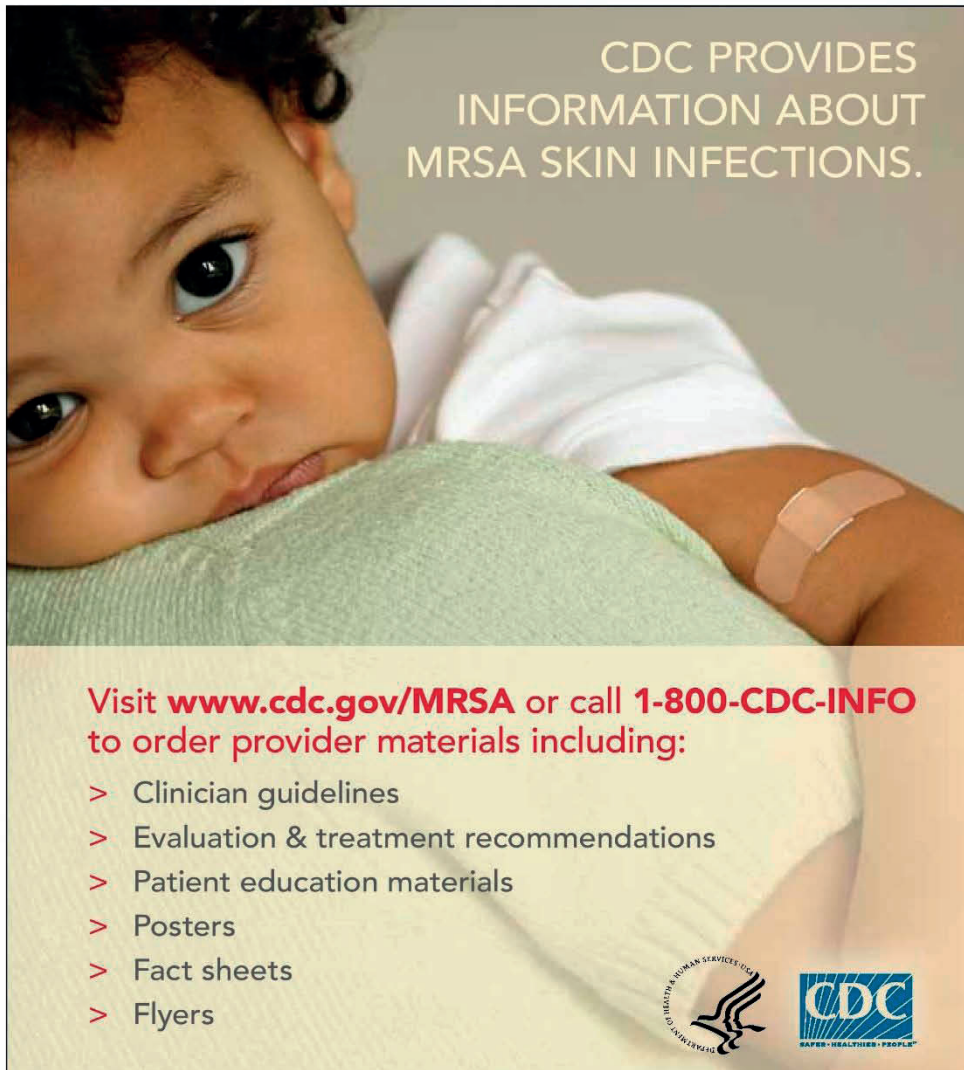
9. Kolodziejek J, Dürrwald R, Herzog S, Ehrensperger F, Lussy H, Nowotny N. Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory

and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol.* 2005;86:385-98. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80587-0>

10. Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities.

J Infect Dis. 1983;148:305-15. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/148.2.305>



Address for correspondence: Christiane Herden, Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, Frankfurter Straße 96, D-35392 Giessen, Germany; email: christiane.herden@vetmed.uni-giessen.de



CDC PROVIDES INFORMATION ABOUT MRSA SKIN INFECTIONS.

Visit www.cdc.gov/MRSA or call **1-800-CDC-INFO** to order provider materials including:

- > Clinician guidelines
- > Evaluation & treatment recommendations
- > Patient education materials
- > Posters
- > Fact sheets
- > Flyers



4 Veröffentlichung 2

BOURG M, NOBACH D, HERZOG S, LANGE-HERBST H, NESSELER A, HAMANN HP, BECKER S, HÖPER D, HOFFMANN B, EICKMANN M, HERDEN C.

Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis.

Virology Journal. 2016;13:151, doi: 10.1186/s12985-016-0608-1.

RESEARCH

Open Access



Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis

Manon Bourg¹, Daniel Nobach¹, Sibylle Herzog², Hildburg Lange-Herbst², Anne Nessler³, Hans-Peter Hamann³, Sabrina Becker¹, Dirk Höper⁴, Bernd Hoffmann⁴, Markus Eickmann⁵ and Christiane Herden^{1*}

Abstract

Background: Next to various known infectious and non-infectious causes, the aetiology of non-suppurative encephalitis in red foxes (*Vulpes vulpes*) often remains unclear. Known causes in foxes imply rabies, canine distemper, toxoplasmosis, Aujeszky's disease, as well as parvovirus, adenovirus, circovirus and flavivirus infections. In this study, particular attention was paid on bornaviruses, since red foxes are predators of bicoloured white-toothed shrews, a reservoir of Borna disease virus 1 (BoDV-1). In addition, foxes are known to be highly susceptible for viruses of the order *Mononegavirales*.

Methods: Analyses for the presence of anti-BoDV-1 antibodies, BoDV-1-RNA and antigen were performed on 225 blood and 59 brain samples, from a total of 232 red foxes. Foxes originated from BoDV-1 endemic and non-endemic German areas. Additional investigations for the presence of rabies, canine distemper, toxoplasmosis, Aujeszky's disease, parvovirus, adenovirus and flavivirus infections were carried out on 16 red foxes with non-suppurative (meningo-) encephalitis. A metagenomic analysis was used on three representative brain samples displaying encephalitis.

Results: Among 225 foxes, 37 displayed anti-BoDV-1 antibodies with titres ranging between 1:40 and 1:2560, regardless of geographic origin. In 6 out of 16 foxes with encephalitis, canine distemper virus was detected. No evidence of any of the other investigated agents was found in the 16 fox brains with encephalitis. Metagenomics revealed no infectious agents, except for one already known canine distemper case.

Conclusion: Red foxes can exhibit BoDV-1 specific antibodies without association with geographic origin or encephalitis due to bornavirus infection. The encephalitis pattern was highly conspicuous for a viral infection, but remained unclear in 10 out of 16 foxes. Thus, presently unknown infectious and non-infectious causes need to be considered and further investigated, especially since foxes also tend to occur in human proximity.

Keywords: Borna disease, BoDV-1, Red fox, Non-suppurative encephalitis, Indirect immunofluorescence test, Pan-bornavirus-RT-PCR, NGS, Canine distemper, Germany

Background

Red foxes (*Vulpes vulpes*) are known to suffer regularly from non-suppurative encephalitis. However, the underlying cause remains unclear in a remarkable number of cases, even though several infectious and non-infectious causes for encephalitis in canines are known to date. This is a known problem in other canines, felines and cattle as well [1–7]. Infectious or non-infectious causes can induce neuroinflammation. Non-infectious causes

are, for example, post-traumatic processes, autoimmune diseases, genetic and metabolic disorders or damages induced by toxic agents. In terms of infectious encephalitis, suppurative or granulomatous inflammation are usually caused by bacterial or mycotic infections. Fibrinous, haemorrhagic and mixed inflammation also tend to occur due to bacterial or viral infections. However, non-suppurative encephalitis is most commonly of viral origin [8] and characterised by perivascular mononuclear cuffing, glial proliferation and, in many cases, neuronal degeneration and satellitosis [6, 8, 9].

* Correspondence: Christiane.Herden@vetmed.uni-giessen.de

¹Institute of Veterinary Pathology, Justus Liebig University, Giessen, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

It is known that red foxes play a role in spreading pathogens which is of importance due to their adaptation to human environments and to their invasion into urban life. Thus, viral pathogens causing encephalitis with unclear pathogenic and potential zoonotic potential could represent a serious threat for humans and animals alike [10, 11]. Viral agents known to induce (meningo-) encephalitis in canines comprise *Rhabdoviridae* [12], *Paramyxoviridae* [13, 14], *Herpesviridae* [15], *Parvoviridae* [5, 16], *Flaviviridae* [5], *Arboviridae* [17], *Bornaviridae* [18] and *Circoviridae* [19]. Protozoal and bacterial agents, like *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Encephalitozoon cuniculi* and *Listeria monocytogenes* can occasionally induce widespread non-suppurative meningoencephalitis also in canines [8, 20, 21]. Next to infectious agents, non-infectious causes have been considered as well to explain unclear encephalitis in canines [6, 22].

A causative pathogen of non-suppurative encephalitis in mammals is Borna disease virus 1 (BoDV-1), which belongs to the family of *Bornaviridae* within the order of *Mononegavirales*. Infection with BoDV-1 leads to Borna disease (BD), a lethal neurological disease in accidental hosts such as horses and sheep [23]. Numerous studies have shown other mammals, including farm (cattle, goats) and companion animals (dogs), to occasionally succumb to natural BD [23, 24]. BD was also reported in free ranging animals [23, 24]. Moreover, canines, especially red foxes are highly susceptible for viruses of the order of *Mononegavirales* (*Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*), which can cause fatal neurological diseases. In addition, foxes are predators of the bicoloured white-toothed shrew *Crocidura leucodon* (*C. leucodon*), which represent a reservoir for BoDV-1 in Germany and Switzerland [25–29]. As these shrews shed the virus via various routes – including saliva, urine, faeces and skin – foxes have to be exposed to high amounts of infectious BoDV-1 during predation [29].

Knowledge on bornaviruses has expanded remarkably over the last years and new avian, reptile and mammalian bornaviruses have been found [30]. Recently, a new mammalian bornavirus (variegated squirrel 1 bornavirus, VSBV-1), found in variegated squirrels (*Sciurus variegatoides*) in Germany caused fatal encephalitis in three squirrel breeders and represented the first bornavirus with proven lethal zoonotic capacity [31]. Evidence of a highly pathogenic and zoonotic bornavirus places new demands in public health security, especially since the source of the new virus remains unknown so far. Therefore, it is vital to increase knowledge around the potential association of encephalitis cases of unknown origin in foxes with such newly discovered agents.

Reports on BoDV-1 infection in canines are sparse. In a study comprising foxes from France, viral BoDV-1 RNA was detected in 6 among 59 brains by nested PCR.

These positive results could, however, not be reproduced by others [32]. In another study from Austria, BoDV-1 infection in a 2-year-old female dog with a non-suppurative meningoencephalitis from Vorarlberg, an endemic area in Austria, was confirmed by detection of viral antigen and RNA by immunohistochemistry, in situ hybridization and nested PCR procedures, respectively. [18]. Another canine case was described in Japan, where a 3-year-old dog with a severe neurological disorder was diagnosed with clinical BD but no BoDV-1 specific sequences were published [33]. Besides, in Germany, about 10 % of the dogs display anti-BoDV-1 antibodies (personal communication S. Herzog). To our knowledge, there are no other studies on the prevalence of anti-BoDV-1 antibodies in canines. In another small carnivore, the cat, BoDV-1 is suspected to cause a severe neurological disease called “staggering disease” [34]. In other studies, BoDV-1 RNA and/or antigen was not found in respective cat material [35]. Considering the new findings in bornavirus research, reinvestigation of cat material by novel metagenomics approaches might be an option.

To sum up, red foxes can play a role in spreading pathogens (*Mononegavirales*, among others) and can have contact to reservoir species such as BoDV-1 shedding shrews due to their lifestyle [10]. However, the outcome of contact exposure with viruses such as BoDV-1 in foxes remains unknown. There is need for examination on whether foxes can represent any kind of clinically inconspicuous reservoir, spill over host or accidental host with non-suppurative meningoencephalitis. The occurrence of a new zoonotic bornavirus with unknown reservoir and origin underlines the need for further epidemiological surveys on bornavirus infection in potential contact animals. Beside this, it is important to assess so far unknown infectious and non-infectious causes for encephalitis in red foxes, a need for which this study accounts as well. As foxes are a widespread wild life species in Central Europe, also in urban areas, knowledge on the aetiology of unknown non-suppurative encephalitis in this species is of high importance.

Methods

Samples from red foxes

Brain and blood samples from wild red foxes (*Vulpes vulpes*) were collected from 2013 to 2014 in three federal states (Bavaria, Baden-Wuerttemberg and Hesse) in Germany, in collaboration with State Veterinary Institutes and private hunters, in endemic and non-endemic regions for BoDV-1. Brain samples, initially intended for rabies virus investigation, comprised parts of the hippocampus, thalamus and cerebral cortex. Private hunters were encouraged to collect blood samples in the hunting season immediately after the

foxes' death. The State Veterinary Institutes of Aulendorf (Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf, STUA), Freiburg (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, CVUA) and Giessen (Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, LHL) and private hunters in Bavaria, Baden-Wuerttemberg and Hesse collected 59 brain and 225 blood samples from 232 red foxes (*Vulpes vulpes*). Additionally, the LHL Giessen provided formalin fixed tissue sections from three red foxes with encephalitis of unknown origin (#41, #42, and #43). Blood samples were collected in serum separating tubes (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, USA and Monovettes®, Sarstedt, Germany). After visual control of complete coagulation, the serum separating tubes were deep-frozen. Overall, sample collection included road kill and foxes that were found dead. Information about age, sex and clinical signs was requested.

Serology for the detection of anti-BoDV-1 antibodies

An indirect immunofluorescence test (IIFT) detected BoDV-1-specific serum antibodies as described elsewhere [36, 37]. To sum up, after thawing, the 225 blood samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min to obtain serum. Several dilutions of sera were incubated on slides with acetone-fixed MDCK-cells (Madin-Darby canine kidney), persistently infected with BDV-H1766 (horse strain). After incubation for 30 min at 37 °C, cells were exposed for 30 min with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-dog IgG (Dianova, Germany), again at 37 °C. To confirm the specificity of the anti-BoDV-1 antibodies, sera of 8 out of 37 selected seropositive foxes underwent further western blot analysis as described by Richt et al. [38].

Histology and immunohistochemistry for the detection of BoDV-1 antigen

Tissue sections of 4 µm were routinely stained with haematoxylin and eosin and evaluated for the presence of inflammatory or degenerative lesions.

For immunohistochemistry (IHC) detecting BoDV-1 antigen, the standard avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method was used, applying a monoclonal anti-BoDV-1 antibody (Bo18) and a polyclonal anti-BoDV-1 antibody (p24), as described elsewhere [39–41]. For further detail on antigen retrieval methods, dilution and the origin of the antibodies, see Table 1. Positive controls consisted of mammals infected with the respective agent, mostly samples from infected dogs. Brain tissue of a naturally infected horse was used as a control for BoDV-1 infection.

RT-PCR assays for the detection of BoDV-1 RNA

RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction were performed using the commercially available kits QIA-symphony RNA Kit and OneStep RT-PCR kit (both Qiagen, Germany). The commercially available kit RNeasy FFPE Kit (Qiagen) was used for RNA isolation from formalin-fixed material. Amplification of BoDV-1 RNA was carried out by one-step real time RT-PCR approaches [42]. For questionable results from RT-PCR a nested PCR was applied according to existing protocols [43].

As baseline, all fox brain samples were checked for the suitability of the cDNA by a GAPDH-PCR (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-PCR). (Details of the protocols are available upon request).

Pan-bornavirus-RT-PCR

Additionally, a broad-range-bornavirus-RT-PCR was designed to cover all known mammalian and most of the

Table 1 Antibodies used for the detection of infectious agents by immunohistochemistry

Infectious agent	Abbreviation	Primary antibody	Dilution	Antigen retrieval Method	Origin of primary antibody
Borna disease virus	BoDV-1	monoclonal mouse-anti-p38 (Bo18)	1:500 ^a	None	Dr. Herzog, Giessen, Germany
Borna disease virus	BoDV-1	polyclonal rabbit- anti-p24 (p24)	1:2000 ^b	None	Dr. Richt, Kansas, USA
Canine distemper virus	CDV	monoclonal mouse-anti-CDV	1:6000 ^a	None	Dr. Örwall, Huddinge, Sweden
Porcine herpesvirus-1	SHV-1	polyclonal rabbit-anti-SHV-1	1:2000 ^b	None	Dr. Eskens, Giessen, Germany
Canine adenovirus 1	CAV-1	monoclonal anti-canine adenovirus (CAV4-1A)	1:100 ^a	Protease-induced epitope retrieval	Custom Monoclonals International Corp., USA
Canine parvovirus	CPV	monoclonal anti-parvovirus (CPV1-2A1)	1:400 ^a	Protease-induced epitope retrieval	Custom Monoclonals International Corp., USA
<i>Toxoplasma gondii</i>	None	polyclonal rabbit-anti-toxoplasma gondii	1:800 ^b	Protease-induced epitope retrieval	DAKO, Hamburg, Germany

^a in tris-buffered saline (TBS) containing bovine serum albumin (BSA) 1 %, ^b in TBS containing 20 % swine serum

avian bornaviruses. RNA was extracted using the QIAmp Viral Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Conserved nucleotide sequences of all available bornaviruses were used for primer design. Samples were analysed for the presence of bornaviruses, by amplifying a 61-bp fragment of the P-gene and the end of the X-gene using the following primer set: forward primer Borna-2048-F: 5'-CGC GAC CMT CGA GYC TRG T-3' and reverse primer Borna-2118-R: 5'-GAC ARC TGY TCC CTT CCK GT-3' (Biomers.net, Germany). The RT-reaction was performed with the QuantiTect Reverse Transcription-Kit (Qiagen) employing 1000 ng RNA and the manufacturer's primer-mix followed by PCR with the PCR Multiplex PCR kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions and a primer concentration of 0,25 pg/μl. Cycling conditions consisted in an initial activation of the Taq Polymerase at 95 °C for 15 min, followed by 45 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s, finally for 10 min. Amplified PCR-products were separated on a 2 % agarose gel with 3,6 μl/100 ml Midori-Green (Biozym, Germany) and a standard length (pUC 8 Mix Marker, Thermo Fischer Scientific, USA). The pan-bornavirus-RT-PCR constantly detected BoDV-1, parrot bornavirus 2 and 4 (PaBV-2 and PaBV-4) and VSBV-1. The sensitivity of the pan-bornavirus-RT-PCR protocol was determined by amplification of serial dilutions of PaBV-2 in purified fox control RNA (700 ng/μl) and RNase-free water, followed by agarose gel electrophoresis. The detection limit was 0,01 ng/μl PaBV-2 in 700 ng/μl fox RNA.

Methods used for the detection of other pathogens

The State Veterinary Institutes screened all brain samples for the presence of rabies virus, using an immunofluorescence test (IFT) as a standard method recommended by the WHO and OIE. Immunohistochemistry was used for the presence of antigens of canine distemper virus (CDV), porcine herpesvirus 1 (SHV-1), canine adenovirus 1 (CAV-1), canine parvovirus (CPV) and of *Toxoplasma gondii* (Table 1). The State Veterinary Institutes Giessen, Freiburg and Aulendorf routinely conducted RT-PCR assays for CDV RNA according to established protocols [44]. At the Institute of Veterinary Pathology in Giessen, a pan-flavivirus-RT-PCR protocol [45] and an adopted PCR assay for the amplification of CPV [46] was used.

Metagenomics, next generation sequencing (NGS)

Representative brain samples of three red foxes with high anti-BoDV-1 antibody titres and encephalitis were sequenced, using a MiSeq instrument [Illumina] as described before [31]. Sequence analysis with RIEMS assembled the sequences [47].

Statistical analysis

For comparison of detection of seropositive foxes in endemic and non-endemic administrative districts, a hypothesis test, the two-proportion z-test, with a significance level equal to 0.05 was used.

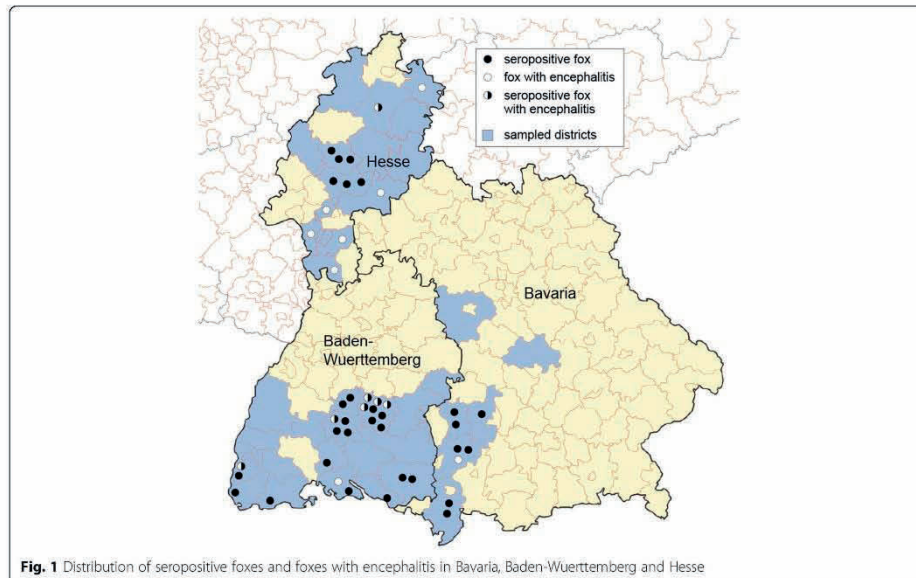
Results

Origin of fox samples

The State Veterinary Institutes and private hunters in Bavaria, Baden-Wuerttemberg and Hesse collected samples from 232 red foxes (59 brain, 225 blood samples) and formalin fixed tissue sections from three red foxes with encephalitis of unknown origin (#41, #42, and #43). Private hunters provided 81 frozen blood samples from 40 hunting districts in 10 administrative districts in Germany. Sample collection was scattered geographically, depending on the location of the State Veterinary Institutes and the private hunters involved in the study including samples from known endemic and non-endemic areas. Among 232 carnivores, 64 small carnivores originated from Bavaria (Swabia, Upper Bavaria, and Middle Franconia), 132 from Baden-Wuerttemberg (Tubingen and Freiburg) and 36 from Hesse (Kassel, Giessen and Darmstadt). See Fig. 1 for further details on the sampled districts.

Serology for detection of anti-BoDV-1 antibodies

An indirect immunofluorescence test (IIFT) was carried out for 225/232 red foxes. Among 225 foxes, 37 exhibited anti-BoDV-1 antibodies, representing a prevalence rate of 16.4 % in the investigated districts in Germany. Sera with anti-BoDV-1 antibodies caused a brilliant granular fluorescence in the nucleus of BoDV-1 infected MDCK cells. In Bavaria, 7/63 foxes displayed anti-BoDV-1 antibodies, in Baden-Wuerttemberg 23/131 and in Hesse 7/31. For an overview of results for seropositive foxes in endemic and non-endemic districts see Table 2 and Fig. 1. Statistical analysis showed the *p*-value (0.36) to be higher than the significance level (0.05), which is why the null hypothesis cannot be rejected. No statistically significant difference has been found between the detection of seropositive foxes in endemic and non-endemic areas in the investigated areas in Germany. Serum antibody titres in foxes ranged from 1:40 to 1:2560 (median 1:160). The red fox #21 with a titre of 1:2560 was an adult female from the administrative district of Reutlingen, an endemic region in Baden-Wuerttemberg. Among the 37 seropositive foxes, hunters observed no clinical symptoms in 23 canines. However, eight foxes showed signs of illness: two had a mange dermatitis and six were emaciated. No information on clinical symptoms was available for six foxes. For further details on age, gender and clinical symptoms of seropositive foxes, see Table 3.



Histology and immunohistochemistry for the detection of BoDV-1 antigen

By histology, 59 brains from red foxes were analysed. Mild to moderate autolytic changes and freezing artefacts were obvious in all cases. In total, 16/59 foxes displayed a non-suppurative encephalitis (Fig. 2). Exactly seven of the 16 foxes had a non-suppurative mononuclear meningoencephalitis and the other nine displayed a non-suppurative mononuclear encephalitis. In the 9/16 cases with encephalitis only, no meninges were present. Histopathology revealed perivascular mononuclear infiltration and microglia activation. Among 16 red foxes with encephalitis, seven displayed anti-BoDV-1

antibodies, four were seronegative and for five, no blood samples were available. The hunters noticed no signs of a neurological disorder in the foxes with encephalitis. However, no information on clinical symptoms was available for four foxes, as they were found dead. For further information on origin, age, gender and clinical symptoms of foxes with encephalitis see Table 3 and Fig. 1.

No evidence of BoDV-1 antigen was found in the foxes by immunohistochemistry. There was no detection of the viral nucleoprotein in 59 foxes using a monoclonal antibody. Among 34 foxes tested with the polyclonal serum for the detection of the viral

Table 2 Origin of fox blood samples and geographical distribution of seropositive foxes

Administrative district	Total number of fox blood samples used for IIFT			Seropositive foxes		
	Total number of blood samples	Total from endemic regions	Total from non-endemic regions	Total number of seropositive foxes	Total number of seropositives from endemic regions	Total number of seropositives from non-endemic regions
Bavaria	63	32	31	7	5	2
Baden-Wuerttemberg	131	56	75	23	12	11
Hesse	31	0	31	7	0	7
Germany	225	88	137	37	17	20

Table 3 Further investigations for the presence of BoDV-1 in seropositive foxes or foxes with encephalitis

Sample	Administrative district	Age	Sex m/f	Clinical signs	Histology	IIFT	IHC Bo18	IHC p24	BoDV-1 PCR	Pan borna virus PCR
Bavaria										
1	LKR Günzburg	adult	m	no signs	n.d.	1:160	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	LKR Günzburg	adult	m	no signs	n.d.	1:640	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	LKR Augsburg	juvenile	n.d.	no signs	n.d.	1:40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	LKR Unterallgäu	juvenile	n.d.	no signs	n.d.	1:160	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	LKR Unterallgäu	juvenile	n.d.	no signs	-	1:80	-	-	-	-
6	LKR Unterallgäu	adult	f	found dead	encephalitis ^a	<1:10	-	-	-	-
7	LKR Oberallgäu	adult	m	n.d.	n.d.	1:640	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	LKR Oberallgäu	adult	n.d.	no signs	n.d.	1:160	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Baden-Wuerttemberg										
9	LKR Waldshut	juvenile	m	road kill	-	1:160	-	-	n.d.	n.d.
10	LKR Breisgau- Hochschwarzwald	adult	f	road kill	-	1:160	-	-	-	-
11	LKR Breisgau- Hochschwarzwald	juvenile	m	found dead	meningoencephalitis	1:160	-	-	-	-
12	LKR Lörrach	adult	m	mange	-	1:40	-	-	-	-
13	LKR Tuttlingen	juvenile	n.d.	no signs	-	1:640	-	-	-	-
14	LKR Tübingen	adult	m	emaciation	-	1:160	-	n.d.	-	-
15	LKR Tübingen	adult	m	no signs	-	1:40	-	-	-	-
16	Zollernalbkreis	n.d.	n.d.	no signs	encephalitis ^a	1:160	-	-	-	-
17	Zollernalbkreis	adult	m	no signs	n.d.	1:640	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	Zollernalbkreis	juvenile	n.d.	no signs	n.d.	1:160	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	Zollernalbkreis	n.d.	n.d.	no signs	n.d.	1:640	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	LKR Reutlingen	adult	m	no signs	-	1:160	-	-	-	-
21	LKR Reutlingen	adult	f	no signs	encephalitis ^a	1:2560	-	-	-	-
22	LKR Reutlingen	adult	f	no signs	encephalitis ^a	1:160	-	-	-	-
23	LKR Reutlingen	adult	m	no signs	-	1:160	-	-	-	-
24	LKR Reutlingen	n.d.	n.d.	no signs	-	1:160	-	n.d.	-	-
25	LKR Reutlingen	juvenile	m	emaciation	-	1:160	-	n.d.	-	-
26	LKR Reutlingen	adult	m	no signs	encephalitis ^b	1:160	-	-	-	-
27	LKR Reutlingen	adult	f	emaciation	encephalitis ^a	1:160	-	-	-	-
28	LKR Ravensburg	juvenile	m	emaciation	-	1:640	-	-	-	-
29	LKR Ravensburg	adult	f	emaciation	-	1:160	-	n.d.	-	-
30	LKR Konstanz	n.d.	n.d.	n.d.	-	1:640	-	-	-	-
31	LKR Konstanz	adult	m	no signs	meningoencephalitis	<1:10	-	-	-	-
32	Bodenseekreis	adult	m	emaciation	-	1:640	-	-	-	-
33	n.d. Baden-Wuerttemberg	n.d.	n.d.	emaciation	encephalitis ^a	<1:10	-	-	-	-
Hesse										
34	LKR Gießen	adult	n.d.	no signs	n.d.	1:40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	LKR Gießen	adult	n.d.	no signs	n.d.	1:160	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
36	LKR Gießen	juvenile	n.d.	found dead	-	1:40	-	-	-	-
37	Wetteraukreis	n.d.	n.d.	no signs	-	1:160	-	-	-	-
38	Wetteraukreis	n.d.	n.d.	no signs	n.d.	1:40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Table 3 Further investigations for the presence of BoDV-1 in seropositive foxes or foxes with encephalitis (Continued)

39	Wetteraukreis	n.d.	n.d.	no signs	—	1:160	—	—	—	—
40	Schwalm-Eder-Kreis	juvenile	n.d.	mange	meningoencephalitis	1:160	—	—	—	—
41	LKR Groß-Gerau	adult	n.d.	no signs	meningoencephalitis	n.d.	—	—	—	—
42	LKR Bergstraße	adult	n.d.	found dead	meningoencephalitis	n.d.	—	—	n.d.	n.d.
43	Main-Kinzig-Kreis	adult	n.d.	no signs	meningoencephalitis	n.d.	—	—	—	—
44	Stadt Frankfurt a. M.	adult	n.d.	found dead	meningoencephalitis	n.d.	—	—	—	—
45	LKR Darmstadt-Dieburg	adult	n.d.	no signs	encephalitis ^a	n.d.	—	—	—	—
46	Werra-Meißner-Kreis	adult	n.d.	no signs	encephalitis ^a	<1:10	—	—	—	—

+ positive test result, —negative test result, n.d. not determined, ^ano meninges available

phosphoprotein, 28 were negative and six fox brains could not be considered further, due to autolytic changes.

RT-PCR assays for the detection of BoDV-1 RNA

All seropositive (for BoDV-1 antibodies) foxes as well as foxes with (meningo-) encephalitis were analysed for the presence of BoDV-1 RNA in the brain by real time RT-PCR. Among 47 foxes, 33 brain samples meeting the previously mentioned conditions were tested. Brain sample #42 failed in the DNA quality check, since GAPDH could not be amplified and was therefore not further analysed. All 32 foxes remained negative for BoDV-1 RNA, except for three cases. Foxes #40, #41 and #43 exhibited questionable results (ct values near threshold) by the applied real time RT-PCR assay. However, no BoDV-1 RNA could be amplified in the subsequent nested PCR. BoDV-1 RNA was also not found in any of the 32 fox brains using the pan-bornavirus-RT-PCR (fox #42 is excluded).

Immunohistochemistry for detection of other viral and parasitic agents

Among 16 red foxes with non-suppurative encephalitis, six were positive for canine distemper virus (CDV) by RT-PCR (#16, #21, #22, #26, #27, #33) but CDV antigen was detected only in 5/6 red foxes (Fig. 3) (#21 was negative). All CDV-positive foxes originated from Baden-Wuerttemberg,

see Table 4 for further details. Among six red foxes with CDV infection, five were also positive for anti-BoDV-1 antibodies (#16, #21, #22, #26, and #27). Brain sample #42 failed in the DNA quality check and was not used for PCR assays. The State Veterinary Institutes provided negative results for rabies virus for all 16 foxes with unclear encephalitis. All foxes with encephalitis remained negative for antigens of parvovirus, adenovirus, porcine herpesvirus 1 and *Toxoplasma gondii*. Furthermore, infection with West Nile virus (WNV), tick-borne encephalitis virus (TBEV) or any other flavivirus could not be confirmed due to 15/15 negative pan-flavivirus-RT-PCR results (fox #42 is excluded). Thus, the cause of the non-suppurative (meningo-) encephalitis remains unclear in 10/16 red foxes. See Table 4 for an overview of pathogens tested.

Metagenomics, next generation sequencing (NGS)

Among 16 foxes with (meningo-) encephalitis, three fox brains (#11, #21, #40) were further analysed by a metagenomic analysis. All three foxes displayed high anti-BoDV-1 antibody titres (1:160–1:2650) and a mild to moderate non-suppurative (meningo-) encephalitis. Foxes #11 and #21 originated from Baden-Wuerttemberg and fox #40 from Hesse. Fox #21 originated from the Swabian Alb, known to be endemic for BoDV-1. The other two foxes (#11 and #40) originated from non-endemic regions. NGS did not detect bornavirus-like sequences. No other infectious agents were obvious as cause for the encephalitis.

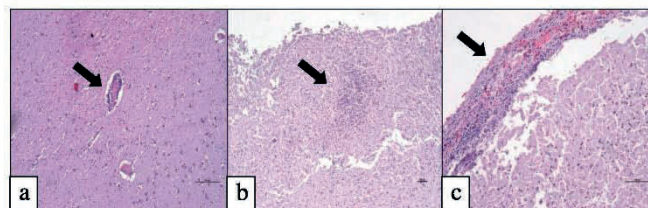
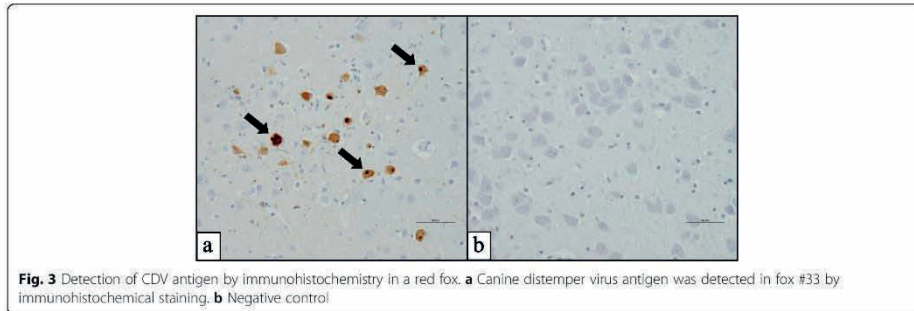


Fig. 2 Meningoencephalitis in red foxes. **a** Mononuclear perivascular cuffs in the brain. **b** Gliosis. **c** Non-suppurative meningitis



However, NGS confirmed the canine distemper virus infection of fox #21.

Discussion

The present study focusses on the aetiology of unclear non-suppurative encephalitis in red foxes (*Vulpes vulpes*) in different federal states of Germany (Bavaria, Baden-Wuerttemberg and Hesse) with in particular BoDV-1 as a possible cause. This was based upon the fact, that foxes are known predators of bicoloured white-toothed shrews, a confirmed reservoir of BoDV-1. In addition,

foxes are highly susceptible for infections with other viruses of the order *Mononegavirales*. The recent detection of a new zoonotic bornavirus in variegated squirrels [31] enhances the necessity to investigate for the presence of so far unknown agents such as VSBV-1, also in the wild, and in potential contact animals in particular.

Anthropogenic food resources play a big role in the diet of foxes living near human settlements. Therefore, population densities of foxes increase due to their opportunistic character and loss of their natural habitats [11]. This is why public health issues in general demand

Table 4 Investigation on causes for fox encephalitis other than BoDV-1

Sample	Administrative district	CDV		Rabiesvirus	SHV-1	CAV-1	Flaviviridae	CPV		<i>T. gondii</i>
		PCR	IHC	IFT	IHC	IHC	Pan flavivirus PCR	IHC	PCR	IHC
Bavaria										
6	LKR Unterallgäu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baden-Wuerttemberg										
11	LKR Breisgau-Hochschwarzwald	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Zollernalbkreis	+	+	-	-	-	-	-	-	-
21	LKR Reutlingen	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	LKR Reutlingen	+	+	-	-	-	-	-	-	-
26	LKR Reutlingen	+	+	-	-	-	-	-	-	-
27	LKR Reutlingen	+	+	-	-	-	-	-	-	-
31	LKR Konstanz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	n.d. Baden-Wuerttemberg	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hesse										
40	Schwalm-Eder-Kreis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	LKR Groß-Gerau	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	LKR Bergstraße	n.d.	-	-	-	-	n.d.	-	n.d.	-
43	Main-Kinzig-Kreis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Stadt Frankfurt a. M.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	LKR Darmstadt-Dieburg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Werra-Meißner-Kreis	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CDV canine distemper virus; SHV-1 porcine herpesvirus 1, CAV-1 canine adenovirus 1, CPV canine parvovirus
 + positive test result, -negative test result, n.d not determined

further research on the causes of non-suppurative encephalitis in animals such as foxes, as they can easily get into contact with humans, farm and pet animals. Red foxes mainly feed on abundant rodents, but in times of food shortages, they also feed on insectivores. Shrew remains in faeces of the red fox have regularly been found [48, 49]. BoDV-1 positive *C. leucodon* shrews shed high amounts of virus via skin and excretions [29] so that contact of foxes with BoDV-1 during predation is likely. The susceptibility of predators to infectious agents carried by small mammals such as BoDV-1 remains largely unknown. In principle, foxes could be resistant, develop only specific antibodies as sign of exposure, could act as spill over or accidental host, or they could become a new reservoir species. Typically, in reservoirs, the infection is clinically inconspicuous despite shedding of high amounts in virus, while in accidental hosts such as horses, sheep and recently in humans, bornavirus infection manifests itself by a strict neurotropism and progressive non-suppurative meningoencephalitis [23, 31]. Studies from experimentally infected rats revealed a T-cell mediated immunopathogenesis as key pathogenesis in diseased animals whereas in reservoir species immunotolerance mechanisms have been assumed [50–52]. This also indicates that the outcome of BoDV-1 infection differ significantly depending on the status of the immune system.

Several foxes (16/59) displayed a non-suppurative (meningo-) encephalitis highly suspicious for a viral aetiology. The hunters did not observe any neurological symptoms in 9/16 foxes with encephalitis. However, 3/16 foxes displayed signs of disease (emaciation and mange) and 4/16 foxes with encephalitis were found dead. Foxes with encephalitis originated from all three administrative districts included in the study and did therefore not follow any geographical link. Further studies in larger cohorts will have to address whether there might be hotspots for fox encephalitis in Germany. The German national rabies legislation prescribes that hunters have to shoot foxes with signs of disease or with abnormal behaviour. In addition, hunters bring more frequently carcasses of wild mammals to the veterinary inspection offices when they were found dead without signs of external trauma. Bias caused by these factors probably increased the probability to find foxes with encephalitis in this study.

By IIFT, 16.4 % of the red foxes displayed anti-BoDV-1 antibodies. Western blot analysis of 8/37 seropositive foxes confirmed the specificity of the anti-BoDV-1 antibodies. In general, endemic areas are defined by the constant presence of diseases or infectious agents in a geographic area or a population group [53]. There are no official data on endemic areas for BoDV-1 infection in Baden-Wuerttemberg, since there is no reporting

obligation and no long-term data are available. However, the Swabian Alb in Baden Wuerttemberg has already been regarded as endemic area [54]. For Bavaria, more data on BD in horses are available, due to a reporting obligation up until 2011 [55]. Due to limited sample number in the present study, the statistical comparison of seropositive foxes from endemic and non-endemic areas could only serve as a rough and global comparison providing general trends. Interestingly, the presence of BoDV-1 specific serum antibodies in foxes did not correlate with their origin from endemic areas, represented by a no significant difference between detection of seropositive foxes in endemic and non-endemic areas ($p > 0.05$).

The administrative district of Swabia in Bavaria is endemic for BoDV-1 infection containing populations of BoDV-1 shedding *C. leucodon* [27, 29]. In Swabia, seven red foxes were positive for anti-BoDV-1 antibodies. At the Swabian Alb in Baden-Wuerttemberg, four foxes were seropositive. However, foxes with anti-BoDV-1 antibodies were also detected in non-endemic regions. In Hesse, 7/31 foxes displayed anti-BoDV-1 antibodies but no BD was reported in horses in the last decades in the respective areas. Interestingly, BoDV-1-infected rabbits were found in the last decades in one region (personal communication S. Herzog). Studies on the presence of reservoirs are lacking for these districts. However, Dürrwald et al. [28] also report presence of BoDV-1 positive *C. leucodon* in endemic regions in eastern Germany without equine BD cases in the last decades. In the present study, titres of seropositive foxes in the endemic regions ranged from 1:40 to 1:2650, the highest titre was found in fox #21 originating from the Swabian Alb. Another canine, a female badger from Baden-Wuerttemberg, was also positive for anti-BoDV-1 antibodies with a titre of 1:160 and did not exhibit encephalitis (data not shown).

Among six foxes with confirmed CDV-infection, five displayed additional anti-BoDV-1 antibodies. Cross reaction with antibodies against CDV is highly unlikely since specificity of anti-bornavirus antibodies was confirmed by Western blot. Therefore, a coincidental connection between CDV and BoDV-1 could be assumed. CDV is a highly immunosuppressive agent, causing lymphocyte loss and leucopenia in the acute stage [56], thereby increasing the susceptibility for opportunistic infections, e.g. for toxoplasmosis [57]. Therefore, further investigations on co-infections with BoDV-1 are necessary.

No BoDV-1 antigen (N, P) was found by IHC in the brain of the foxes with encephalitis. The combination of detection of two most abundantly expressed viral proteins ensure the detection even of BoDV-1 variants, e.g. mutations in the N gene or other bornaviruses. The fox #21 with the highest anti-BoDV-1 antibody titre was

further investigated by in situ hybridization for detection of BoDV-1 RNA (according to established protocols [40]), but no genomic or mRNA was detected in the brain (data not shown). BoDV-1 RNA was not amplified by PCR in the brain tissue by any of the applied PCR assays. In addition to the usual PCR approaches (real time RT-PCR and nested PCR), a newly developed pan-bornavirus-RT-PCR for a rapid, sensitive and economic screening of all known bornaviruses was used. As there is no knowledge on the duration of potential infection, the explanation for negative PCR results could be a low level viral persistence or also presence of virus only in specific brain areas not sampled. Moreover, even though an abundantly expressed housekeeping gene was amplified, the sample quality and differences in sample storage could have interfered with amplification of viral sequences.

Histopathology strongly suggested a viral aetiology of the red fox encephalitis. Beside BoDV-1 [18], viral causes of encephalitis in canines are rabies virus [12], canine distemper virus (CDV) [13, 14], canine adenovirus 1 (CAV-1) [9], porcine herpesvirus 1 (SHV-1), canine parvovirus (CPV) [5, 46], West Nile virus (WNV) [5] or tick-borne encephalitis virus (TBEV) [58]. A fox circovirus [19] and La Crosse virus [17] have also been detected in canine encephalitis cases. Schwab et al. [5] found canine parainfluenza virus (CPIV) antigen in the brain of one dog and encephalomyocarditis virus (EMCV) in four dogs with encephalitis. *Toxoplasma gondii* [21], *Neospora caninum* [21] and *Encephalitozoon cuniculi* can also occasionally cause non-suppurative encephalitis. Widén et al. [15] demonstrated an up to now unclassified α -herpesvirus in arctic foxes with unclear encephalitis.

Among 16 cases of non-suppurative encephalitis in this study, six were due to CDV as confirmed by detection of viral RNA and antigen. One CDV infection (fox #21) was confirmed by metagenomic analysis. All red foxes affected by canine distemper originated from Baden-Wuerttemberg and substantiated the fact that canine distemper is a well-known infection in wild carnivores in Germany [13, 59]. All foxes were negative for rabies virus, CAV-1, SHV-1, CPV and *Toxoplasma gondii*. In addition, no flavivirus-RNA was amplified, so that WNV or TBEV infection seem unlikely.

Interestingly, no infectious agents were found for 10/16 foxes with non-suppurative (meningo-) encephalitis. Considering the retrospective nature of the study, the collected brain samples consisted of hippocampal areas for rabies virus investigation, some of them with additional presence of cerebral cortex, thalamus and meninges. Therefore, infections with agents with a certain tropism might have been missed. Several other possible causes of fox encephalitis have not been addressed in this study and could be object for further investigations,

e.g. CPIV, EMCV, *Neospora caninum*, *Encephalitozoon cuniculi* or La Crosse virus which, however, occurs so far only in the United States. Widén et al. [15] found a herpesvirus in arctic foxes with necrotizing encephalitis. Bexton et al. [19] were the first to describe encephalitis probably due to circovirus infection in foxes in England. To date, it remains unclear if circovirus infections are a definite cause for encephalitis or if they act as contributory complicating factors, as in pigs. Recently, a certain number of unclear encephalitis in mammals have been resolved due to metagenomics [31, 60]. However, in the present study even with the metagenomic analysis, carried out for three characteristic samples with encephalitis, it was not possible to detect an infectious agent. Therefore, it could be possible that non-infectious causes of encephalitis play an important role in foxes, as known for other canines such as dogs where non-infectious encephalitis could represent a breed-specific condition [6]. Furthermore, several idiopathic conditions are known in dogs, e.g. granulomatous meningoencephalitis [22] and recently, Pruess et al. [61] reported encephalitis due to autoantibodies, a non-human anti-NMDA receptor encephalitis in a polar bear. Immune-mediated non-suppurative encephalitis has already been suspected in several cases of unclear encephalitis cases and several authors suggest that they might occur primarily or result from a virally triggered process [5, 6].

Conclusions

Several common pathogens causing encephalitis in foxes have been taken into account in this study and a metagenomic analysis extended the ubiquitous applied methodologies. Nevertheless, in 10/16 foxes the cause for encephalitis remained unclear. Concerning bornaviruses, foxes can exhibit BoDV-1 specific serum antibodies without any further evidence of infection and seroprevalence of BoDV-1-specific antibodies in foxes was determined for the first time. In total, 37/225 red foxes exhibited anti-BoDV-1 antibodies in endemic and non-endemic regions in Germany. Thus, foxes can have contact exposure and most likely undergo abortive infection with seroconversion only and do not serve as reservoir for BoDV-1. Canine distemper virus caused non-suppurative encephalitis in 6/16 foxes but no further pathogens were found in the other foxes with unclear encephalitis. Thus, either so far unknown infectious agents, most likely a virus, or non-infectious causes have to be considered as causes fox encephalitis in the investigated districts in Germany. Non-infectious causes could also play a more important role than expected. This study is intended as a base for standardized large-scaled investigations for further clarification on fox encephalitis.

Acknowledgements

The authors thank Dr. E. Grossmann, Dr. M. Suntz, Dr. G. Fröba, Dr. J. Strehle, Dr. S. Cibulski, Dr. U. Kaim, Dr. K. Rille, Dr. G. Althoff and the State Veterinary Institutes of Aulendorf, Freiburg and Giessen as well as all the private hunters for providing us with fox samples. We thank Dr. W. Hecht and Dr. A. Kupke for helpful discussion, Dr. A. Kiefer for assistance with the statistical analysis and S. Engel, D. Klotz, S. Gantz, S. Wack, A. Luh, G. Boos and K. Kowalski for providing excellent technical support.

Funding

The Margarete Ammon Stiftung (<http://www.ammon-stiftung.de>) funded Hilburg Lange-Herbst. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: MB, DN, SH, SB, DH, BH, ME, CH. Performed the experiments: MB, DN, SH, HLH, AN, HPH, SB, DH, BH, ME. Analysed the data: MB, DN, SH, HLH, AN, HPH, DH, BH, ME, CH. Contributed reagents/materials/analysis tools: MB, DN, SH, AN, HPH, SB, DH, BH, ME, CH. Wrote the paper: MB, DN, SH, BH, CH. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute of Veterinary Pathology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany. ²Institute of Virology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany. ³The Hessian State Laboratory, Giessen, Germany. ⁴Friedrich-Loeffler-Institute, Greifswald, Germany. ⁵Institute of Virology, Philipps-University, Marburg, Germany.

Received: 28 April 2016 Accepted: 26 August 2016

Published online: 02 September 2016

References

- Green RG, Ziegler NR, Green BB, Dewey ET. Epizootic fox encephalitis. *Am J Hyg.* 1930;12:109–29.
- Hoff EJ, Vandevelde M. Non-suppurative encephalomyelitis in cats suggestive of viral origin. *Vet Path.* 1981;18:170–80.
- Theil D, Fatzner R, Schiller I, Caplazi P, Zurbriggen A, Vandevelde M. Neuropathological and aetiological studies of sporadic non-suppurative meningoencephalomyelitis of cattle. *Vet Rec.* 1998;143:244–9.
- Berg AL, Gavriel-Widén D, Nilsson K, Widén F, Berg M, Gregorius S, et al. Necrotizing encephalitis in of unknown cause in Fennoscandian arctic foxes (*Alopex lagopus*). *J Vet Diagn Invest.* 2007;19:113–7.
- Schwab S, Herden C, Seeliger F, Papaioannou N, Psalla D, Polizopoulou Z, et al. Non-suppurative meningoencephalitis of unknown origin in cats and dogs: an immunohistochemical study. *J Comp Path.* 2007;136:96–110.
- Amude AM, Alfieri AF, Alfieri AA. The role of viruses in encephalitis of unknown origin in dogs. *Current research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* Badajoz: Formatec Research Center; 2010. p. 714–22.
- Sánchez S, Clark EG, Wobeser GA, Janzen ED, Philibert H. A retrospective study of non-suppurative encephalitis in beef cattle from western Canada. *Can Vet J.* 2013;54(12):1127–32.
- Grant MM, Sameh Y. Inflammation in the central nervous system. In: Grant MM, editor. *Pathology of Domestic Animals Volume 1*, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007. p. 393–401.
- Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A. *Veterinary Neuropathology*. 1st ed. St. Louis: Mosby; 1995.
- Duscher G, Pleydell D, Prosl H, Joachim A. *Echinococcus multilocularis* in Austrian foxes from 1991 until 2004. *J Vet Med.* 2006;53:138–44.
- Contesse P, Hegglin D, Gloor S, Bontadina F, Deplazes P. The diet of urban foxes (*Vulpes vulpes*) and the availability of anthropogenic food in the city of Zurich, Switzerland. *Mamm Biol.* 2004;69(2):81–95.
- Finnegan CJ, Brooke SM, Johnson N, Smith J, Mansfield KL, Keene VL, et al. Rabies in North America and Europe. *J R Soc Med.* 2002;95:9–13.
- Frölich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J, Fickel J. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet Microbiol.* 2000;74:283–92.
- Origi FC, Plattet P, Sattler U, Robert N, Casaubon J, Mavrot F, et al. Emergence of canine distemper virus strains with modified molecular signature and enhanced neuronal tropism leading to high mortality in wild carnivores. *Vet Path.* 2012;49(6):913–29.
- Widén F, Sundström E, Gavriel-Widén D, Berg AL, Dillner B, Berg M. Detection of herpesvirus DNA in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*, syn. *Alopex lagopus*) with fatal encephalitis. *Res Vet Sci.* 2012;92(3):509–11.
- Truyen U, Müller T, Heidrich R, Tackmann K, Garmischel LE. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiol Infect.* 1998;121:433–40.
- Amundson TE, Yull TM. Natural raccoon virus infection in the red fox (*Vulpes fulva*), gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*), raccoon (*Procyon lotor*), and opossum (*Didelphis virginiana*). *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30(3):706–14.
- Weissenböck H, Nowotny N, Caplazi P, Kolodziejek J, Ehrensperger F. Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol.* 1998;36(7):2127–30.
- Bexton S, Wiersma LC, Getu S, Van Run PR, Verjans GMGM, Shipper D, et al. Detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009–2013. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(7):1205–82.
- Schroeder H, van Rensburg IB. Generalised *Listeria monocytogenes* infection in a dog. *J S Afr Vet Assoc.* 1993;64(3):133–6.
- De Craeye S, Speybroeck N, Aizenberg D, Dardé ML, Collinet F, Tavernier P, et al. *Toxoplasma gondii* and *neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and cervidae? *Vet Parasitol.* 2011;178(1–2):64–9.
- O'Neill EJ, Merrett D, Jones B. Granulomatous meningoencephalomyelitis in dogs: a review. *Ir Vet J.* 2005;58(2):86–92.
- Herden C, Briese T, Lipkin IW, Richt JA. Bornaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1124–50.
- Staheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmle M. Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol.* 2000;81:2123–35.
- Hilbe M, Herrsche R, Kolodziejek J, Nowotny N, Ehrensperger F. Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(4):675–7.
- Puotzer ME, Hilbe M, Müller JP, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinsky K, et al. Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicoloured white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol.* 2010;47:236–44.
- Bourg M, Herzog S, Encarnação JA, Nobach D, Lange-Herbst H, Eickmann M, et al. Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(12):2064–6.
- Dürwald R, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. The bicolored white-toothed shrew *Crocidura leucodon* (Hermann 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS One.* 2014;9(4). e93659.
- Nobach D, Bourg M, Herzog S, Lange-Herbst H, Encarnação JA, Eickmann M, et al. Shedding of infectious Borna disease virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. *PLoS One.* 2015;10(8):e0137018.
- Kuhn JH, Dürwald R, Bao Y, Briese T, Carbone K, Clawson AN, et al. Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch Virol.* 2015;160(2):621–32.
- Hoffmann B, Tappe D, Höpfer D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, et al. A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med.* 2015;373:154–62.
- Dauphin G, Legay V, Sailleau C, Smondack S, Hammoumi S, Zientara S. Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes (*Vulpes vulpes*). *J Gen Virol.* 2001;82:2199–204.
- Okamoto M, Kagawa Y, Kamitani W, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, et al. Borna disease in a dog in Japan. *J Comp Path.* 2002;126:312–7.
- Lundgren AL, Zimmermann W, Bode L, Czech G, Gosztonyi G, Lindberg R, et al. Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J Gen Virol.* 1995;76:2215–22.
- Nowotny N, Weissenböck H. Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis ("Staggering Disease") and studies of its etiology. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1668–9.
- Herzog S, Rott R. Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol.* 1980;168:153–8.
- Herzog S, Enderlein D, Heffels-Redmann U, Piepenbring A, Neumann D, Kaleta EF, et al. Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian bornavirus infection in psittacine birds. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2282–4.
- Richt JA, Clements JE, Herzog S, Pyper J, Wahn K, Becht H. Analysis of virus-specific RNA species and proteins in Freon-113 preparations of the Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol.* 1993;182:271–80.

39. Herden C, Herzog S, Wehner T, Zink C, Richt JA, Frese K. Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. *Equine Infect Dis*. 1999;8:286–90.
40. Werner-Keiß N, Garten W, Richt JA, Porombka D, Algermissen D, Herzog S, et al. Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;34:590–602.
41. Piepenbring AK, Enderlein D, Herzog S, Kaleta EF, Heffels-Redmann U, Resmeyer S, et al. Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(2):234–41.
42. Schindler AR, Vogtlin A, Hilbe M, Puorger M, Zlinszky K, Ackermann M, et al. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes*. 2007;21:47–55.
43. Sorg I, Metzler A. Detection of Borna disease virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissues by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33(4):821–3.
44. Flia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006;136(1–2):171–6.
45. Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology*. 2013;10:58.
46. Schaudien D, Polizopoulou Z, Koutinas A, Schwab S, Porombka D, Baumgärtner W, et al. Leukoencephalopathy associated with parvovirus infection in Cretan Hound puppies. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3169–75.
47. Scheuch M, Höper D, Beer M. RIEMS: a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics* 2015;16:69.
48. Kauhala K, Laukkanen P, von Rége I. Summer food composition and food niche overlap of the raccoon dog, red fox and badger in Finland. *Ecography*. 1998;2:457–63.
49. Kidawa D, Kowalczyk R. The effects of sex, age, season and habitat on diet of the red fox *Vulpes vulpes* in northeastern Poland. *Acta Theriol*. 2011;56:209–18.
50. Richt JA, Schmeel A, Frese K, Carbone KM, Narayan O, Rott R. Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med*. 1994;179:1467–73.
51. Hallensleben W, Schwemmler M, Hausmann J, Stitz L, Volk B, Pagenstecher A, et al. Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol*. 1998;72(5):4379–86.
52. Stitz L, Bilzer T, Planz O. The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci*. 2002;7:d541–55.
53. Last JM. *A Dictionary of Epidemiology*. 3rd ed. Oxford: University Press; 1997. p. 53,78,80.
54. Kolodziejek J, Dürwald R, Herzog S, Ehrensperger F, Lussy H, Nowotny N. Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol*. 2005;86:385–98.
55. Reichelt U. *Epizootiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit bei Pferden in Bayern und Darstellung des monoklonalen Antikörpers 38/15H7* [dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2009.
56. Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;127(1–2):1–18.
57. Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
58. Wurm R, Dobler G, Peters M, Kiessig ST. Serological investigations of red foxes (*Vulpes vulpes* L.) for determination of the spread of tick-borne encephalitis in Northrhine-Westphalia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2000;47(7):503–9.
59. Van Moll P, Alldinger S, Baumgärtner W, Adami M. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Vet Microbiol*. 1995;44:193–9.
60. Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol*. 2010;48(12):4392–6.
61. Prüss H, Leubner J, Wenke NK, Czjajk GA, Szentiks CA, Greenwood AD. Anti-NMDA receptor encephalitis in the polar bear (*Ursus maritimus*) Knut. *Sci Rep*. 2015;5(12805);doi:10.1038/srep12805.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5 Zusätzliche Untersuchungen

5.1 Charakterisierung der Betriebe in Bayern mit Vorkommen der Bornaschen Krankheit beim Pferd

Insgesamt haben 16 Pferdebetriebe an dieser Studie teilgenommen und Kleinsäuger aus ihrer Schädlingsbekämpfung für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Fast alle Betriebe (n=13) befinden sich in Bayern und haben Fälle von equiner BD in den Jahren 1994 bis 2014 gemeldet (siehe Tab. 2). In Tab. 2 sind auch drei Betriebe aus Baden-Württemberg und Hessen aufgelistet, durch die ein Vergleich der Daten ermöglicht wird.

Tab. 2 Auflistung der Fälle von BD beim Pferd in den teilnehmenden Betrieben

Betrieb	Landkreis	Bundesland	Ø Anzahl der Pferde	Equine BD-Fälle	Betriebsinfo* Ja/Nein
Betrieb 1	LKR Augsburg	Bayern	>40	2001, 2011	Ja
Betrieb 2	LKR Günzburg	Bayern	1–5	2002, 2011	Ja
Betrieb 3	LKR Augsburg	Bayern	6–20	1997	Ja
Betrieb 4	LKR Unterallgäu	Bayern	21–40	2012, 2014	Ja
Betrieb 5	LKR Günzburg	Bayern	6–20	2001, 2012, 2013	Ja
Betrieb 6	LKR Augsburg	Bayern	>40	2011	Ja
Betrieb 7	LKR Aichach-Friedberg	Bayern	>40	2001, 2002, 2007, 2008	Ja
Betrieb 8	LKR Weilheim-Schongau	Bayern	6–20	2012	Ja
Betrieb 10	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	Bayern	6–20	2002, 2013	Ja
Betrieb 12	LKR Eichstätt	Bayern	>40	2000, 2014	Ja
Betrieb 13	Hochtaunuskreis	Hessen	21–40	keine	Ja
Betrieb 14	LKR Günzburg	Bayern	1–5	1994	Ja
Betrieb 9	LKR Günzburg	Bayern	0	keine	Nein
Betrieb 11	LKR Erlangen-Höchstadt	Bayern	0	keine	Nein
Betrieb 15	Schäbische Alb, diverse LKR	Baden-Württemberg	0	keine	Nein
Betrieb 16	Hessen, diverse LKR	Hessen	0	keine	Nein

*Das Arbeitsblatt Betriebsinformationen wurde ausgefüllt

Die Betriebe 1 bis 12 befinden sich in Endemiegebieten in Bayern. Obwohl Hessen als Nichtendemiegebiet gilt, wurde im Betrieb 13 aus dem Hochtaunuskreis ein seropositives Pferd festgestellt und neun Kleinsäuger aus dessen Schädlingsbekämpfung untersucht. Der Betrieb 15 befindet sich auf der Schwäbischen Alb in Baden-Württemberg, die als Endemiegebiet gilt. Die Betriebe 9, 11, 15 und 16 werden in dieser Studie zwar als Betriebe gelistet, allerdings handelt es sich entweder um Privatpersonen mit Pferdebezug oder um Pferdekliniken, die eine Schädlingsbekämpfung durchgeführt haben. Auf der Abb. 8 (S. 59) sind die Landkreise in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen hervorgehoben, aus denen die Kleinsäuger stammen. Die Anzahl der Pferde in den von BD betroffenen Ställen in Bayern variiert in dieser Studie von zwei bis 60, mit einer durchschnittlichen Anzahl von 27 Tieren. In vier Ställen wird von einer einzigen BoDV-Infektion im Betrieb berichtet. Sieben Ställe hatten jeweils zwei bis vier BD Fälle in den 20 Jahren von 1994 bis 2014.

Alle pferdehaltenden Betriebe mit Fällen von BD haben ein Formular mit Betriebsinformationen ausgefüllt (siehe Anhang 10.1 „Arbeitsblatt Betriebsinformationen“). Die ausgewerteten Daten der elf Betriebe sind im Anhang 10.2 „Informationen zu den einzelnen Pferdebetrieben mit dem Vorkommen der Bornaschen Krankheit beim Pferd“ zu finden.

In allen Betrieben gibt es seit mindestens drei Jahren Pferde und es kommen alle Formen der Pferdehaltung vor, von reiner Boxenhaltung bis zur Offenstallhaltung. Als Einstreu überwiegt Stroh, und ausgemistet wird in sechs Betrieben täglich, in einem Betrieb drei bis sechs Mal pro Woche und in zwei Betrieben stehen die Pferde auf einer Strohmattze. Kontakte zu betriebsfremden Pferden bestehen bei fünf Betrieben regelmäßig und bei weiteren vier Betrieben ein- bis zehnmal im Jahr. Nur zwei Betriebe haben kaum Kontakte zu anderen Pferden. In einem Großteil der Betriebe kommen Hunde (n=8) und Katzen (n=7) vor. Drei Betriebe haben eine Hobbygeflügelhaltung und auf einem Betrieb gibt es zusätzlich zu den Pferden und dem Geflügel einen Esel und eine Ziege. Nutztiere gibt es auf keinem der Betriebe. In der Umgebung der Betriebe überwiegen Acker- und Wiesenlandschaften. Zugangsmöglichkeiten für Kleinsäuger gibt es sowohl im Stall als auch in der Futterkammer bei allen Betrieben mit der Ausnahme eines Betriebes, welcher das Krafffutter in einem geschlossenen Raum aufbewahrt. Eine Schädlingsbekämpfung wird in zwölf Betrieben bei Hinweisen auf einen Befall mittels Giftköder und

Totschlagfallen durchgeführt. In zwei Betrieben wird eine ständige Schadnagerbekämpfung mittels Giftködern durchgeführt.

5.2 Untersuchung auf potentielle BoDV-1-Infektionen bei Kleinsäugetieren in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen

Die Gesamtzahl der untersuchten Kleinsäugetiere belief sich auf 337 (87 Soricidae, 122 Muridae, 128 Cricetidae). Die Tiere stammten aus der Schädlingsbekämpfung von 16 Betrieben in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen.

In dem Artikel "Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany" von Bourg et al. (2013) (siehe Veröffentlichung 1), wurden die Daten von 120 Kleinsäugetieren (53 Cricetidae, 41 Muridae, 26 Soricidae) aus sieben Betrieben (1 bis 6, 8) aus den Regierungsbezirken Schwaben und Oberbayern in Bayern veröffentlicht. Das Hauptaugenmerk des Artikels lag auf zwei BoDV-1 positiven *C. leucodon* (#2001 und #5017). In dem Artikel "Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews" von Nobach et al. (2015) wurden die Daten einer weiteren BoDV-1 positiven *C. leucodon* (#5072) zum Vergleich mit den lebenden *C. leucodon* in der Haltung publiziert.

Insgesamt wurden zusätzlich weitere 109 Kleinsäugetiere aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen nach den gleichen Schemata wie bei Bourg et al. (2013) mittels etablierten Protokollen untersucht. Die Kleinsäugetiere wurden auf anti-BoDV-1-Antikörper mittels IIFT und auf BoDV-1-RNA mittels RT-qPCR und ggf. nested-RT-PCR getestet (Sorg u. Metzler, 1995; Herzog et al., 2010; Schindler et al., 2007). BoDV-1-positive Tiere wurden mittels Immunhistologie (IHC) und In-situ-Hybridisierung (ISH) auf BoDV-1-Antigen und -RNA untersucht (Herden et al., 2000; Werner-Keiß et al.; 2008). Überdies wurden noch weitere 107 Kleinsäugetiere auf das Vorhandensein von anti-BoDV-1-Antikörpern untersucht. Die einzelnen Tiere aus Baden-Württemberg und Hessen wurden mitaufgeführt. Die Tab. 3 gibt eine Übersicht über die veröffentlichten und unveröffentlichten Kleinsäugetierdaten.

Zusätzliche Untersuchungen

Tab. 3 Übersicht der veröffentlichten und unveröffentlichten Kleinsäugerdaten (n=337)

Anzahl Tiere	Anzahl <i>C. leucodon</i>	Testmethoden	Referenz
120	20	IIFT, RT-PCR, IHC*, ISH*	Bourg et al. 2013
1	1	IIFT, RT-PCR, IHC, ISH	Nobach et al. 2015
109	9	IIFT, RT-PCR, IHC*, ISH*	unveröffentlicht
107	0	IIFT	unveröffentlicht
*Bei BoDV-1 positiven Tieren u. Kontrollen			

Siehe Tab. 4 für eine Übersicht aller Kleinsäuger und den Anteil an Spitzmäusen und *C. leucodon* aus den einzelnen teilnehmenden Betrieben.

Tab. 4 Anzahl aller Kleinsäuger aus den jeweiligen Betrieben in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen

Betrieb	Landkreis	Bundesland	Anzahl Kleinsäuger	Anzahl Soricidae	Anzahl <i>C. leucodon</i>
Betrieb 1	LKR Augsburg	BY	22	2	0
Betrieb 2	LKR Günzburg	BY	4	1	1
Betrieb 3	LKR Augsburg	BY	5	0	0
Betrieb 4	LKR Unterallgäu	BY	27	0	0
Betrieb 5	LKR Günzburg	BY	80	30	25
Betrieb 6	LKR Augsburg	BY	28	0	0
Betrieb 7	LKR Aichach-Friedberg	BY	0	0	0
Betrieb 8	LKR Weilheim-Schongau	BY	12	3	0
Betrieb 9	LKR Günzburg	BY	8	0	0
Betrieb 10	LKR Neumarkt in der Oberpfalz	BY	29	1	1
Betrieb 11	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	44	24	2
Betrieb 12	LKR Eichstätt	BY	10	2	0
Betrieb 13	Hochtaunuskreis	HE	6	3	0
Betrieb 14	LKR Günzburg	BY	1	1	1
Betrieb 15	Schäbische Alb, diverse LKR	BW	49	16	0
Betrieb 16	Hessen, diverse LKR	HE	13	4	0
		Total	337*	87	30
*inklusive 121 bereits veröffentlichte Kleinsäuger (Bourg et al., 2013; Nobach et al., 2015)					

Zu den 87 Soricidae (Spitzmäusen) zählten 30 *C. leucodon*. Alle *C. leucodon* stammten aus Bayern und der größte Teil davon (n=25) kam aus dem Betrieb 5 aus dem Landkreis

Günzburg. Zwei *C. leucodon* stammten aus dem Betrieb 11 aus dem Landkreis Erlangen-Höchstadt sowie jeweils eine aus den Betrieben 2 und 14 aus dem Landkreis Günzburg und eine aus dem Betrieb 10 aus dem Landkreis Neumarkt in der Oberpfalz. In einigen Betrieben in Bayern, genau wie in Baden-Württemberg und Hessen, wurden mittels Schädlingsbekämpfung keine Feldspitzmäuse gefangen (Tab. 3).

Die Tab. 5 zeigt eine Übersicht aller verfügbaren Blut- und Gehirnproben und die Resultate der Nachweise von BoDV-1-RNA und anti-BoDV-1-Antikörpern sowohl von den veröffentlichten als auch den unveröffentlichten Kleinsäugetern (n=337).

Tab. 5 Zusammenfassung aller verfügbaren Kleinsäugerproben und Resultate (n=337)

Herkunft	Art	Art	Anzahl Tiere*	Verfügbare Blutproben	IIFT positiv	Verfügbare Gehirnproben	PCR positiv
BY	<i>C. leucodon</i>	Feldspitzmaus	30 (21)	20/30	5/20	30/30	5/30
	<i>C. russula</i>	Hausspitzmaus	1 (1)	1/1	0/1	1/1	0/1
	<i>S. araneus</i>	Waldspitzmaus	24 (5)	22/24	2/22	15/24	0/15
	<i>S. minutus</i>	Zwergspitzmaus	7	6/7	1/6	3/7	0/3
	<i>S. coronatus</i>	Schabrackenspitzmaus	2	2/2	0/2	1/2	0/1
	<i>M. musculus</i>	Hausmaus	33 (28)	27/33	2/27	33/33	0/33
	<i>A. sylvaticus</i>	Waldmaus	47 (10)	47/47	1/47	35/47	0/35
	<i>A. flavicollis</i>	Gelbhalsmaus	7 (2)	6/7	0/6	6/7	0/6
	<i>M. glareolus</i>	Rötelmaus	6 (2)	4/6	0/4	5/6	0/5
	<i>A. terrestris</i>	Scherm Maus	25 (9)	24/25	0/24	22/25	0/22
	<i>M. minutus</i>	Zwergmaus	2 (2)	1/2	1/1	2/2	0/2
	<i>Microtus sp.</i>	Wühlmäuse	85 (41)	82/85	1/82	67/85	0/67
	BW	<i>C. russula</i>	Hausspitzmaus	13	13/13	1/13	1/13
<i>S. araneus</i>		Waldspitzmaus	1	1/1	0/1	0/1	0/0
<i>S. coronatus</i>		Schabrackenspitzmaus	2	2/2	0/2	0/2	0/0
<i>M. musculus</i>		Hausmaus	20	20/20	0/20	0/20	0/0
<i>A. sylvaticus</i>		Waldmaus	1	1/1	0/1	0/1	0/0
<i>A. terrestris</i>		Scherm Maus	2	2/2	0/2	0/2	0/0
<i>Microtus sp.</i>		Wühlmäuse	10	10/10	0/10	0/10	0/0
HE		<i>C. russula</i>	Hausspitzmaus	6	6/6	1/6	3/6
	<i>S. araneus</i>	Waldspitzmaus	1	1/1	1/1	1/1	0/1
	<i>M. musculus</i>	Hausmaus	7	7/7	0/7	0/7	0/0
	<i>A. sylvaticus</i>	Waldmaus	4	4/4	0/4	3/4	0/3
	<i>A. flavicollis</i>	Gelbhalsmaus	1	1/1	0/1	1/1	0/1
	Gesamt			337	310/337	16/310	229/337

*Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl bereits in Bourg et al. (2013) und Nobach et al. (2015) veröffentlichter Kleinsäugeter an (n=121)

Die morphologische Unterscheidung zwischen Feldmäusen (*Microtus arvalis*) und Erdmäusen (*Microtus agrestis*) war nicht immer möglich (Jenrich et al., 2010). Da keine genetische Bestimmung (mittels Sequenzunterschieden im Cytochrom b-Gen) durchgeführt wurde, wurden in der Studie beide Spezies als „*Microtus sp.*“ bezeichnet.

Von den 310 verfügbaren Blutproben wiesen 16 spezifische anti-BoDV-1-Antikörper auf. Dabei handelte es sich um fünf seropositive Nager (Muridae und Cricetidae) und elf seropositive Spitzmäuse (Soricidae). Sowohl in Bayern als auch in Baden-Württemberg und Hessen gab es seropositive Kleinsäuger, in Endemie- wie auch in Nichtendemiegebieten. Es standen 229 Gehirnproben für die Untersuchung auf BoDV-1-Antigen und -RNA zur Verfügung. Dabei konnten insgesamt fünf *C. leucodon* (#2001, #5017, #5071, #5072, #5077) aus Bayern positiv auf BoDV-1-Antigen und -RNA getestet werden. Auf der Abb. 8 (S. 59) sind sowohl die Probengebiete wie auch die Herkunft der BoDV-1-positiven Feldspitzmäuse und der seropositiven Kleinsäuger dargestellt.

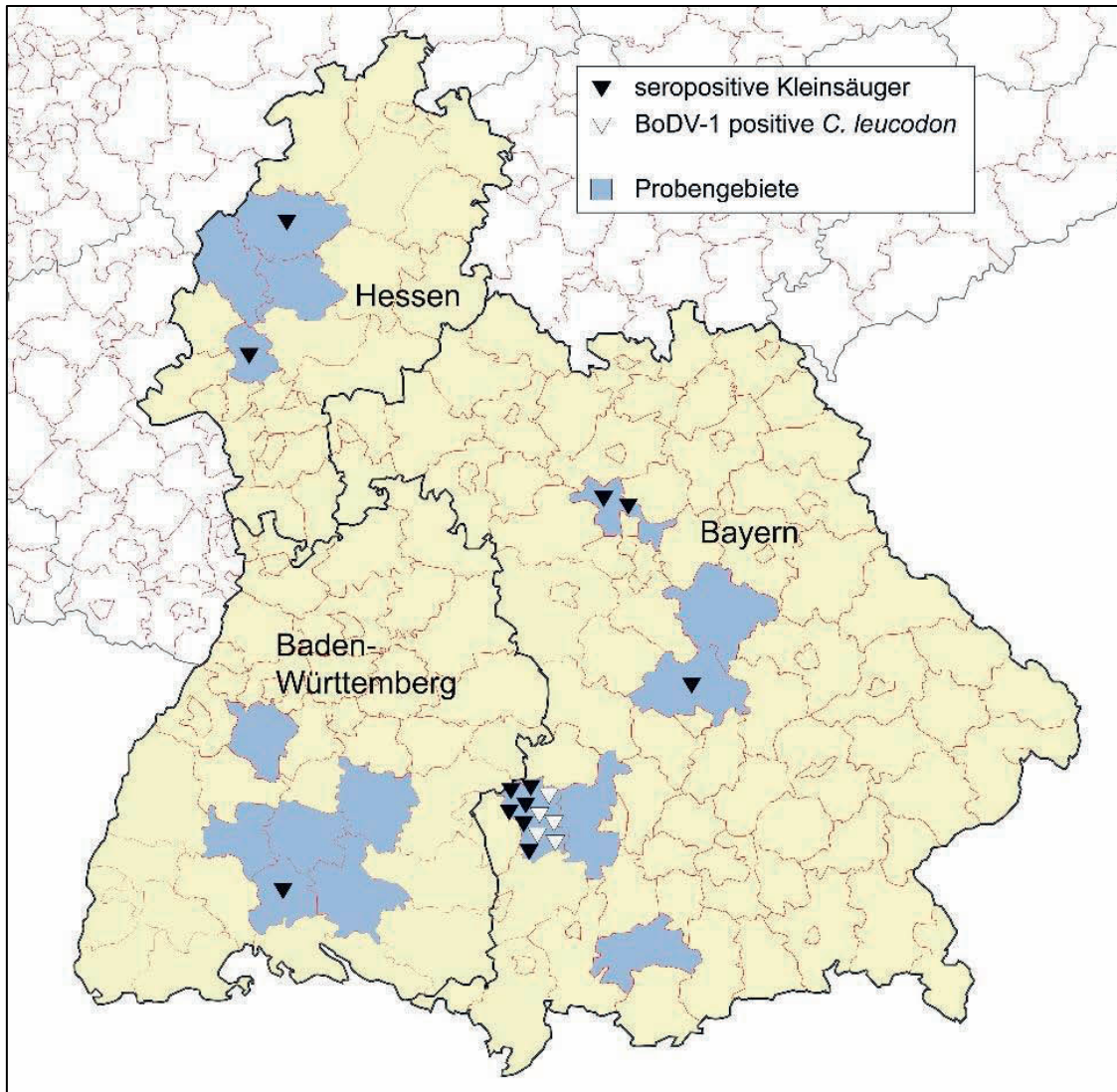


Abb. 8 Seropositive Kleinsäuger und BoDV-1-positive *C. leucodon* in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen.

Bourg et al. (2013) und Nobach et al. (2015) bearbeiteten drei BoDV-1-positive *C. leucodon* (#2001, #5017, #5072). Von den 16 seropositiven Kleinsäufern aus Bayern sind acht Kleinsäuger bei Bourg et al. (2013) beschrieben. Die Abb. 9 und 10 (S. 60) zeigen Immunfluoreszenzen mit den Seren von *C. leucodon* #2001 und *S. minutus* #11001 auf BoDV-1-infizierten MDCK-Zellen.

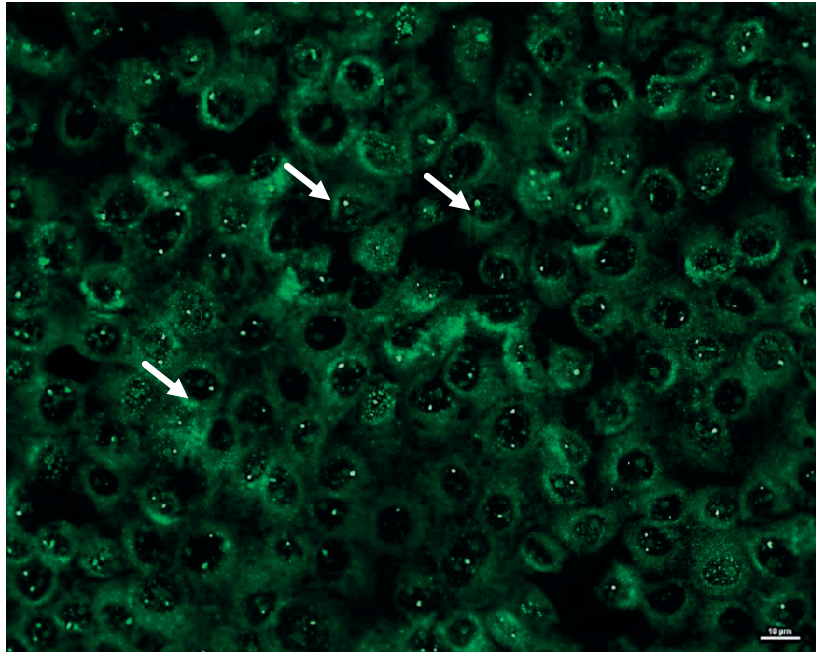


Abb. 9 Nachweis von Anti-BoDV-1-Antikörpern bei *C. leucodon* #2001 (400x). Die weißen Pfeile zeigen die granuläre Fluoreszenz im Zellkern der BoDV-1-infizierten MDCK-Zellen (Hundenierenzellen). Balken: 10 µm.

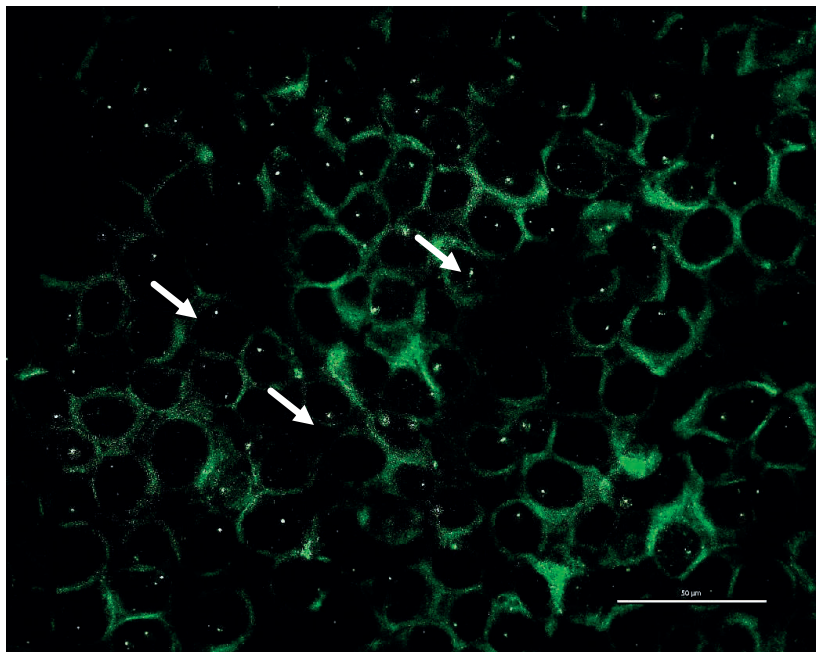


Abb. 10 Nachweis von Anti-BoDV-1-Antikörpern bei *S. minutus* #11001 (400x). Die weißen Pfeile zeigen die granuläre Fluoreszenz im Zellkern der BoDV-1-infizierten MDCK-Zellen. Balken: 50 µm.

Die Tab. 6 listet die Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen der unveröffentlichten BoDV-1-positiven Kleinsäuger aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen auf.

Tab. 6 Bisher unveröffentlichte BoDV-1-positive Kleinsäuger aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen

Kenn- ung	Art	Herkunft	Her- kunft	BoDV-1 PCR	IIFT	IHC (Bo 18)	ISH
5071	<i>C. leucodon</i>	LKR Günzburg	BY	positiv	< 1:10	positiv	positiv
5077	<i>C. leucodon</i>	LKR Günzburg	BY	positiv	k.A.	positiv	positiv
9001	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	negativ	positiv*	negativ	/
11001	<i>S. minutus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	negativ	positiv*	negativ	/
11014	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	negativ	1:320	negativ	/
12006	<i>Microtus sp.</i>	LKR Eichstätt	BY	negativ	positiv*	negativ	/
13002	<i>C. russula</i>	Hochtaunuskreis	HE	negativ	1:80	negativ	/
15001	<i>C. russula</i>	LKR Tuttlingen	BW	negativ	1:320	negativ	/
H1	<i>S. araneus</i>	LKR Marburg- Biedenkopf	HE	negativ	positiv*	negativ	/

* Probenmenge nicht ausreichend für Titration

Insgesamt fünf Soricidae, darunter eine Waldspitzmaus (*S. araneus*, #11014) und eine Zwergspitzmaus (*S. minutus*, #11001) aus dem Landkreis Erlangen-Höchstadt in Bayern, wiesen anti-BoDV-1-Antikörper auf. Auch in Baden-Württemberg im Landkreis Tuttlingen wurde eine Hausspitzmaus (*C. russula*, #15001) und im Hochtaunuskreis und im Landkreis Marburg-Biedenkopf in Hessen, wurden jeweils eine Hausspitzmaus (#13002) und eine Waldspitzmaus (#H1) positiv auf anti-BoDV-1-Antikörper getestet. Bei den Muridae und Cricetidae wurden eine Waldmaus (*A. sylvaticus*, #9001) aus dem Landkreis Günzburg und eine Wühlmaus aus dem Landkreis Eichstätt (*Microtus sp.* #12006) positiv auf anti-BoDV-1-Antikörper getestet. Die Probenmenge reichte aber nicht für eine Titration aus.

Es wurden noch zwei weitere *C. leucodon* (#5071 u. #5077) aus Bayern positiv auf BoDV-1 getestet. Die Tiere stammten aus dem Betrieb 5 aus dem Landkreis Günzburg, in dem auch die BoDV-1-positiven *C. leucodon* #5017 und #5072 gefangen wurden. *C. leucodon* #5071 wies keine anti-BoDV-1-Antikörper auf, allerdings konnten sowohl BoDV-1-RNA wie auch -Antigen festgestellt werden (Tab. 7). Von *C. leucodon* #5077 war keine Blutprobe verfügbar, sie wies aber BoDV-1-RNA und -Antigen auf. Die restlichen neun *C. leucodon* zeigten keine Hinweise auf eine BoDV-1-Infektion. Die Verteilung

von BoDV-1-Antigen, von viraler genomischer und mRNA in den zwei unveröffentlichten BoDV-1-positiven *C. leucodon* #5071 und #5077 wird in Tab. 7 dargestellt.

Zusätzliche Untersuchungen

Tab. 7 Verteilung von BoDV-1-Antigen und -RNA in *C. leucodon* #5071 und #5077

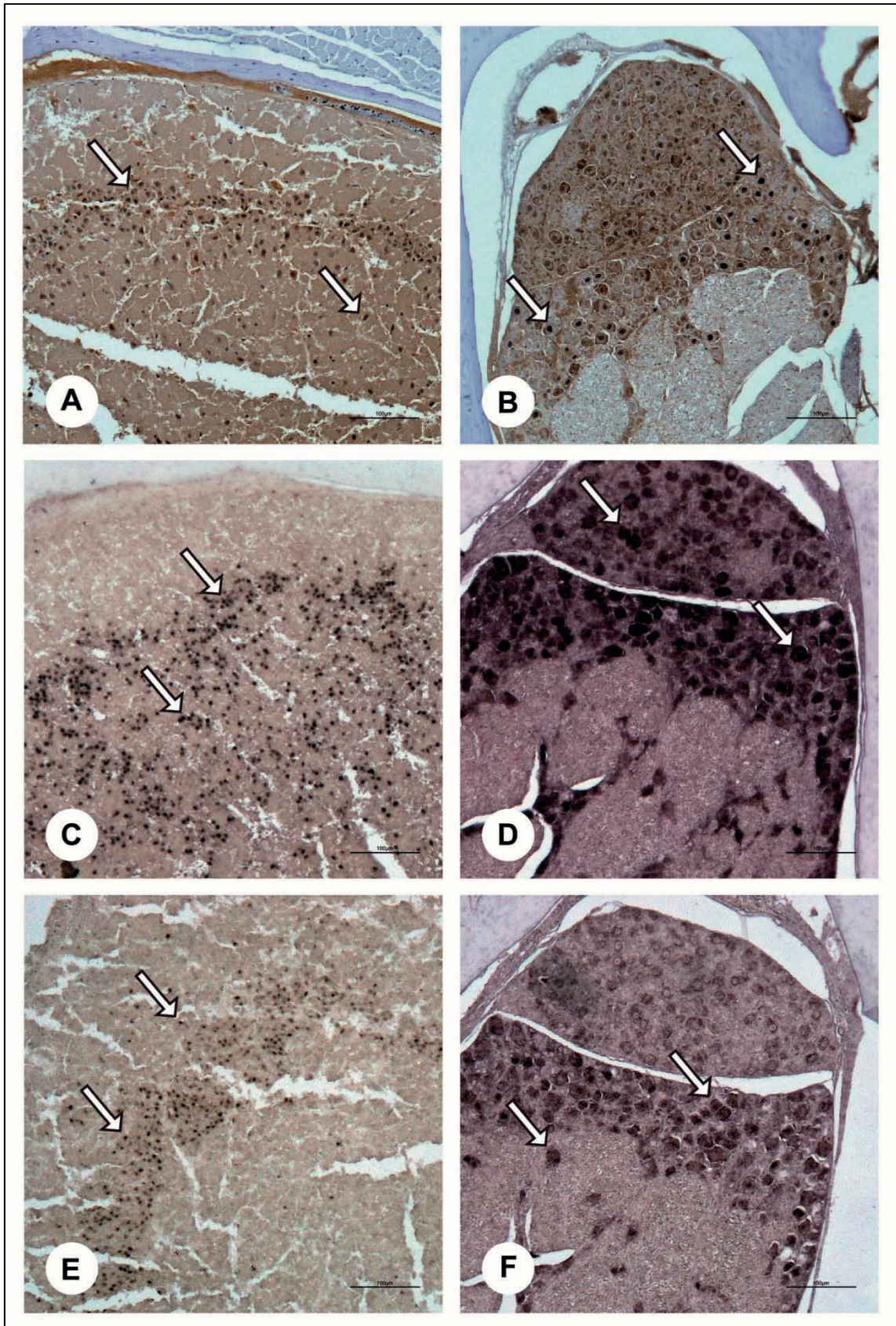
	<i>C. leucodon</i> #5071 (männlich)			<i>C. leucodon</i> #5077 (männlich)		
	IHC (Bo 18)	ISH gen. RNA	ISH mRNA	IHC (Bo 18)	ISH gen. RNA	ISH mRNA
Gehirn	+++	+(+)	+++	+++	+	++(+)
Periphere Nerven, Kopf	+++	-	-	+++	+	+
Trigeminusganglion	++	++	++	+++	++	+++
Speicheldrüse	-	-	fraglich	-	-	fraglich
Auge	-	-	-	++	k.A	k.A
Sehnerv	+++	k.A	k.A	k.A	k.A	k.A
Tränendrüse	fraglich	fraglich	fraglich	k.A	fraglich	++
Herzmuskel	-	-	-	-	-	-
Lunge, Bronchial epithel	-	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-	-
Ösophagus	-	-	+(+)	-	-	-
Thymus	-	-	-	k.A	k.A	k.A
Zunge, Keratin	-	-	-	(+)	-	-
Leber	-	fraglich	fraglich	-	-	-
Milz	k.A.	k.A	k.A	-	-	-
Darm, glatte Muskulatur	-	k.A	k.A	fraglich	-	-
Nerven und Ganglien im Darm	k.A.	k.A	k.A	+++	k.A	k.A
Niere, Tubulusepithel	-	-	fraglich	-	-	-
Hoden	-	-	-	-	-	-
Nerven in Bgw. um den Hoden	+	-	-	k.A	-	-
Knochen	-	-	-	-	-	-
Knorpel	k.A.	-	-	-	-	-
Skelettmuskulatur	-	-	-	-	-	-
Haut, Keratin	-	-	-	+(+)	-	-
Talgdrüsen	-	-	fraglich	-	-	-
Flankendrüse	k.A.	k.A	k.A	k.A	k.A	k.A
Nasenepithel	-	+	++	++(+)	fraglich	+
Nerven um das Nasenepithel	+++	+	+	+++	+	+
Rückenmark	+(+)	+	+	+++	+	+
Spinalganglion	++	+	++	+++	+	+
Fettgewebe	-	-	-	-	-	-
Braunes Fettgewebe	-	-	-	-	-	-
Zahnhalteapparat	k.A.	k.A	k.A	k.A	fraglich	fraglich

In der immunhistologischen Untersuchung konnte bei beiden männlichen *C. leucodon* #5071 und #5077 BoDV-1-Antigen in ZNS und PNS festgestellt werden. Auch virale genomische und messenger RNA konnten sowohl im Gehirn, im Rückenmark, in den Ganglien und den peripheren Nerven nachgewiesen werden. In Abb. 11 (S. 65) sind der Nachweis von BoDV-1-Antigen und -RNA im Gehirn und im Trigeminalganglion dargestellt.

Bei *C. leucodon* #5071 konnte BoDV-1-Antigen zusätzlich im Sehnerv, in den Nerven um das Nasenepithel und den Hoden dargestellt werden. BoDV-1-RNA konnte im Plattenepithel des Ösophagus und im Epithel in der Nase markiert werden. Fraglich blieben die Nachweise von Antigen in der Tränendrüse sowie von RNA in der Speichel- und Tränendrüse, in den Hepatozyten, im Tubulusepithel der Niere und in den Talgdrüsen. Bei *C. leucodon* #5077 war das Verteilungsmuster ähnlich. Es konnte auch BoDV-1-Antigen im Keratin der Zunge und der Haut, im Auge, in den Nerven um das Nasenepithel sowie in den Nerven und Ganglien im Darm dargestellt werden. In der Tränendrüse konnte mRNA festgestellt werden genau wie im Nasenepithel und in den umliegenden Nerven. Auch genomische RNA konnte in den Nerven um die Nase markiert werden. Fraglich blieben bei *C. leucodon* #5077 der Nachweis von Antigen in der glatten Muskulatur des Darmes und der Nachweis von genomischer RNA in der Tränendrüse, im Nasenepithel und im Zahnhalteapparat sowie der Nachweis von mRNA in der Speicheldrüse und im Zahnhalteapparat. Gefrierartefakte und autolytische Prozesse in einigen Organen, wie beispielsweise im Darm und der Speicheldrüse, erschwerten teilweise die exakte Identifizierung der markierten Zellen in der IHC und ISH.

Abb. 11 Nachweis von BoDV-1-Antigen, von genomischer und messenger BoDV-1-RNA im Gehirn von *C. leucodon* #5071 und im Trigeminalganglion von *C. leucodon* #5077 (S.62).

A und B: Nachweis von BoDV-1-Antigen im Gehirn (A) und im Trigeminalganglion (B) mittels immunhistologischer Untersuchung mit dem BoDV-1-spezifischen monoklonalen Antikörper Bo 18. C und D: Nachweis von BoDV-1-spezifischer mRNA im Gehirn (C) und im Trigeminalganglion (D) mittels In-situ-Hybridisierung. E und F: Nachweis von BoDV-1-spezifischer genomischer RNA im Gehirn (E) und im Trigeminalganglion (F) mittels In-situ-Hybridisierung. Die weißen Pfeile markieren in allen 6 Bildern Beispiele für ein positives Signal. A, C u. E: Vergrößerung 40x. B, D u. F: Vergrößerung 100x. Balken: 100 µm.



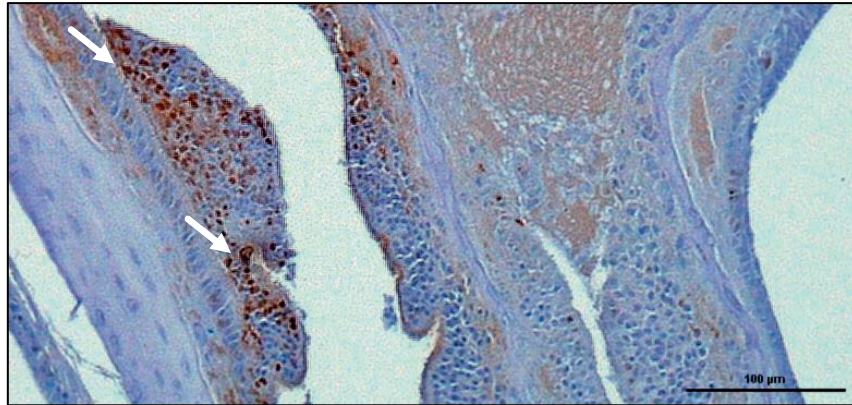


Abb. 12 Nachweis von BoDV-1-Antigen in der Nase von *C. leucodon* #5077. Nachweis von BoDV-1-Antigen im olfaktorischen Epithel mittels Immunhistologie mit dem BoDV-1-spezifischen monoklonalen Antikörper Bo 18 (weiße Pfeile). Vergrößerung 100x. Balken: 100 µm.

5.3 Untersuchung auf potentielle BoDV-1-Infektionen bei Füchsen (*Vulpes vulpes*), Dachsen (*Meles meles*) und Marderartigen (*Mustelidae*)

Die Ergebnisse der Untersuchungen von 232 Füchsen (*Vulpes vulpes*) sind in dem Artikel „Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible causes of encephalitis“ (Veröffentlichung 2) von Bourg et al. (2016) aufgeführt. Dabei konnten bei 37 Füchsen aus Endemie- und Nichtendemiegebieten in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen anti-BoDV-1-Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). Die Titer reichten von 1:40 bis 1:2560. Weder BoDV-1-Antigen noch -RNA konnten mittels Immunhistologie, RT-PCR oder pan-Borna-RT-PCR im Gehirn der Füchse nachgewiesen werden. Auch metagenomische Analysen konnten keine BoDV-1-Infektion feststellen.

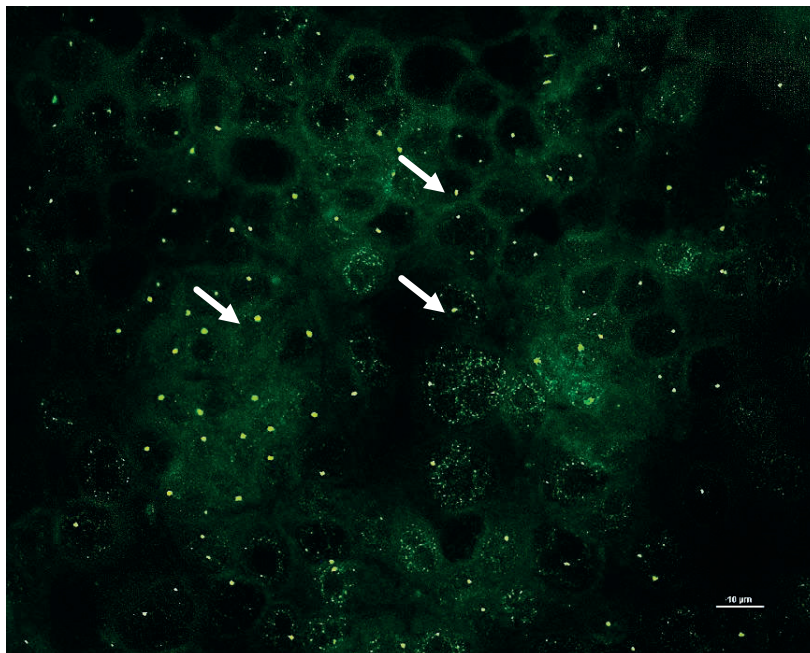


Abb. 13 Nachweis von anti-BoDV-1-Antikörpern beim Fuchs. Die weißen Pfeile zeigen die granuläre Fluoreszenz im Zellkern der BoDV-1-infizierten MDCK-Zellen (Hundenierenzellen). Diese markieren die Anwesenheit von anti-BoDV-1-Antikörpern beim Fuchs #T8 (Titer von 1:640). Balken: 10µm.

Im Zuge der Fuchsbeprobungen haben einige Jäger und Untersuchungsämter in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen auch Dachse (*Meles meles*) und Marderartige

(*Mustelidae*) beprobt. Insgesamt wurden elf Dachse (*Meles meles*), ein Mauswiesel (*Mustela nivalis*) und ein Iltis (*Mustela putorius*) mittels IIFT untersucht (Herzog et al., 2010). Die Herkunft der Tiere und die Ergebnisse des IIFT sind in Tab. 8 dargestellt. Von den elf Tieren stammten acht aus Bayern, zwei aus Baden-Württemberg und drei aus Hessen. Ein adulter, weiblicher Dachs (#XS755) aus dem Ortenaukreis in Baden-Württemberg wies anti-BoDV-1-Antikörper mit einem Titer von 1:160 auf. Der Ortenaukreis gilt als nicht endemische Region für BoDV-1-Infektionen. Der verhaltensauffällige Dachs wurde im „Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg“ sezziert und als Hauptbefunde wurden eine Kachexie und eine Nephrose festgestellt. Alle anderen kleinen Karnivoren wiesen einen Titer von <1:10 auf.

Tab. 8 Anzahl an seropositiven Dachsen und Marderartigen aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen

Herkunft	Spezies	Anzahl	IIFT positiv
BY	Dachs	6	0/6
BY	Wiesel	1	0/1
BY	Iltis	1	0/1
BW	Dachs	2	1/2
HE	Dachs	3	0/3

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung des Reservoirs für BoDV-1 in Bayern

6.1.1 Die Feldspitzmaus als Reservoir für BoDV-1

6.1.1.1 Vorkommen von BoDV-1-positiven Feldspitzmäusen in Endemiegebieten in Bayern

Neurotrope RNA-Viren werden häufig durch inapparente, persistierende Infektionen in natürlichen Reservoiren erhalten. Koevolutionäre Mechanismen in der Wirt-Virus-Interaktion sowie Spill-over-Infektionen spielen hierbei eine große Rolle (Streicker et al., 2012; Geoghegan et al., 2017). Auch für das neurotrope Borna Disease Virus wurde schon lange ein Vorkommen in natürlichen Reservoiren angenommen (Staheli et al., 2000; Sauder u. Staheli, 2003; Kolodziejek et al., 2005; Dürrwald et al., 2006) und im Jahr 2006 erstmals in der Schweiz bestätigt (Hilbe et al., 2006). In einem Endemiegebiet in der Schweiz wurden BoDV-1-RNA und -Antigen im Gehirn von *C. leucodon* nachgewiesen. Es war jedoch völlig unbekannt, ob diese Spitzmaus die einzige Reservoirspezies ist oder ob sie nur das Reservoir in diesem Endemiegebiet darstellt. Fraglich war, ob sie auch ein potenzielles Reservoir in deutschen Endemiegebieten und damit das generelle Erregerreservoir darstellt. In der vorliegenden Studie, die 337 Kleinsäuger einschließt, wurden BoDV-1-Antigen und -RNA im ZNS, PNS und in der Peripherie in fünf *C. leucodon* erstmals auch aus Endemiegebieten in Bayern nachgewiesen.

Die höchste Dichte an *C. leucodon* befindet sich im Nord- und im Südwesten sowie zentral im Süden von Bayern (Kraft, 2008) (siehe Abb. 5, S. 22). Im Gegensatz zu den Regionen in Nordwestdeutschland, wo *C. leucodon* erhebliche Bestandseinbußen zu verzeichnen hatte, ist die Populationsdichte in Bayern seit 1960 stabil (Kraft, 2008). Die Vorkommenswahrscheinlichkeit von *C. leucodon* ist in bayerischen BoDV-1-Endemiegebieten deutlich höher als in zufällig ausgewählten Gebieten in Bayern (Encarnaç o et al., 2013). Mit Hilfe des Habitatmodells von Encarnaç o et al. (2015) können Endemie-

gebiete mit einer Wahrscheinlichkeit von 70% prognostiziert werden. Die wichtigsten Habitatfaktoren für die Feldspitzmaus sind die mittlere Jahrestemperatur, der Jahresniederschlag und weitläufige Agrar- und Siedlungsflächen in der Umgebung (Encarnaçao et al., 2015). Das Vorkommen der Feldspitzmaus bis 680 m ü. NN (Kraft, 2008) korreliert mit dem Vorkommen der equinen BD (Reichelt, 2009) in Bayern. In der Schweiz, in Seewis und in Malix, konnten allerdings sowohl an BD-erkrankte Pferde wie auch BoDV-1-positive *C. leucodon* in Höhenlagen bis 1130 m ü. NN festgestellt werden (Hilbe et al., 2006; Puorger et al., 2010). Die Populationsdynamik der Feldspitzmaus steht auch im Einklang mit dem jährlich und saisonal variierenden Auftreten der equinen BD. Nach milden Wintern werden vermehrt equine BoDV-1-Infektionen registriert (Reichelt, 2009).

Daten von equiner BD in Bayern konnten aufgrund der Meldepflicht bis 2009 ausgewertet werden (Reichelt, 2009). Die equine BD ist seit 2011 nicht mehr meldepflichtig. Unsere Informationen beschränkten sich daher auf Einsendungen von Probenmaterial an das Institut für Virologie der JLU Gießen. In der Region um Augsburg wurden bis 2009 vermehrt Fälle von equiner BD registriert (Reichelt, 2009). Auch in den Jahren 2015 und 2016 stammten 19 von 41 gemeldeten Pferden aus dem Regierungsbezirk Schwaben (persönliche Mitteilung, Herzog). Die BoDV-1-positiven *C. leucodon* aus dieser Studie stammten aus dem Landkreis Günzburg in Schwaben, der direkt an den Landkreis Augsburg grenzt. In Sachsen-Anhalt gibt es keine Meldungen von equiner BD, obwohl hier BoDV-1-positive *C. leucodon* vorkommen. Dies deutet darauf hin, dass sich der BoDV-1-Infektionszyklus selbständig in der Feldspitzmauspopulation hält, ohne auf eine Infektion der Endwirte angewiesen zu sein (Dürwald et al., 2014).

6.1.1.2 Unterschiedliche Infektionsmuster bei Feldspitzmäusen

Bei fünf BoDV-1-positiven *C. leucodon* (#2001, #5017, #5072, #5071 und #5077) aus dem Landkreis Günzburg konnten unterschiedliche Nachweismuster der Infektion festgestellt werden.

Bei drei BoDV-1-positiven *C. leucodon* (#2001, #5017, #5072) war die Verteilung der viralen RNA und des Antigens vergleichbar mit den in der Schweiz, in Ostdeutschland und in Österreich untersuchten *C. leucodon*. Virales Antigen und RNA wurden im ZNS und PNS detektiert, aber auch in vielen peripheren Organen, wie in der Literatur beschrieben (Hilbe et al., 2006; Puorger et al., 2010; Dürwald et al., 2014; Weissenböck

et al., 2017). Da auch in den Ausscheidungsorganen der Haut inklusive Flankendrüse und Talgdrüsen sowie in der Niere, in der Lunge und in den Speichel- und Tränendrüsen BoDV-1-Antigen und -RNA gefunden wurden, ist eine Virusausscheidung sehr wahrscheinlich ähnlich wie bei persistent infizierten, immunotoleranten, neonatalen Lewis-Ratten (PTI-Ratten) (Narayan et al. 1983; Herzog et al., 1984; Sauder u. Staeheli, 2003). Das Vorhandensein von mRNA und genomischer RNA zeigt die Virusverbreitung in der Peripherie und gilt als Hinweis für eine periphere virale Replikation. Dies ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche virale Ausscheidung und Übertragung auf andere Spezies. Die erfolgreiche Ausscheidung von infektiösem Virus bei *C. leucodon* konnte von Nobach et al. (2015) bestätigt werden.

Die beiden *C. leucodon* #5071 und #5077 spiegeln entweder verschiedene Infektionsverläufe oder verschiedene Zeitpunkte der BoDV-1-Infektion wieder. Bei einer *C. leucodon* (# 5071) waren BoDV-1-Antigen und -RNA fast ausschließlich im ZNS, den Spinalganglien sowie in den peripheren Nerven im Bereich des Kopfes zu finden. Im Nasenepithel konnte virale RNA, aber kein Antigen nachgewiesen werden. Dies spricht für eine frühe Phase der Infektion oder für eine Elimination des Erregers. Diese *C. leucodon* wies keine anti-BoDV-1-Antikörper auf. Bei der zweiten *C. leucodon* (# 5077) wurde ein ähnliches Muster der BoDV-1-Antigen und -RNA-Verteilung festgestellt. Allerdings konnte bei dieser *C. leucodon* deutlich mehr virales Antigen und RNA in den peripheren Nerven gefunden werden. Von dieser Spitzmaus stand keine Blutprobe zur Verfügung. Auch Dürrwald et al. (2014) wiesen bei zwei *C. leucodon* nur im Gehirn, im Magen und in der Lunge BoDV-1-RNA mittels RT-PCR nach, während in der IHC kein BoDV-1-Antigen detektiert wurde. Bei der experimentellen intranasalen Infektion von Lewis-Ratten wurde BoDV-1-Antigen sechs Tage nach der Inokulation im olfaktorischen Epithel und zehn bis 13 Tage nach der Inokulation im Gehirn nachgewiesen (Morales et al., 1988). Kupke (2016) detektierte vier Tagen nach der intranasalen BoDV-1-Infektion von Lewis-Ratten Antigen und mRNA und nach sieben Tagen genomische RNA im olfaktorischen Epithel. Im Gehirn der Ratten waren 14 Tage nach der intranasalen BoDV-1-Infektion sowohl Antigen als auch genomische und mRNA nachzuweisen. Anti-BoDV-1-Antikörper konnten nach intranasaler Infektion von Lewis-Ratten erst ab Tag 20 gefunden werden (Morales 1988). Bei den Spitzmäusen #5071 und #5077 könnte es sich also im Gegensatz zu den zuvor untersuchten *C. leucodon* um eine Frühinfektion handeln (Bourg

et al., 2013, Nobach et al., 2015). Verschiedene Infektionswege oder individuelle Unterschiede im Immunstatus könnten allerdings auch eine Ursache des abweichenden Musters sein.

Ähnlich wie bei den PTI-Ratten zeigten die fünf BoDV-1-positiven *C. leucodon* keine entzündlichen oder degenerativen Läsionen im Nervensystem oder in den peripheren Organen. Ob sie allerdings subtile Veränderungen im Sozialverhalten zeigen, Lern- oder Gedächtnisschwierigkeiten haben, wie es für die PTI-Ratten beschrieben ist, wird Gegenstand weiterführender Untersuchungen im Tiermodell sein. Bei den täglichen Gesundheitschecks wiesen die BoDV-1-infizierten *C. leucodon* in der Haltung keine neurologische Symptomatik oder Gewichtsabweichungen auf (Nobach et al., 2015).

Bei den positiven *C. leucodon* wurde BoDV-1-Antigen und -RNA im olfaktorischen Epithel festgestellt. Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien an experimentell infizierten Ratten überein und spricht für den intranasalen Übertragungsweg mit Virusausbreitung vom olfaktorischen Epithel zum Gehirn, wie es auch Morales et al. (1988) bei den PTI-Ratten festgestellt haben. Die BoDV-1-Ausscheidung über Sekrete, wie beispielsweise Speichel und Urin, wurde in experimentellen Studien bei Ratten nachgewiesen (Narayan et al., 1983; Sauder u. Staeheli, 2003). Nobach et al. (2015) haben durch Analysen von BoDV-1-positiven Wildfängen von *C. leucodon* in der Haltung gezeigt, dass es eine Virusausscheidung über Hautsekrete, Kot, Urin, Tränenflüssigkeit und Speichel gibt. Eine horizontale Übertragung im Reservoir erscheint daher möglich, da es durch den territorialen Charakter von *C. leucodon* häufig zu Beißereien kommt und im Speichel BoDV-1-RNA festgestellt wurde (Nagel u. Nagel, 2005; Nobach et al., 2015). Die kontinuierliche Ausscheidung über die Haut bringt mit sich, dass neugeborene *C. leucodon* von persistent BoDV-1-infizierten Müttern direkt nach der Geburt Erregerkontakt haben und sich mit BoDV-1 infizieren könnten. Aufgrund des Nachweises von BoDV-1-Antigen und -RNA im Uterus einer *C. leucodon* (#5072) kann auch eine vertikale oder sexuelle Übertragung vermutet werden. Dürrwald et al. (2014) haben auch BoDV-1 Antigen in Uterus, Hoden und Nebenhoden nachgewiesen.

Zwei weitere adulte *C. leucodon* (#5063 und #5066) wiesen anti-BoDV-1-Antikörper auf, ohne dass virales Antigen oder RNA nachgewiesen wurden. Die beiden Tiere könnten auf eine Infektion mit Virusclearance im immunkompetenten Alter hindeuten.

Zusammenfassend kann festhalten werden, dass es unterschiedliche Infektionsmuster bei den bisher untersuchten *C. leucodon* gibt. Inwieweit die Genetik, der individuelle Immunstatus, das Alter des Wirtes, die individuelle BoDV-1-Empfänglichkeit, die Infektionsroute oder die Virusdosis und Virulenz des Feldvirus eine Rolle spielen, muss im Tiermodell weiter untersucht werden. Die Rolle des genetischen Hintergrunds wurde bereits bei Ratten- und Mausstämmen nachgewiesen (Herzog et al., 1991; Hallensleben et al., 1998; Wu et al., 2013). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Infektionsverläufe könnte sein, dass es sowohl zu persistenten Infektionen im Neugeborenenalter durch eine Immuntoleranz wie auch zu Spill-over-Infektionen in den *C. leucodon* kommen kann (Weissenböck et al., 2017). In diesem Sinne sind weiterführende Studien über das Immunsystem der *C. leucodon* und die Bedeutung der EBLN für die Viruspersistenz und Übertragung notwendig.

6.1.1.3 Bestätigung der Feldspitzmaus als Reservoir für BoDV-1

Die Sequenzierung des BoDV-1-Genomes von *C. leucodon* #5017 aus dem eigenen Untersuchungsmaterial konnte die Reservoirtheorie weiter bestätigen. Es bestand eine Nukleotidsequenzhomologie von 98% (über 2150 Nukleotide, Abdeckung der Gene für BoDV-N, -X und -P und der Hälfte von BoDV-M) zwischen der Spitzmaussequenz und BoDV-1-Isolaten aus dem Baden-Württemberg-Bayern-II-Cluster (Bourg et al., 2013). Damit passte die Sequenz der positiven *C. leucodon* #5017 genau in das Cluster. In unserem Untersuchungsgut war keine der drei *C. leucodon* aus den Landkreisen Eichstätt, Erlangen-Höchstadt und Neumarkt in der Oberpfalz BoDV-1-positiv. Diese Regionen gehören zum BoDV-Bayern-1-Cluster und hätten einen Vergleich zwischen zwei endemischen Regionen in Bayern ermöglicht (Kolodziejek et al., 2005).

Die Feldspitzmaus konnte als ein Reservoir für BoDV-1 in Bayern bestätigt werden (Bourg et al., 2013). Der Nachweis einer dauerhaften und kontinuierlichen Ausscheidung von BoDV-1 in der Feldspitzmauspopulation stammt aus Untersuchungen von natürlich infizierten *C. leucodon* (Nobach et al., 2015). Durch die Erkenntnisse von Bourg et al. (2013) und Nobach et al. (2015) kann die *C. leucodon*-Population im bayerischen Endemiegebiet als Virusreservoir bezeichnet werden (Ashford, 2003). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich andere epidemiologisch an *C. leucodon* gebundene Populationen eine Rolle bei der Infektion der Endwirte spielen (Haydon et al., 2002).

Lange Zeit standen Nagetiere (Rodentia) als natürliche BoDV-1-Reservoirs im Vordergrund der Überlegungen (Sauder u. Staeheli, 2003; Dürrwald et al., 2007; Kinnunen et al., 2007 u. 2011). Allerdings ermöglichen der territoriale Charakter, das Sozialverhalten und die geringe Dispersionsdistanz von *C. leucodon*, im Gegensatz zu Nagetieren, eher epidemiologische Hotspots (Dürrwald et al., 2014). Auch Fledermäuse (Chiroptera) wurden immer wieder als natürliche Reservoirs für *Mononegavirales* bestätigt (Drexler et al., 2012). Die Theorie über das Vorkommen von BoDV-1-Infektionen bei Fledermäusen und Nagetieren sowie ihr Potential als Erregerreservoir wird durch Nachweise von endogenen Borna-ähnlichen Elementen in ihrem Genom bestärkt (Beyli et al., 2010; Horie et al., 2010; Kinnunen et al., 2011; Dacheux et al., 2014). Da Tiere mit EBLN im Genom anscheinend resistenter gegen die Bornavirus-Infektion zu sein scheinen, wird die Endogenisation als Zeichen der adaptiven Koevolution gewertet. Möglicherweise schützen die EBLN den Wirt auf bisher ungeklärte Weise vor einer klinischen Bornavirus-Infektion und sind eine neue Form antiviraler Abwehr (Fujino et al., 2014; Honda u. Tomonaga 2016).

6.1.1.4 Weitere potentielle Kleinsäugerreservoirs

Eine Arbeitsgruppe in Finnland zeigte, dass wildlebende *M. glareolus* (Rötelmäuse) anti-BoDV-1-Antikörper aufweisen können und empfänglich für experimentelle BoDV-1-Infektionen sind (Kinnunen et al., 2007; Kinnunen et al., 2011). Das Verteilungsmuster von BoDV-1 ist zwar primär neurotrop bei intrazerebral infizierten neonatalen *M. glareolus*, aber BoDV-1 konnte auch im Urin und in den Fäzes festgestellt werden. Kinnunen et al. (2011) gehen davon aus, dass *M. glareolus* ein Reservoir für BoDV-1 darstellen könnte. Im Zuge der eigenen Studie konnten keine Anzeichen einer BoDV-1-Infektion bei den untersuchten *M. glareolus* gefunden werden. Allerdings stand mit fünf *M. glareolus* nur eine geringe Anzahl an Tieren zur Verfügung.

Weissenböck et al. (2017) beschrieben kürzlich eine wildlebende *S. araneus* mit einer BoDV-1-Infektion, welche sich vor allem im ZNS und PNS manifestierte. Das BoDV-1-Verteilungsmuster in den positiven *S. araneus* ist denen von Endwirten wie Pferden und Schafen ähnlicher als jenen des Reservoirwirtes *C. leucodon*. Im Gegensatz zu den Endwirten lagen allerdings keine entzündlichen Veränderungen im Gehirn vor. Es handelt sich daher höchstwahrscheinlich um eine Spill-over-Infektion durch eine hohe Virus-

last im endemischen Gebiet (Weissenböck et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit konnten bei zwei (von 24 mittels IIFT getesteten) bayerischen *S. araneus* anti-BoDV-1-Antikörper gefunden werden. Es konnte allerdings weder BoDV-1-RNA noch -Antigen im Gehirn und der Peripherie festgestellt werden. Spill-over-Infektionen spielen eine große Rolle beim Wirtswechsel von RNA-Viren (Schlegel et al., 2012). Weitere Untersuchungen von wildlebenden Kleinsäugetieren in den Endemiegebieten sind aus diesem Grund anzustreben.

6.1.2 Nachweis von BoDV-1-spezifischen Antikörpern bei wildlebenden Kleinsäugetieren

Im Zuge der Studie (Bourg et al., 2013; zusätzliche Untersuchungen in dieser Arbeit) wurden seroepidemiologische Daten über das Vorkommen von anti-BoDV-1-Antikörpern bei wildlebenden Kleinsäugetieren erhoben. Dafür wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) durchgeführt. Schlegel et al. (2012) zeigten, dass der Kaninchen-anti-suncus-IgG mit Seren von *Crocidura sp.* und *Sorex sp.* reagiert. Bei den Mäusen wurde ein Ziege-anti-Maus-IgG verwendet. Bislang untersuchten nur Vahlenkamp et al. (2002) Mäuse in einem Stall mit BD bei Schafen in Südostdeutschland. Sie konnten allerdings keine anti-BoDV-1-Antikörper nachweisen.

Seroepidemiologische Untersuchungen ermöglichen einen großen Probendurchlauf und werden regelmäßig im Zuge von Wildtiergesundheitsprogrammen angewendet. Serologische Assays erkennen Antikörper, die durch Infektionen oder Impfungen induziert werden und können auch vergangene Expositionen mit den Erregern nachweisen. Die Einschränkungen der Serologie sind eine eventuelle geringe Präzision der Antikörper sowie unspezifische Kreuzreaktionen (Gilbert et al., 2013).

Insgesamt wurden bei 16 Kleinsäugetieren anti-BoDV-1-Antikörper nachgewiesen. Neben *C. leucodon* konnten auch bei Waldspitzmäusen (*S. araneus*), Hauspitzmäusen (*Crocidura russula*), Hausmäusen (*Mus musculus*), einer Zwergmaus (*Micromys minutus*), einer Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und einer Wühlmaus (*Microtus sp.*) anti-BoDV-1-Antikörper detektiert werden. Es konnte jedoch weder BoDV-1-Antigen noch -RNA bei diesen Kleinsäugetieren außer bei den *C. leucodon* festgestellt werden. Keiner der Kleinsäu-

ger zeigte charakteristische histologische Veränderungen, wie beispielsweise eine Entzündung oder Degeneration im Nervensystem. Die Antikörper-Titer reichten bei den Feldspitzmäusen bis zu 1:20480 (#5017) und bei den anderen Kleinsäugetieren bis zu 1:320 (#11014 und #15001). Aufgrund der geringen Körpermasse und Blutvolumens war eine Titerbestimmung nicht immer möglich. Zum Teil wurden blutige Thorakal- und Abdominalergüsse für die serologischen Untersuchungen genutzt. Demzufolge darf die Titerbestimmung nur als Anhaltspunkt dienen.

Die Verteilung der seropositiven Kleinsäugetiere zeigt, dass sowohl in Endemiegebieten, wie beispielsweise der Schwäbischen Alb oder dem Regierungsbezirk Schwaben, aber auch in Nichtendemiegebieten BoDV-1-spezifische Antikörper auftreten (siehe Abb. 8, S. 59). In Hessen, wo seit Jahrzehnten keine equinen Bornafälle mehr aufgetreten sind, wurden zwei seropositive Hausspitzmäuse gefunden. Ob es auch hier Reservoirpopulationen gibt, in denen sich BoDV-1 ohne Übertragung auf Pferde oder Schafe halten kann, muss daher weiter untersucht werden.

Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für die rein seropositiven Kleinsäugetiere. Vermutlich handelt es sich bei diesen Tieren um Spill-over-Wirte, bei denen die Infektion nicht ansteht. Spill-over-Infektionen spielen eine große Rolle bei der Evolution von RNA-Viren (Schlegel, 2012). Erklärungen hierfür sind verschiedene genetische Hintergründe, Altersunterschiede zum Infektionszeitpunkt, Geschlechtsunterschiede oder unterschiedliche immunologische Voraussetzungen. Im Gegensatz zu den vermutlich immuntoleranten, persistent infizierten *C. leucodon* handelt es sich bei den seropositiven Kleinsäugetieren vermutlich um immunkompetente Tiere. Ein Großteil der seropositiven Kleinsäugetiere gehörten zu der Familie der Soricidae, weshalb man deren Vertreter besonders berücksichtigen sollte, um eventuelle weitere natürliche Reservoirs für BoDV-1 oder andere Bornaviren auszumachen.

6.1.3 Betriebe mit dem Vorkommen sowohl der Feldspitzmaus als auch der Bornaschen Krankheit beim Pferd

6.1.3.1 Charakterisierung der Betriebe mit dem Vorkommen von equiner BD

Die untersuchten Kleinsäuger stammen aus Schädlingsbekämpfungsmaßnahmen von Pferdeställen in denen in den Jahren 1994 bis 2014 Fälle von klinischer BD bei Pferden aufgetreten sind. Von zwölf verschiedenen Betrieben konnten zudem Daten über die Ställe, die Umgebung und die Haltungsbedingungen erhoben und analysiert werden. Zu den anderen vier Betrieben waren keine weiteren Informationen verfügbar, weil es sich um Pferdepraxen und -Kliniken oder Privatpersonen handelte. Die Anzahl an Pferden auf den Betrieben variierte von zwei bis 60, mit einer durchschnittlichen Anzahl von 27 Tieren. Sowohl kleinere als auch Betriebe mit über 40 Pferden hatten equine BD-Fälle registriert. In vier Ställen wurde von einer einzigen BD-Erkrankung im Betrieb berichtet. Sieben Ställe hatten jeweils zwei bis vier equine BD-Fälle in den letzten 20 Jahren. Allerdings wird die Aufklärungsrate bei Todesfällen mit neurologischem Ursprung nur zu einem geringen Prozentsatz aufgeklärt, und einige BD-Erkrankungen somit wahrscheinlich nicht diagnostiziert. Außerdem gibt es verschiedene Verlaufsformen der equinen BD. Am häufigsten kommen klinisch inapparente Fälle vor (Richt et al., 2000; Staeheli et al., 2000; Grabner et al., 2002; Herden et al., 2013; Tizard et al., 2016). Die Seroprävalenz liegt bei 22,5% in den endemischen Gebieten und bei bis zu 50% in betroffenen Ställen (Herzog et al., 1994; Grabner et al., 2002). In den eigenen Untersuchungen schien es keine Bedeutung zu haben, wie viele Kontakte es zu betriebsfremden Pferden in den einzelnen Betrieben gab. Diese Beobachtung passt zu der Annahme, dass die horizontale Übertragung zwischen Endwirten keine Rolle spielt (Kolodziejek et al., 2005; Dürrwald et al., 2006; Weissenböck et al., 2017).

In den Betrieben gab es neben den Pferden vor allem Hunde und Katzen, aber kaum Nutztiere. Drei Betriebe (1, 2 und 8) hatten eine kleine Geflügelhaltung und bei einem Betrieb (1) gab es noch einen Esel und eine Ziege. Fast alle Boxen wurden täglich gereinigt, mit Ausnahme von zwei Ställen (Betriebe 5 und 7), bei denen die Pferde in Matratzenhaltung standen. In einem der Ställe mit Matratzenhaltung (Betrieb 5) konnten vier BoDV-1-positive *C. leucodon* detektiert werden. In Betrieb 7 wurde ein Teil der Pferde

auf einer Strohmattatze gehalten. In diesem Betrieb konnten keine Kleinsäuger gefangen werden, allerdings gab es hier mindestens vier equine Bornafälle. Auch Dürrwald et al. (2006) sehen einen Zusammenhang zwischen den hygienischen Bedingungen und dem Vorkommen equiner BD. In der Umgebung der Betriebe waren hauptsächlich Ackerland und Wiesen zu finden, weniger Siedlungen und Waldflächen. Diese Beobachtungen passen mit den Habitatbedingungen des Reservoirwirtes *C. leucodon* überein (Kraft, 2008; Encarnação et al., 2013). Zugangsmöglichkeiten für Kleinsäuger gab es auf fast allen Betrieben im Stall und in der Futterkammer, und somit bestand jederzeit die Möglichkeit des Eindringens von Kleinsäufern. Eine Schädlingsbekämpfung wurde fast ausschließlich über die Hofkatzen oder bei Hinweisen auf einen Befall mit Hilfe von Giftködern (fünf Betriebe) oder Totschlagfallen (zwei Betriebe) durchgeführt. Ein Großteil der Kleinsäuger, die von den Betrieben zur Verfügung gestellt wurden, waren demzufolge Totfunde durch Katzenfänge.

6.1.3.2 Mögliche Übertragungswege von der Feldspitzmaus auf das Pferd

Im Frühjahr und Frühsommer wird eine Anhäufung von klinischer BD bei Pferden registriert (Dürrwald et al., 2006; Reichelt, 2009). Allgemein geht man von einer Inkubationszeit von zwei bis vier Monaten bei einer natürlichen equinen BoDV-1-Infektion aus (Rott u. Becht, 1995; Katz et al., 1998). Viele Pferde werden im Herbst und Winter im Stall gehalten. Ungünstige Witterungsbedingungen und die Nahrungsmittelknappheit in diesem Zeitraum stimulieren auch die Feldspitzmäuse zum Rückzug in Ställe und Gebäude (Kraft, 2008). In dieser Zeit des intensiven Kontakts kann es zu einer Virusübertragung mit Infektion der Endwirte kommen. Da alle positiven *C. leucodon* in den Futterkammern oder in der Nähe der Futterplätze gefangen wurden, besteht die Möglichkeit einer Verunreinigung des Futters durch die Ausscheidungen der Reservoirwirte. Nobach et al. (2015) bestätigten, dass BoDV-1-positive *C. leucodon* kontinuierlich infektiöses Virus über mehrere Wege ausscheiden, inklusive über den Urin und den Kot. Die positiven Tiere können somit eine Infektionsquelle für die Pferde darstellen. Bornaviren können bei einer Temperatur von 4°C über drei Monate infektiös bleiben. Allerdings werden sie durch die gängigen Desinfektionsmethoden inaktiviert (Danner et Mayr, 1979; Herden et al., 2013).

Der wichtigste Beweis für eine Beteiligung der Feldspitzmaus bei der Übertragung der Infektion auf Pferde ist die Sequenzhomologie. Bei einer Feldspitzmaus aus dem Betrieb 5 im Landkreis Günzburg in Schwaben gab es eine 100% Homologie über eine Länge von 2150 Nukleotiden (Gene für BoDV-N, -P, -X und die Hälfte von BoDV-M) zu einer Sequenz eines an BD erkrankten Pferdes aus demselben Stall (Bourg et al., 2013).

Die geringe Anzahl an klinisch betroffenen Pferden im Gegensatz zu dem hohen Anteil an seropositiven Pferden in den jeweiligen Ställen zeigt jedoch, dass zusätzliche Faktoren für eine erfolgreiche BoDV-1-Infektion und eine nachfolgende klinische Erkrankung des FehI-/Endwirts eine Rolle spielen müssen. Die Infektionsdosis und die Virulenz des Feldvirus oder die Genetik, das Alter und der Immunstatus des Tieres könnten hier eine Rolle spielen (Herden et al., 2013). Die Prävalenz der BoDV-1-infizierten *C. leucodon* variierte je nach Endemiegebiet in der Schweiz, Deutschland und Österreich von 5 bis 100% (zusammengefasst in Nobach et al., 2015). Dies weist auf eine unterschiedliche Durchseuchungsquote in den Feldspitzmauspopulationen hin. Auch können soziale Unterschiede in der Populationstruktur, eine plötzliche Vermehrung der *C. leucodon* oder ihr vermehrter Rückzug in die Ställe eine Rolle bei der Übertragung auf die Endwirte spielen (Weissenböck et al., 2017). Obwohl in Ostdeutschland BoDV-1-positive *C. leucodon* vorkommen, gibt es keine aktuellen Artikel über die equine BD (Dürrwald et al., 2014). Im mitteldeutschen Endemiegebiet (Sachsen, Thüringen und Sachsen-Anhalt) war die BD bis zum Jahr 2000 stark rückläufig und beschränkte sich auf Einzelfälle. Seit der Aufhebung der Meldepflicht (2011) sind keine gesicherten Daten mehr verfügbar. Der letzte Fall aus der Klinik für Pferde der Universität Leipzig datiert aus dem Jahre 2013 (persönliche Mitteilung, Uhlig).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Studie zuverlässige Hinweise auf eine BoDV-1-Übertragung vom Reservoirwirt *C. leucodon* auf den Endwirt Pferd in Bayern liefert. Weiterführende Untersuchungen zur Ausscheidung bei den *C. leucodon* und Übertragung sowohl in der *C. leucodon*-Population als auch auf den Endwirt sind notwendig. Zum Schutz vor einer BoDV-1-Infektion sollten die Pferde in Endemiegebieten aus Heuraufen und Futtertrögen anstatt vom Boden gefüttert werden, um eventuelle Kontaminationen des Futters durch Ausscheidungen von BoDV-1-positiven *C. leucodon*

auszuschließen. Das Futter sollte hygienisch in geschlossenen Boxen oder Räumen gelagert, und die Einstreu regelmäßig gewechselt werden. Auf eine konsequente Schädlingsbekämpfung ist zu achten.

6.2 Verlauf von BoDV-1-Infektionen bei kleinen Karnivoren (Rotfuchs, Dachs, Marderartige)

6.2.1 Vorkommen von anti-BoDV-1-Antikörpern bei kleinen Karnivoren

Blut- und Gehirnproben von 232 Füchsen (*Vulpes vulpes*), elf Dachsen (*Meles meles*) und zwei Marderartigen (*Mustela nivalis* und *Mustela putorius*) aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen wurden auf anti-BoDV-1-Antikörper und BoDV-1-RNA untersucht (Bourg et al., 2016). Bei den serologisch positiven Tieren wurde zusätzlich eine histologische und immunhistologische Untersuchung angeschlossen. Alle kleinen Karnivoren mit einer Enzephalitis wurden auf acht verschiedene Erreger untersucht. Insgesamt zeigten 37 Füchse und ein Dachs anti-BoDV-1-Antikörper mit Titern von 1:40 bis 1:2560. Es liegen bislang kaum weitere Daten zu Seroprävalenzen bei Füchsen und anderen kleinen Karnivoren vor. Kinnunen et al. (2007) beschreiben einen gesunden, seropositiven Hund aus einem Betrieb in Finnland, in dem auch ein seropositives Pferd festgestellt wurde. Die anti-BoDV-1-Antikörper können eine Reaktion der kleinen Karnivoren auf einen spezifischen Erregerkontakt sein. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Kreuzreaktion auf andere Erreger handelt, obwohl die Ergebnisse des Western Blots dagegen sprechen (Gilbert et al., 2013).

6.2.2 Enzephalitiden bei kleinen Karnivoren

6.2.2.1 Untersuchung auf BoDV-1-Infektion

Insgesamt wurde bei 16 Füchsen eine nicht-eitrige Enzephalitis festgestellt. Die perivaskulären, mononukleären Infiltrate und Gliaknötchen deuteten auf einen viralen Ursprung der Enzephalitis hin. BoDV-induzierte Enzephalitiden im Endwirt Pferd zeigen die gleichen histologischen Merkmale (Joest u. Degen, 1911; Herden et al., 2013). Bei sieben

Füchsen mit Enzephalitis wurden zudem anti-BoDV-1-Antikörper nachgewiesen. Es fanden sich allerdings weder BoDV-1-Antigen noch -RNA im Gehirn der Karnivoren. Zusätzlich zu den gängigen RT-PCR-Assays wurde eine neu entwickelte pan-Borna-RT-PCR angewendet, um eventuelle Varianten von Bornaviren zu erkennen. Auch eine metagenomische Analyse von drei Gehirnproben von seropositiven Füchsen mit Enzephalitis wurde am Friedrich-Löffler-Institut in Riems (Deutschland) durchgeführt. Diese konnte allerdings keine bornaviruspezifischen Sequenzen in den Gehirnproben der Füchse detektieren. Metagenomische Untersuchungen haben in den letzten Jahren dazu beigetragen, viele neue Pathogene, wie beispielsweise auch VSBV-1, zu entdecken (Dacheux et al., 2014; Hoffmann et al., 2015).

Unveröffentlichte Daten von Zimmermann et al., die von Kolodziejek et al. (2005) beschrieben wurden, bestätigen die Abwesenheit von BoDV-1-RNA in Gehirnproben bei kleinen, wildlebenden Karnivoren. In den Jahren 1994 bis 1995 wurden Fuchs-, Dachs- und Mardergehirnproben in endemischen Gebieten in Ostdeutschland mittels RT-PCR auf BoDV-1-RNA untersucht. Alle Tests waren negativ (Kolodziejek et al., 2005). Auch Lempp et al. (2017) konnten kein BoDV-1-Antigen mittels Immunhistologie (mit Antikörpern gegen BoDV-N) bei neun Füchsen mit nicht-eitriger Enzephalitis aus Norddeutschland nachweisen. Ob es sich bei den Nachweisen von BoDV-1-RNA im Gehirn von Füchsen aus Frankreich um echte Nachweise oder um falsch-positive unspezifische Banden beziehungsweise um Laborkontaminationen handelt, bleibt fraglich, da die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren (Dauphin et al., 2001). Als gesichert gelten die Nachweise bei einem Hund in Österreich (Weissenböck et al., 1998) und einem Hund in Deutschland (unveröffentlichte Daten von Zimmermann et al., beschrieben von Kolodziejek et al., 2005), da von diesen beiden Tieren Virussequenzen in der GenBank hinterlegt sind. Von einem an BoDV-1-erkrankten Hund in Japan ist keine Virussequenz veröffentlicht (Okamoto et al., 2002). Bisher gibt es keine Nachweise von endogenen Bornavirus-ähnlichen Nukleoprotein-Elementen im Genom von kleinen, wildlebenden Karnivoren.

6.2.2.2 Mögliche Ursachen der Enzephalitiden

Amude et al. (2010) erläutern die Möglichkeit von virusinduzierten Enzephalitiden, selbst wenn das Virus zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mehr nachweisbar ist. Auch Ludlow et al. (2016) beschreiben sowohl eine unmittelbare, wie auch eine verzögerte neuropathologische Reaktion bei viralen Infektionen. Somit kann auch die auf die Infektion

folgende Immunantwort zu einer irreversiblen Schädigung im ZNS führen. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Bornaviren eine Rolle bei der Entstehung der Enzephalitiden der Füchse gespielt haben. In diesem Zusammenhang werden auch immer wieder canine Staupeviren erwähnt, und bei sechs von 16 Füchsen mit einer nicht-eitrigen Enzephalitis wurde eine Infektion mit dem caninen Staupevirus mittels RT-PCR und IHC bestätigt. Die Staupeinfektion von Fuchs #21 konnte mittels metagenomischer Analyse bestätigt werden. Weitere zehn Enzephalitiden bei den Füchsen sind ätiologisch unklar geblieben. Eine Tollwutinfektion konnte mittels direktem Immunfluoreszenztest ausgeschlossen werden. Immunhistologische Methoden zum Nachweis von Toxoplasmen (*T. gondii*), caninen Adenoviren (CAV-1) und suiden Herpesviren (SHV-1) sowie molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Flaviviren und Parvoviren konnten keinen Hinweis auf einen dieser Erreger geben. Bei den Fuchsgehirnproben aus Bourg et al. (2016) handelte es sich um die Tollwutrückstellproben aus veterinärmedizinischen Untersuchungsämtern. Die Proben bestanden also hauptsächlich aus Anteilen des Hippocampus, des zerebralen Cortex, des Thalamus, der Pons und/oder der Medulla oblongata. Teilweise war auch ein Teil der Meningen vorhanden. Dies führte dazu, dass meistens nicht das gesamte Gehirn zur Untersuchung vorlag und so teilweise nicht die optimale Gehirnregion für den bestimmten Erregernachweis vorhanden war. Diese Tatsache könnte zu falsch-negativen Resultaten geführt haben. Es besteht auch die Möglichkeit, dass bislang unbekannte neurotrope Erreger bei den Füchsen eine Rolle gespielt haben oder eine Speziesbarriere überschritten haben. Dieses Risiko ist vor allem im Zusammenhang mit RNA-Viren beschrieben (Cleaveland et al., 2001; Woolhouse et al., 2005; Geoghegan et al., 2017).

Bei Hunden wurden z.B. anti-GFAP-Antikörper in der CSF im Zuge von nicht-eitrigen Enzephalitiden unklarer Genese festgestellt (Shibuya et al., 2007; Toda et al., 2007; Ushida et al., 2016). Da diese Antikörper einen Hinweis auf immunvermittelte Enzephalitiden geben könnten, sollte die Untersuchung der CSF auf anti-GFAP-Antikörper in Zukunft bei Füchsen miteingeschlossen werden. In dieser Studie lagen allerdings nur Gehirn- und Blutproben vor. Auch andere Autoimmunerkrankungen wie die Anti-NMDA-Enzephalitis, die bei Eisbär Knut diagnostiziert wurde, könnten eine größere Rolle bei der Entstehung von Enzephalitiden bei Karnivoren spielen als bisher angenommen (Prüss et al., 2015). Zudem könnten hereditäre Erkrankungen, wie sie beim Hund bekannt sind, von Bedeutung sein (Maxie u. Sameh, 2007).

6.2.2.3 Füchse als Reservoir für BoDV-1?

Soweit bisher untersucht, stellen Füchse und andere kleine Karnivoren somit im Gegensatz zu *C. leucodon* kein Reservoir für BoDV-1 dar. Sowohl in den endemischen als auch in den nicht-endemischen Regionen in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen konnten allerdings anti-BoDV-1-Antikörper bei kleinen Karnivoren festgestellt werden. Füchse sind jedoch Naturherde für viele Infektionen. Vor allem Enzephalitiden bleiben öfters trotz modernster Nachweismethoden heutzutage immer noch ungeklärt (Bourg et al., 2016; Lempp et al., 2017). Durch das Vorkommen der Füchse in der Nähe des Menschen können sie ein potentiell Risiko für bisher nicht bekannte oder auch potentiell zoonotische Erreger darstellen. Großflächige Untersuchungen von Füchsen zur Aufklärung dieser nicht-eitrigen Enzephalitiden sind daher anzustreben.

6.3 Potentieller Zusammenhang zwischen BoDV-1-Infektionen der Feldspitzmaus und der kleinen Karnivoren

Ein Ziel dieser Studie war es, die potentielle Interaktion und Erregerübertragung zwischen dem Reservoirwirt *C. leucodon* und kleinen Karnivoren, vor allem Füchsen, auszuarbeiten. In den untersuchten Gebieten in Deutschland kommen *C. leucodon* und kleine Karnivoren flächendeckend vor, dies sowohl in BoDV-1-Endemie- als auch in Nichtendemiegebieten (Dieterlen, 2005; Kraft, 2008). Füchse haben eine große Streifgebietsgröße und legen besonders in Zeiten der Nahrungsknappheit viele Kilometer zurück (Macdonald, 1993). Diese Eigenschaft könnte eine Virusverschleppung begünstigen. Zwischen den *C. leucodon* und den kleinen Karnivoren besteht sowohl ein direkter Kontakt über die Nahrungskette als auch ein indirekter Kontakt über die Nutzung der gleichen Lebensräume. Die Hauptnahrungsquelle von Füchsen sind Wühlmäuse (*Microtus sp.*), welche die gleichen trockenen und extensiv genutzten Flächen bewohnen wie *C. leucodon* (Lanzki u. Heltai, 2002; Kraft, 2008; Kidawa u. Kowalczyk, 2011). Außerdem steht die Feldspitzmaus auch auf dem Speiseplan von Füchsen und kleinen Karnivoren, wie zahlreiche Funde von Spitzmausresten in den Fäzes von Rotfüchsen, Dachsen sowie Iltissen und Wiesel zeigen (Kauhala et al., 1998; Lanzki u. Heltai 2002; Padial et al., 2002; Dieterlen, 2005). In Zeiten der Nahrungsknappheit, vor allem im Winter, ziehen

sich Feldspitzmäuse häufig in die Nähe von menschlichen Siedlungen zurück (Kraft, 2008). Auch Füchse und kleine Karnivoren ziehen immer mehr in die Nähe des Menschen (Macdonald, 1993; Contesse et al., 2004). Somit kann es vor allem in den Wintermonaten zu Kontaktpunkten zwischen den beiden Spezies kommen. Eine Übertragung von BoDV-1 durch positive *C. leucodon* auf kleine Karnivoren in Endemiegebieten wäre somit über mehrere Wege möglich, insbesondere da *C. leucodon* BoDV-1 über viele Wege ausscheidet (Nobach et al., 2015).

Es konnten allerdings kein BoDV-1-Antigen oder virale RNA im Gehirn der seropositiven kleinen Karnivoren aus der gleichen Region wie die BoDV-1-positiven *C. leucodon* detektiert werden. Nicht alle seropositiven Kleinsäuger und kleine Karnivoren stammten aus den BoDV-1 Endemiegebieten. Auch in Nichtendemiegebieten, wie in Hessen und in Teilen Baden-Württembergs, gab es sowohl seropositive Kleinsäuger als auch seropositive Füchse. Dies wird in der Literatur auch für die Endwirte Pferd und Schaf beschrieben (Herzog et al., 1994; Grabner et al., 2002). Gründe hierfür können exogene und endogene Faktoren sowie unterschiedliche Viruseigenschaften sein. Herzog et al. (1994) vermuten, dass stabile equine BoDV-1-Varianten mit veränderter Pathogenität eine Rolle spielen könnten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Interaktion zwischen den BoDV-1-positiven *C. leucodon* und den kleinen Karnivoren zumindest laut unseren bisherigen Daten keine Rolle im BoDV-1-Infektionszyklus spielt. Weiterführende Untersuchungen zur Bedeutung der seropositiven kleinen Karnivoren wie die Untersuchung von weiteren Organen könnten Klarheit bringen. Spill-over-Infektionen, wie bei einer *S. araneus* aus Österreich (Weissenböck et al., 2017) könnten allerdings jederzeit stattfinden und zeichnen neurotrope RNA-Viren aus. Epidemiologische Studien in Kombination mit virusökologischen Fragestellungen sind demzufolge essentiell für das weitere Verständnis über die Verbreitung, den Erhalt und die Übertragung von BoDV-1 und weiterer neurotroper und potentiell zoonotischer Viren.

7 Zusammenfassung

Die Bornasche Krankheit wird durch das Borna Disease Virus 1 (BoDV-1), einem Virus aus der Ordnung *Mononegavirales*, ausgelöst. Vor allem Pferde und Schafe können an dieser tödlich endenden Krankheit, die eine Meningoenzephalitis auslöst, erkranken. Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen wird seit längerem ein natürliches Virusreservoir in den Endemiegebieten vermutet. In der Schweiz wurde BoDV-1 im Jahre 2006 bei Feldspitzmäusen (*C. leucodon*) nachgewiesen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Virusreservoirs in den Endemiegebieten in Bayern. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Rolle der Feldspitzmaus und die unterschiedlichen Verläufe der Infektion bei den Kleinsäugetieren gelegt. Zusätzlich sollten zuverlässige Nachweise einer BoDV-1-Übertragung von der Spitzmaus auf das Pferd erbracht werden. In einem zweiten Teil der Studie wurde untersucht, ob sich Füchse (*Vulpes vulpes*), Dachse (*Meles meles*) und andere kleinen Karnivoren durch den Kontakt mit BoDV-1-infizierten Feldspitzmäusen anstecken und als Reservoir fungieren können.

Für den ersten Teil der Studie wurden insgesamt 337 Kleinsäugetiere, davon 87 Soricidae, 122 Muridae und 128 Cricetidae aus der Schädlingsbekämpfung von 16 Pferdebetrieben beziehungsweise von Privatpersonen aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen untersucht. Elf Betriebe aus Endemiegebieten in Bayern verzeichneten mindestens einen Fall von equiner Bornascher Krankheit. Die Auswertung der Betriebsdaten zeigte unter anderem, dass die Umgebung der Betriebe mit den Habitatbedingungen von *C. leucodon* korrelierte und es in fast allen Betrieben offene Zugänge zu Ställen und Futterkammern gab, die ein Eindringen von Kleinsäugetieren ermöglichten. Die Kleinsäugetiere wurden auf anti-BoDV-1-Serumantikörper mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT) und auf BoDV-1-RNA mittels RT-qPCR und nested-RT-PCR untersucht. BoDV-1-positive Tiere und Kontrolltiere wurden zusätzlich mittels Immunhistologie (IHC) und In-situ-Hybridisierung (ISH) auf BoDV-1-Antigen, genomische und messenger RNA untersucht und die virale RNA wurde sequenziert.

Bei fünf *C. leucodon* waren BoDV-1-RNA und -Antigen im zentralen und peripheren Nervensystem, sowie in peripheren Organen und Geweben nachweisbar. Von diesen fünf *C. leucodon* waren drei seropositiv mit Titern bis zu 1:20480, eine wies einen Titer von

<1:10 auf, und von einer *C. leucodon* war kein Serum verfügbar. Zwei *C. leucodon* waren nur serologisch positiv. Die BoDV-1-positiven *C. leucodon* stammten aus zwei Betrieben im Landkreis Günzburg in Schwaben. Der Vergleich der Virussequenzen einer BoDV-1-positiven *C. leucodon* und einem an BD erkrankten Pferd aus demselben Betrieb ergab eine 100% Homologie. Zusätzlich konnte eine 98% Homologie zu anderen Feldisolaten aus dem Cluster Baden-Württemberg und Bayern II festgestellt werden (über 2150 Nukleotide). Desweiteren wurden noch bei sechs Soricidae, vier Muridae und einer Cricetidae anti-BoDV-1-Antikörper mit Titern bis zu 1:320 festgestellt.

Im zweiten Teil der Studie wurden Blut- und Gehirnproben von 232 Rotfüchsen, elf Dachsen, einem Mauswiesel (*Mustela nivalis*) und einem Iltis (*Mustela putorius*) aus Bayern, Baden-Württemberg und Hessen auf anti-BoDV-1-Serumantikörper, BoDV-1-RNA und ggf. auf BoDV-1-Antigen mittels IIFT, RT-qPCR, nested-RT-PCR und IHC untersucht. Eine speziell entwickelte pan-Borna-RT-PCR, die auch das zoonotische VSBV-1 erkennt, sowie eine metagenomische Analyse von drei repräsentativen Gehirnproben wurden weiterhin angewendet. Insgesamt lagen bei 38 von 238 untersuchten Kleinsäugetieren (37 Füchse und ein Dachse) anti-BoDV-1-Antikörper vor. Die Titer reichten von 1:40 bis 1:2650. Die positiven IIFT-Resultate wurden mit Hilfe eines Western Blots bestätigt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Vorkommen von seropositiven Füchsen aus Endemie- und Nichtendemiegebieten festgestellt werden. Histologisch wiesen 16 Rotfüchse eine nicht-eitrige (Meningo-) Enzephalitis auf. Es konnte jedoch weder BoDV-1-Antigen noch -RNA im Gehirn der Tiere nachgewiesen werden. Bei sechs von zehn Füchsen wurde eine Staupeinfektion festgestellt, allerdings konnte bei den restlichen zehn Tieren die Ursache der Enzephalitis nicht geklärt werden. Tollwut, Staupe, Aujeszky'sche Krankheit, Toxoplasmose, Parvovirose, sowie Infektionen mit Flaviviren und caninen Adenoviren konnten ausgeschlossen werden.

Abschließend kann *C. leucodon* als Reservoirwirt für BoDV-1 in Bayern bestätigt werden. Es kann von einer BoDV-1-Übertragung von infizierten *C. leucodon* auf das Pferd ausgegangen werden. Die BoDV-1-Infektion der Kleinsäugetiere kann sich in unterschiedlichen Infektionsverläufen manifestieren. Füchse und Dachse stellen aufgrund bisher vorliegender Daten kein Reservoir für Bornaviren in Deutschland dar.

8 Summary

The etiological agent of Borna disease (BD) is the Borna disease virus (BoDV-1) within the order *Mononegavirales*. BD is a fatal disease and can induce a meningoencephalitis in the main natural hosts horses and sheep. Epidemiologic studies have indicated natural virus reservoirs in endemic regions for BD for a long time. The first evidence of BoDV-1-infection in the bicoloured white-toothed shrew (*C. leucodon*) was found in 2006 in Switzerland. The aim of the present study was to characterise BoDV-1 reservoirs in endemic regions in Bavaria. The role of *C. leucodon* in natural BoDV-1 infection and the different courses of BoDV-1-infection in small mammals were of particular interest. An additional objective was to provide reliable evidence for a shrew to horse transmission. The aim of the second part of the study was to investigate whether red foxes (*Vulpes vulpes*), badgers (*Meles meles*) and other small carnivores can be affected by BoDV-1 and act as a reservoir after they have been in contact with BoDV-1-shedding *C. leucodon*.

In a first study, we investigated samples from 337 small mammals, including 87 Soricidae, 122 Muridae and 128 Cricetidae from pest control of a total of 16 horse farms respectively from private persons in Bavaria, Baden-Württemberg and Hesse. Eleven farms in Bavaria had a history of equine borna disease. The evaluation of farm data showed amongst other factors that the surroundings of the farms correlated with the habitat conditions of *C. leucodon* and almost all farms presented open access to stables and feeding chambers for small mammals. Antibody detection was performed by indirect immunofluorescence test (IIFT) and BoDV-1-RNA-detection by RT-qPCR and nested-RT-PCR. BoDV-1 positive small mammals and control animals were additionally analysed by immunohistochemistry (IHC) and *in situ* hybridization (ISH) for the detection of BoDV-1 antigen, genomic and messenger BoDV-1 RNA. Viral RNA was sequenced.

A total of five out of 30 *C. leucodon* were positive for BoDV-1-antigen and -RNA in the central and peripheral nervous system and in peripheral organs and tissues. However, only three *C. leucodon* displayed anti-BoDV-1-antibodies with titers up to 1:20480. One *C. leucodon* displayed no antibodies and no serum sample was available for another *C. leucodon*. Two out of 30 *C. leucodon* displayed only anti-BoDV-1 antibodies. The positive shrews originated from two horse farms in the Günzburg administrative district in Swabia.

A BoDV-1 shrew sequence revealed 100% homology to an amplicate from a diseased horse of the same flock and 98% homology to field strains from the virus cluster of Baden-Württemberg and Bavaria II (covering 2150 nucleotides). Furthermore, six Soricidae, four Muridae and one Cricetidae displayed anti-BoDV-1-antibodies with titers up to 1:320.

In the second part of the study, samples of 232 red foxes, eleven badgers, one weasel (*Mustela nivalis*) and one polecat (*Mustela putorius*) from Bavaria, Baden-Württemberg and Hesse were analysed for anti-BoDV-1-antibodies, BoDV-1-RNA and BoDV-1-antigen (where applicable) by IIFT, RT-qPCR, nested-RT-PCR and IHC. A specially designed pan-Borna-RT-PCR detecting the zoonotic VSBV-1 and a metagenomic analysis for three representative brain samples were additionally applied. 38 out of 238 small carnivores (37 foxes and one badger) displayed anti-BoDV-1-antibodies. Titers reached from 1:40 to 1:2560. The specificity of the antibodies was confirmed by western blot. There was no statistically significant difference between the occurrences of seropositive small carnivores in endemic and non-endemic regions. 16 red foxes showed a non-suppurative (meningo-) encephalitis by histological examination. Neither BoDV-1-antigen nor -RNA could be detected in the brain samples. Canine distemper virus was found in the brains of six foxes, but for ten out of 16 foxes with encephalitis the cause remained unclear. Foxes with non-suppurative encephalitis were investigated for the presence of rabies, canine distemper, toxoplasmosis, aujeszky's disease, parvovirus, flavivirus and canine adenovirus infections.

To conclude, *C. leucodon* act as a reservoir for BoDV-1 in Bavaria. The transmission from BoDV-1-infected *C. leucodon* to horses is highly likely. There exist different courses of BoDV-1-infection in small mammals. Regarding the present data there are no indices that small carnivores act as a reservoir for BoDV-1 in Germany.

9 Literaturverzeichnis

AFONSO CL, AMARASINGHE GK, BÁNYAI K, BÀO Y, BASLER CF, BAVARI S, BEJERMAN N, BLASDELL KR, BRIAND F-X, BRIESE T, BUKREYEV A, CALISHER CH, CHANDRAN K, CHÉNG J, CLAWSON AN, COLLINS PL, DIETZGEN RG, DOLNIK O, DOMIER LL, DÜRRWALD R, DYE JM, EASTON AJ, EBIHARA H, FARKAS SL, FREITAS-ASTÚA J, FORMENTY P, FOUCHIER RAM, FÙ Y, GHEDIN E, GOODIN MM, HEWSON R, HORIE M, HYNDMAN TH, JIĀNG D, KITAJIMA EW, KOBINGER GP, KONDO H, KURATH G, LAMB RA, LENARDON S, LEROY EM, LI C-X, LIN X-D, LIÚ L, LONGDON B, MARTON S, MAISNER A, MÜHLBERGER E, NETESOV SV, NOWOTNY N, PATTERSON JL, PAYNE SL, PAWESKA JT, RANDALL RE, RIMA BK, ROTA P, RUBENSTROTH D, SCHWEMMLE M, SHI M, SMITHER SJ, STENGLEIN MD, STONE DM, TAKADA A, TERREGINO C, TESH RB, TIAN J-H, TOMONAGA K, TORDO N, TOWNER JS, VASILAKIS N, VERBEEK M, VOLCHKOV VE, WAHL-JENSEN V, WALSH JA, WALKER PJ, WANG D, WANG L-F, WETZEL T, WHITFIELD AE, XIÈ J, YUEN KY, ZHANG Y-Z, KUHN JH. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2016. Arch Virol. 2016;161:2351–60.

ÅKERSTEDT J, LILLEHAUG A, LARSEN IL, EIDE NE, ARNEMO JM, HANDELAND K. Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in Scandinavia and Svalbard. J Wildlife Dis. 2010;46(2):474–80.

- AMARASINGHE GK, BÀO Y, BASLER CF, BAVARI S, BEER M, BEJERMAN N, BLASDELL KR, BOCHNOWSKI A, BRIESE T, BUKREYEV A, CALISHER CH, CHANDRAN K, COLLINS PL, DIETZGEN RG, DOLNIK O, DÜRRWALD R, DYE JM, EASTON AJ, EBIHARA H, FANG Q, FORMENTY P, FOUCHIER RAM, GHEDIN E, HARDING RM, HEWSON R, HIGGINS CM, HONG J, HORIE M, JAMES AP, JIANG D, KOBINGER GP, KONDO H, KURATH G, LAMB RA, LEE B, LEROY EM, LI M, MAISNER A, MÜHLBERGER E, NETESOV SV, NOWOTNY N, PATTERSON JL, PAYNE SL, PAWESKA JT, PEARSON MN, RANDALL RE, REVILL PA, RIMA BK, ROTA P, RUBBENSTROTH D, SCHWEMMLE M, SMITHER SJ, SONG Q, STONE DM, TAKADA A, TERREGINO C, TESH RB, TOMONAGA K, TORDO N, TOWNER JS, VASILAKS N, VOLCHKOV VE, WAHL-JENSEN V, WALKER PJ, WANG B, WANG D, WANG F, WANG L-F, WERREN JH, WHITFIELD AE, YAN Z, YE G, KUHN JH. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2017. *Arch Virol*. doi: 10.1007/s00705-017-3311-7
- AMUDE AM, ALFIERI AF, ALFIERI AA. The role of viruses in encephalitides of unknown origin in dogs. In: MÉNDEZ-VILAS A, ed. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. 2nd ed. Badajoz: Formatex Research Center; 2010:714–22.
- AMUNDSON TE, YUILL TM. Natural La Crosse virus infection in the red fox (*Vulpes fulva*), gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*), raccoon (*Procyon lotor*), and opossum (*Didelphis virginiana*). *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30(3):706–14.
- ASHFORD RW. When is a reservoir not a reservoir? [letter]. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(11):1495–6.
- BEINEKE A, BAUMGÄRTNER W, WOHLSEIN P. Cross-species transmission of canine distemper virus – an update. *One Health*. 2015;1:49–59.
- BELYI VA, LEVINE AJ, SKALKA AN. Unexpected Inheritance: Multiple integrations of ancient Bornavirus and Ebolavirus/Marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1001030. doi: 10.1371/journal.ppat.1001030
- BERG AL, GAVIER-WIDÉN D, NILSSON K, WIDÉN F, BERG M, GREGORIUS S, AGREN E, ERLANDSSON M, MÖRNER T. Necrotizing encephalitis of unknown cause in Fennoscandian arctic foxes (*Alopex lagopus*). *J Vet Diagn Invest*. 2007;19(1):113–7.

- BEXTON S, WIERSMA LC, GETU S, VAN RUN PR, VERJANS GMGM, SHIPPER D, SCHAPENDONK CME, BODEWES R, OLDROYD L, HAAGMANS BL, KOOPMANS MMP, SMITS SL. Detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009–2013. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(7):1205–8.
- BILLICH C, SAUDER C, FRANK R, HERZOG S, BECHTER K, TAKAHASHI K, PETERS H, STAEHELI P, SCHWEMMLE M. High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biol Psychiat.* 2002;51(12):979–87.
- BJÖRNSDÓTTIR S, AGUSTSDÓTTIR E, BLOMSTRÖM AL, ÖRDE ÖSTRÖM IL, TREIBERG BERNDTSSON L, SVANSSON V, WENSMAN JJ. Serological markers of Bornavirus infection found in horses in Iceland. *Acta Vet Scand.* 2013;55:77. doi: 10.1186/1751-0147-55-77
- BLACKWOOD JC, STREICKER DG, ALTIZER S, ROHANI P. Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *PNAS.* 2013;110(51):20837–42. doi: 10.1073/pnas.1388171110
- BLATT C, RESCH S. Feldspitzmaus – *Crocidura leucodon*. *Kleinsaeuger.at*. <http://kleinsaeuger.at/crocidura-leucodon.html>
Letzte Änderung: Juni, 2017. Letzter Zugriff: Juni, 2017.
- BLOMSTRÖM AL, WIDÉN F, HAMMER AS, BELÁK S, BERG M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4392–6.
- BODE L, RECKWALD P, SEVERUS WE, STOYLOFF R, FERSZT R, DIETRICH DE, LUDWIG H. Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies – the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol Psychiatry.* 2001;6(4):481–91.
- BOURG M, HERZOG S, ENCARNAÇÃO JA, NOBACH D, LANGE-HERBST H, EICKMANN M, HERDEN C. Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany [letter]. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(12):2064–6.

- BOURG M, NOBACH D, HERZOG S, LANGE-HERBST H, NESSELER A, HAMANN HP, BECKER S, HÖPER D, HOFFMANN B, EICKMANN M, HERDEN C. Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis. *Virology*. 2016;13:151. doi: 10.1186/s12985-016-0608-1
- BRIESE T, DE LA TORRE JC, LEWIS A, LUDWIG H, LIPKIN WI. Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells: (central nervous system infection/behavioural disorders). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(23):11486–9.
- BRIESE T, SCHNEEMANN A, LEWIS AJ, PARK YS, KIM S, LUDWIG H, LIPKIN WI. Genomic organization of Borna disease virus: (central nervous system infection/behavioural disorders/negative-strand RNA viruses). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(10):4362–6.
- CALLANAN JJ, MOONEY CT, MULCAHY G, FATZER R, VANDEVELDE M, EHRENSPERGER F, MCELROY M, TOOLAN D, RALEIGH P. A novel nonsuppurative meningoencephalitis in young greyhounds in Ireland. *Vet Pathol*. 2002;39(1):56–65.
- CAPLAZI P, EHRENSPERGER F. Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998;61(2–4):203–20.
- CAPLAZI P, WALDVOGEL A, STITZ L, BRAUN U, EHRENSPERGER F. Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol*. 1994;111(1):65–72.
- CARBONE KM, DUCHALA CS, GRIFFIN JW, KINCAID AL, NARAYAN O. Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol*. 1987;61(11):3431–40.
- CARBONE KM, MOENCH TR, LIPKIN WI. Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1991;50(3):205–14.

- CHURCHFIELD S. The natural history of shrews. Ithaca, NY: Comstock publishing associates; 1990.
- CLEAVELAND S, LAURENSEN MK, TAYLOR LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos T Roy Soc B*. 2001;356(1411):991–9.
- CONTESSE P, HEGGLIN D, GLOOR S, BONTADINA F, DEPLAZES P. The diet of urban foxes (*Vulpes vulpes*) and the availability of anthropogenic food in the city of Zurich, Switzerland: original investigation. *Mamm Biol*. 2004;69(2):81–95.
- CUBITT B, DE LA TORRE JC. Borna Disease Virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol*. 1994; 68(3):1371–81.
- DACHEUX L, CERVANTES-GONZALEZ M, GUIGON G, THIBERGE JM, VANDENBOGAERT M, MAUFRAIS C, CARO V, BOURHY H. A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One*. 2014;9(1):e87194. doi: 10.1371/journal.pone.0087194
- DANNER K, MAYR A. In vitro studies on Borna virus: II. Properties of the virus. *Arch Virol*. 1979;61(4):261–71.
- DASZAK P, CUNNINGHAM AA, HYATT AD. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000;287(5452):443–9.
- DAUPHIN G, LEGAY V, SAILLEAU C, SMONDACK S, HAMMOUMI S, ZIENTARA S. Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes (*Vulpes vulpes*). *J Gen Virol*. 2001;82(Pt 9):2199–204.
- DE BOSSCHERE H, ROELS S, VANOPDENBOSCH E, BODE L, LUDWIG H. Staggering disease in a cat: the first case of Borna disease virus infection in a Belgian cat. *Int J Appl Res Vet M*. 2004;2(3):189–94.

- DE CRAEYE S, SPEYBROECK N, AJZENBERG D, DARDÉ ML, COLLINET F, TAVERNIER P, VAN GUCHT S, DORNY P, DIERICK K. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Vet Parasitol.* 2011;178(1–2):64–9.
- DE LA TORRE JC. Molecular Biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol.* 1994;68(12):7669–75.
- DEGIORGIS MP, BERG AL, HÅRD AF SEGERSTAD C, MÖRNER T, JOHANSSON M, BERG M. Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *J Clin Microbiol.* 2000;38(8):3087–91.
- DENZIN N, HERWIG W, VAN DER GRINTEN E. Occurrence and geographical distribution of canine distemper virus infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) of Saxony-Anhalt, Germany. *Vet Microbiol.* 2013;162(1):214–8.
- DESCHL U, STITZ L, HERZOG S, FRESE K, ROTT R. Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol.* 1990;81(1):41–50.
- DIETERLEN, F. Ordnung Raubtiere (Raubsäuger, Beutegreifer) (Carnivora). In: BRAUN M, DIETERLEN F, Hrsg. Die Säugetiere Baden-Württembergs: Band 2, Insektenfresser (Insectivora), Hasentiere (Lagomorpha), Nagetiere (Rodentia), Raubtiere (Carnivora), Paarhufer (Artiodactyla). Stuttgart: Ulmer; 2005:356–517.
- DREXLER JF, CORMAN VM, MÜLLER MA, MAGANGA GD, VALLO P, BINGER T, GLOZA-RAUSCH F, COTTONTAIL VM, RASCHE A, YORDANOV S, SEEBENS A, KNÖRNSCHILD M, OPPONG S, SARKODIE YA, PONGOMBO C, LUKASHEV AN, SCHMIDT-CHANASIT J, STÖCKER A, BORGES CARNEIRO AJ, ERBAR S, MAISNER A, FRONHOFFS F, BUETTNER R, KALKO EKV, KRUPPA T, FRANKE CR, KALLIES R, YANDOKO ERN, HERRLER G, REUSKEN C, HASSANIN A, KRÜGER DH, MATTHEE S, ULRICH RG, LEROY EM, DROSTEN C. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun.* 2012(published),2014(updated);3:796. doi: 10.1038/ncomms1796

- DÜRRWALD R, KOLODZIEJEK J, HERZOG S, NOWOTNY N. Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Rev Med Virol.* 2007;17(3):181–203.
- DÜRRWALD R, KOLODZIEJEK J, MULUNEH A, HERZOG S, NOWOTNY N. 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 Infect.* 2006;8(3):917–29.
- DÜRRWALD R, KOLODZIEJEK J, WEISSENBOCK H, NOWOTNY N. The bicolored white-toothed shrew *Crocidura leucodon* (Hermann 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS One.* 2014;9(4):e93659. doi: 10.1371/journal.pone.0093659
- DÜRRWALD R, LUDWIG H. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen: a review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *J Vet Med B.* 1997;44(3):147–84.
- DUSCHER G, PLEYDELL D, PROSL H, JOACHIM A. *Echinococcus multilocularis* in Austrian foxes from 1991 until 2004. *J Vet Med B.* 2006;53(3):138–44.
- EASTERBROOK JD, KLEIN SL. Immunological mechanisms mediating hantavirus persistence in rodent reservoirs. *PLoS Pathog.* 2008;4(11):e1000172. doi: 10.1371/journal.ppat.1000172
- ENCARNAÇÃO JA, BECKER NI, HERZOG S, HERDEN C, EICKMANN M. ENCARNAÇÃO JA, BECKER NI, HERZOG S, HERDEN C., EICKMANN M. Habitatmodelle in der Virusökologie am Beispiel von *Crocidura leucodon* als Reservoirwirt für das Bornavirus. *Beitr. zur Jagd- u. Wildforsch.* 2015;40:289–96.
- ENCARNAÇÃO JA, HERZOG S, EICKMANN M, BECKER NI, HERMES N, HERDEN C. Landscape features and reservoir occurrence affecting the risk for equine infection with Borna disease virus. *J Wildlife Dis.* 2013;49(4):860–8.
- FINNEGAN CJ, BROOKES SM, JOHNSON N, SMITH J, MANSFIELD KL, KEENE VL, MCELHINNEY LM, FOOKS AR. Rabies in North America and Europe. *J Roy Soc Med.* 2002;95(1):9–13.

- FLUESS M. Ein Beitrag zur Epidemiologie der Bornaschen Krankheit [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2012.
- FRÖLICH K, CZUPALLA O, HAAS L, HENTSCHKE J, DEDEK J, FICKEL J. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet Microbiol.* 2000;74(4):283–92.
- FUJINO K, HORIE M, HONDA T, MERRIMAN DK, TOMONAGA K. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(36):13175–80.
- GEOGHEGAN JL, DUCHÊNE S, HOLMES EC. Comparative analysis estimates the relative frequencies of co-divergence and cross-species transmission within viral families. *PLoS Pathog.* 2017;13(2):e1006215. doi: 10.1371/journal.ppat.1006215
- GILBERT AT, FOOKS AR, HAYMAN DTS, HORTON DL, MÜLLER T, PLOWRIGHT R, PEEL AJ, BOWEN R, WOOD JLN, MILLS J, CUNNINGHAM AA, RUPPRECHT CE. Deciphering serology to understand the ecology of infectious diseases in wildlife. *Ecohealth.* 2013;10(3):298–313.
- GÓMEZ M, MIERES M, MORONI M, MORA A, BARRIOS N, SIMEONE C, LINDSAY DS. Meningomyelitis due to nematode infection in four cats. *Vet Parasitol.* 2010;170(3-4):327–30.
- GRABNER A, HERZOG S, LANGE-HERBST H, FRESE K. Die Intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden. *Pferdeheilkunde.* 2002;18(6):579–86.
- GREEN RG, ZIEGLER NR, GREEN BB, DEWEY ET. Epizootic fox encephalitis: I. General description. *Am J Epidemiol.* 1930;12(1):109–29.
- HAGIWARA K, MATOBA Y, ASAKAWA M. Borna disease virus in raccons (*Procyon lotor*) in Japan. *J Vet Med Sci.* 2009;71(8):1009–15.

- HALLENSLEBEN W, SCHWEMMLE M, HAUSMANN J, STITZ L, VOLK B, PAGENSTECHER A, STAEHELI P. Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol.* 1998;72(5):4379–86.
- HAYDON DT, CLEAVELAND S, TAYLOR LH, LAURENSEN MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(12):1468–73.
- HEINIG A. Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: RÖHRER H, Hrsg. *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren: Band 4, Spezieller Teil 3.* Jena: VEB Gustav Fischer Verlag; 1969:83–148.
- HERDEN C, BRIESE T, LIPKIN IW, RICHT JA. *Bornaviridae.* In: KNIPE DM, HOWLEY PM, ed. *Fields virology.* 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013:1124–50.
- HERDEN C, HERZOG S, RICHT JA, NESSELER A, CHRIST M, FAILING K, FRESE K. Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol.* 2000;10(1):39–48.
- HERDEN C, HERZOG S, WEHNER T, ZINK C, RICHT JA, FRESE K. Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. In WERNERY U, WADE J, MUMFORD JA, KAADEN OR, ed. *Equine Infectious Diseases VIII Newmarket: R&W Publications;* 1999: 286–90.
- HERDEN C, RICHT JA. Equine Borna disease. *Equine Vet Educ.* 2009;8:113–27.
- HERZOG S, ENDERLEIN D, HEFFELS-REDMANN U, PIEPENBRING A, NEUMANN D, KALETA EF, MÜLLER H, LIERZ M, HERDEN C. Indirect immunofluorescence assay for *intra vitam* diagnosis of avian bornavirus infection in psittacine birds. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2282–4.
- HERZOG S, FRESE K, RICHT JA, ROTT R. Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. *Wien Tierärztl Monat.* 1994;81:374–9.
- HERZOG S, FRESE K, ROTT R. Studies on genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J Gen Virol.* 1991;72:535–40.

- HERZOG S, HERDEN C, FRESE K, LANGE-HERBST H, GRABNER A. Diagnostik der BDV-Infektion beim Pferd: Widersprüche zwischen intra-vitam- und post-mortem-Untersuchungen. *Pferdeheilkunde*. 2008;24(6):766–74.
- HERZOG S, KOMPTER C, FRESE K, ROTT R. Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immun*. 1984;173(4):171–7.
- HERZOG S, ROTT R. Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immun*. 1980;168(3):153–8.
- HILBE M, HERRSCHE R, KOLODZIEJEK J, NOWOTNY N, ZLINSZKY K, EHRENSPERGER F. Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(4):675–7.
- HIRANO N, KAO M, LUDWIG H. Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol*. 1983;64(Pt 7):1521–30.
- HOFF EJ, VANDEVELDE M. Non-suppurative encephalomyelitis in cats suggestive of viral origin. *Vet Pathol*. 1981;18(2):170–80.
- HOFFMANN B, TAPPE D, HÖPER D, HERDEN C, BOLDT A, MAWRIN C, NIEDERSTRAßER O, MÜLLER T, JENCKEL M, VAN DER GRINTEN E, LUTTER C, ABENDROTH B, TEIFKE JP, CADAR D, SCHMIDT-CHANASIT J, ULRICH RG, BEER M. A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *New Engl J Med*. 2015;373(2):154–62.
- HOFFMANN B, TAPPE D, HÖPER D, HERDEN C, BOLDT A, MAWRIN C, NIEDERSTRAßER O, MÜLLER T, JENCKEL M, VAN DER GRINTEN E, LUTTER C, ABENDROTH B, TEIFKE JP, CADAR D, SCHMIDT-CHANASIT J, ULRICH RG, BEER M. A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis: supplementary appendix. *New Engl J Med*. 2015;373:154–62. http://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa1415627/suppl_file/nejmoa1415627_appendix.pdf. Accessed June, 2017.
- HONDA T, TOMONAGA K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity. *Mob Genet Elements*. 2016;6(3):e1165785. doi: 10.1080/2159256X.2016.1165785

- HONKAVUORI KS, SHIVAPRASAD HL, WILLIAMS BL, QUAN PL, HORNIG M, STREET C, PALACIOS G, HUTCHISON SK, FRANCA M, EGHOLM M, BRIESE T, LIPKIN WI. Novel Borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(12):1883–6.
- HORIE M, HONDA T, SUZUKI Y, KOBAYASHI Y, DAITO T, OSHIDA T, IKUTA K, JERN P, GOJOBORI T, COFFIN JM, TOMONAGA K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature.* 2010;463:84–8.
- HORIE M, KOBAYASHI Y, SUZUKI Y, TOMONAGA K. Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos T Roy Soc B.* 2013;368(1626):20120499.
- HORNIG M, WEISSENBÖCK H, HORSCROFT N, LIPKIN WI. An infection-based model of neurodevelopmental damage. *P Natl Acad Sci USA.* 1999;96(21):12102–7.
- JACOBSEN B, ALGERMISSEN D, SCHAUDIEN D, VENNER M, HERZOG S, WENTZ E, HEWICKER-TRAUTWEIN M, BAUMGÄRTNER W, HERDEN C. Borna disease in an adult Alpace stallion (*Lama pacos*). *J Comp Pathol.* 2010;143(2–3):203–8.
- JENRICH J, LÖHR PW, MÜLLER F. Kleinsäuger: Körper- und Schädelmerkmale, Ökologie. Petersberg: Imhof; 2010:22–75.
- JOEST E, DEGEN K. Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn- Rückenmarksentzündung der Pferde. *Z Infekt Haustiere.* 1909;6:348–56.
- JOEST E, DEGEN K. Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirn- Rückenmarksentzündung (Bornaschen Krankheit) des Pferdes. *Z Infekt Haustiere.* 1911;9:1–98.
- JONES KE, PATEL NG, LEVY MA, STOREYGARD A, BALK D, GITTLEMAN JL, DASZAK P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008;451:990–4.

- KAO M, HAMIR AN, RUPPRECHT CE, FU ZF, SHANKAR V, KOPROWSKI H, DIE-TZSCHOLD B. Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *Vet Rec.* 1993;132(10):241–4.
- KATZ JB, ALSTAD D, JENNY AL, CARBONE KM, RUBIN SA, WALTRIP RW II. Clinical, serologic and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest.* 1998;10(4):338–43.
- KAUHALA K, LAUKKANEN P, VON RÉGE I. Summer food composition and food niche overlap of the raccoon dog, red fox and badger in Finland. *Ecography.* 1998;21(5):457–63.
- KIDAWA D, KOWALCZYK R. The effects of sex, age, season and habitat on diet of the red fox *Vulpes vulpes* in northeastern Poland. *Acta Theriol.* 2011;56(3):209–18.
- KIERMAYER S, KRAUS I, RICHT JA, GARTEN W, EICKMANN M. Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. *FEBS Lett.* 2002;531(2):255–8.
- KINNUNEN PM, BILLICH C, EK-KOMMONEN C, HENTTONEN H, KALLIO ERK, NIEMIMAA J, PALVA A, STAEHELI P, VAHERI A, VAPALAHTI O. Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *J Clin Virol.* 2007;38:64–9.
- KINNUNEN PM, INKEROINEN H, ILANDER M, KALLIO ER, HEIKKILÄ HP, KOSKELA E, MAPPES T, PALVA A, VAHERI A, KIPAR A, VAPALAHTI O. Intracerebral Borna disease virus infection of bank voles leading to peripheral spread and reverse transcription of viral RNA. *PLoS One.* 2011;6(8):e23622. doi: 10.1371/journal.pone.0023622
- KIPAR A, BAUMGÄRTNER W, VOGL C, GAEDKE K, WELLMAN M. Immunohistochemical characterization of inflammatory cells in brains of dogs with granulomatous meningoencephalitis. *Vet Pathol.* 1998;35(1):43–52.

- KISTLER AL, GANCZ A, CLUBB S, SKEWES-COX P, FISCHER K, SORBER K, CHIU CY, LUBLIN A, MECHANI S, FARNOUSHI Y, GRENINGER A, WEN CC, KARLENE SB, GANEM D, DERISI JL. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology*. 2008;5:88. doi: 10.1186/1743-422X-5-88
- KLOPFLEISCH R, WOLF PU, WOLF C, HARDER T, STARICK E, NIEBUHR M, METTENLEITER TC, TEIFKE JP. Encephalitis in a stone marten (*Martes foina*) after natural infection with highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *J Comp Pathol*. 2007;137(2-3):155-9.
- KOHNO T, GOTO T, TAKASAKI T, MORITA C, NAKAYA T, IKUTA K, KURANE I, SANO K, NAKAI M. Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol*. 1999;73(1):760-6.
- KOŁODZIEJEK J, DÜRRWALD R, HERZOG S, EHRENSPERGER F, LUSSY H, NOWOTNY N. Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 2):385-98.
- KRAFT R, Hrsg. Mäuse und Spitzmäuse in Bayern: Verbreitung, Lebensraum, Bestandssituation. Stuttgart: Eugen Ulmer; 2008.
- KRAMER K, SCHAUDIEN D, EISEL ULM, HERZOG S, RICHT JA, BAUMGÄRTNER W, HERDEN C. TNF-Overexpression in Borna disease virus-infected mouse brains triggers inflammatory reaction and epileptic seizures. *PLoS One*. 2012;7(7):e41476. doi: 10.1371/journal.pone.0041476
- KUHN JH, DÜRRWALD R, BÀO Y, BRIESE T, CARBONE K, CLAWSON AN, DERISI JL, GARTEN W, JAHRLING PB, KOŁODZIEJEK J, RUBBENSTROTH D, SCHWEMMLE M, STENGLEIN M, TOMONAGA K, WEISSENBOCK H, NOWOTNY N. Taxonomic reorganization of the family *Bornaviridae*. *Arch Virol*. 2014;160(2):621-32.
- KUPKE A. Die Rolle des olfaktorischen Epithels in der initialen Phase der Infektion mit dem neurotrophen Borna disease virus [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2016.

- LANSZKI, J, HELTAI M. Feeding habits of golden jackal and red fox in south-western Hungary during winter and spring. *Mamm Biol.* 2002;67(3):129–36.
- LEMP C, JUNGWIRTH N, GRILO ML, RECKENDORF A, ULRICH A, VAN NEER A, BODEWES R, PFANKUCHE VM, BAUER C, OSTERHAUS ADME, BAUMGÄRTNER W, SIEBERT U. Pathological findings in the red fox (*Vulpes vulpes*), stone marten (*Martes foina*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*), with special emphasis on infectious and zoonotic agents in Northern Germany. *PLoS One.* 2017;12(4): e0175469. doi: 10.1371/journal.pone.0175469
- LICHTENSTEIGER CA, HEINZ-TAHENY K, OSBORNE TS, NOVAK RJ, LEWIS BA, FIRTH ML. West Nile virus encephalitis and myocarditis in wolf and dog. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(10):1303–6.
- LIPKIN WI, BRIESE T, HORNIG M. Borna disease virus – fact and fantasy. *Virus Res.* 2011;162(1–2):162–72.
- LOVE S, LOUIS DN, ELLISON DW, ed. *Greenfield's Neuropathology: Vol. 1.* 8th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008.
- LUDLOW M, KORTEKAAS J, HERDEN C, HOFFMANN B, TAPPE D, TREBST C, GRIFFIN DE, BRINDLE HE, SOLOMON T, BROWN AS, VAN RIEL D, WOLTERS KC, PAJKRT D, WOHLSEIN P, MARTINA BEE, BAUMGÄRTNER W, VERJANS GM, OSTERHAUS ADME. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2016;131(2):159–84.
- LUNDGREN AL, ZIMMERMANN W, BODE L, CZECH G, GOSZTONYI G, LINDBERG R, LUDWIG H. Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J Gen Virol.* 1995;76(Pt 9):2215–22.
- LUTZ H, ADDIE DD, BOUCRAUT-BARALON C, EGBERINK H, FRYMUS T, GRUFFYDD-JONES T, HARTMANN K, HORZINEK MC, HOSIE MJ, LLORET A, MARSILIO F, PENNISI MG, RADFORD AD, THIRY E, TRUYEN U, MÖSTL K. Borna disease virus infections in cats. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2015;17(7):614–6.

- MACDONALD DW. Unter Füchsen: eine Verhaltensstudie. München: Knesebeck; 1993.
- MACKENZIE JS, CHILDS JE, FIELD HE, WANG LF, BREED AC. The role of bats as reservoir hosts of emerging neurological viruses. In: REISS C, ed. Neurotropic viral infections. Cambridge: Cambridge University Press; 2008:382–406.
- MACLACHLAN NJ, DUBOVI EJ, ed. Fenners Veterinary Virology. 5th ed. London: Academic Press; 2017.
- MALIK R, DILL-MACKY E, MARTIN P, WIGNEY DI, MUIR DB, LOVE DN. Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases. *J Med Vet Mycol*. 1995;33(5):291–7.
- MAXIE MG, SAMEH Y. Inflammation in the central nervous system. In: MAXIE MG, JUBB KVF, ed. Pathology of domestic animals: volume 1. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2007: 393–401.
- METZLER A, EHRENSPERGER F, WYLER R. Natürliche Bornavirus-Infektion bei Kaninchen. *Zbl Vet Med B*. 1978;25(2):161–4.
- MORALES JA, HERZOG S, KOMPTER C, FRESE C, ROTT R. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immun*. 1988;177(2):51–68.
- MORE S, BØTNER A, BUTTERWORTH A, CALISTRI P, DEPNER K, EDWARDS S, GARIN-BASTUJI B, GOOD M, GORTAZAR SCHMIDT C, MICHEL V, MIRANDA MA, NIELSEN SS, RAJ M, SIHVONEN L, SPOOLDER H, STEGEMAN JA, THULKE HH, VELARDE A, WILLEBERG P, WINCKLER C, BALDINELLI F, BROGLIA A, DHOLLANDER S, BELTRÁN-BECK B, KOHNLE L, BICOUT D. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) 2017. Scientific Opinion on the assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): Borna disease. *EFSA Journal* 2017;15(7):4951. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4951

- NAGEL A, NAGEL R. Feldspitzmaus *Crocidura leucodon* (Hermann, 1780). In: BRAUN M, DIETERLEN F, Hrsg. Die Säugetiere Baden-Württembergs: Band 2, Insektenfresser (Insectivora), Hasentiere (Lagomorpha), Nagetiere (Rodentia), Raubtiere (Carnivora), Paarhufer (Artiodactyla). Stuttgart: Ulmer; 2005:9–7.
- NARAYAN O, HERZOG S, FRESE K, SCHEEFERS H, ROTT R. Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophtalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis.* 1983;148(2):305–15.
- NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ENCARNAÇÃO JA, EICKMANN M, HERDEN C. Shedding of infectious Borna disease virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. *PLoS One.* 2015;10(8):e0137018. doi: 10.1371/journal.pone.0137018
- NOWOTNY N, KOLODZIEJEK J, JEHLE CO, SUCHY A, STAEHELI P, SCHWEMMLE M. Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol.* 2000;74(12):5655–8.
- NOWOTNY N, WEISSENBOCK H. Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis (“staggering disease”) and studies of its etiology. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1668–9.
- OKAMOTO M, KAGAWA Y, KAMITANI W, HAGIWARA K, KIRISAWA R, IWAI H, IKUTA K, TANIYAMA H. Borna disease in a dog in Japan. *J Comp Pathol.* 2002;126(4):312–7.
- ORIGGI FC, PLATTET P, SATTLER U, ROBERT N, CASAUBON J, MAVROT F, PEWSNER M, WU N, GIOVANNINI S, OEVERMANN A, STOFFEL MH, GASCHEN V, SEGNER H, RYSER-DEGIORGIS MP. Emergence of canine distemper virus strains with modified molecular signature and enhanced neuronal tropism leading to high mortality in wild carnivores. *Vet Pathol.* 2012;49(6):913–29.
- PADIAL JM, ÁVILA E, GIL-SÁNCHEZ JM. Feeding habits and overlap among red fox (*Vulpes vulpes*) and stone marten (*Martes foina*) in two Mediterranean mountain habitats. *Mamm Biol.* 2002;67:137–46.

- PARK ES, UCHIDA K, NAKAYAMA H. Comprehensive immunohistochemical studies on canine necrotizing meningoencephalitis (NME), necrotizing leukoencephalitis (NLE), and granulomatous meningoencephalomyelitis (GME). *Vet Pathol.* 2012;49(4):682–92.
- POENISCH M, BURGER N, STAEHELI P, BAUER G, SCHNEIDER U. Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *J Virol.* 2009;83(9):4297–307.
- PRIESTNALL SL, SCHÖNINGER S, IVENS PAS, EICKMANN M, BRACHTHÄUSER L, KEHR K, TUPPER C, PIERCY RJ, MENZIES-GOW NJ, HERDEN C. Borna disease virus of a horse in Great Britain. *Vet Rec.* 2011;168(14),380b.
- PRÜSS H, LEUBNER J, WENKE NK, CZIRJÁK GÁ, SZENTIKS CA, GREENWOOD AD. Anti-NMDA receptor encephalitis in the polar bear (*Ursus maritimus*) Knut. *Sci Rep.* 2015;5. doi: 10.1038/srep12805
- PUORGER ME, HILBE M, MÜLLER JP, KOLODZIEJEK J, NOWOTNY N, ZLINSZKY K, EHRENSPERGER F. Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol.* 2010;47(2):236–44.
- PYPER JM, CLEMENT JE. Partial purification and characterization of Borna disease virions released from infected neuroblastoma cells. *Virology.* 1994;201(2):380–2.
- RANDALL RE, GRIFFIN DE. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. *Curr Opin Virol.* 2017;23:35–42.
- REICHEL U. Epizootiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit bei Pferden in Bayern und Darstellung des monoklonalen Antikörpers 38/15H7 [Dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2009.

- REPERANT LA, VAN AMERONGEN G, VAN DE BILDT MWG, RIMMELZWAAN GF, DOBSON AP, OSTERHAUS ADME, KUIKEN T. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in red foxes fed infected bird carcasses. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(12):1835–41.
- RICHT JA, CLEMENTS JE, HERZOG S, PYPER J, WAHN K, BECHT H. Analysis of virus-specific RNA species and proteins in freon-113 preparations of the Borna disease virus. *Med Microbiol Immun.* 1993;182(5):271–80.
- RICHT JA, GRABNER A, HERZOG S, GARTEN W, HERDEN C. Borna disease. In: SELTON DC, LONG MT, ed. *Equine infectious diseases*. St. Louis, MO: Saunders/Elsevier; 2007:271–313.
- RICHT JA, GRABNER A, HERZOG S. Borna disease in horses. *Vet Clin N Am-Equine.* 2000;16(3):579–95.
- RICHT JA, PFEUFFER I, CHRIST M, FRESE K, BECHTER K, HERZOG S. Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis.* 1997;3(3):343–52.
- RICHT JA, SCHMEEL A, FRESE K, CARBONE KM, NARAYAN O, ROTT R. Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med.* 1994;179:1467–73.
- ROTT R, BECHT H. Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol.* 1995;190:17–30.
- ROTT R, HERZOG S, FLEISCHER B, WINOKUR A, AMSTERDAM J, DYSON W, KOPROWSKI H. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science.* 1985;228(4700):755–6.
- RUBBENSTROTH D, SCHMIDT V, RINDER M, LEGLER M, TWIETMEYER S, SCHWEMMER P, CORMAN VM. Phylogenetic analysis supports horizontal transmission as a driving force of the spread of avian bornaviruses. *PLoS One.* 2016;11(8): e0160936. doi: 10.1371/journal.pone.0160936
- SAUDER C, STAEHELI P. Rat model of Borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol.* 2003;77(23):12886–90.

- SCHAUDIEN D, POLIZOPOULOU Z, KOUTINAS A, SCHWAB S, POROMBKA D, BAUMGÄRTNER W, HERDEN C. Leukoencephalopathy associated with parvovirus infection in Cretan hound puppies. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3169–75.
- SCHINDLER AR, VOGTLIN A, HILBE M, PUORGER M, ZLINSZKY K, ACKERMANN M, EHRENSPERGER F. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes.* 2007;21(1):47–55. doi: 10.1016/j.mcp.2006.08.001
- SCHLEGEL M, TEGSHDUUREN E, YOSHIMATSU K, PETRAITYTE R, SASNAUSKAS K, HAMMERSCHMIDT B, FRIEDRICH R, MERTENS M, GROSCHUP MH, ARAI S, ENDO R, SHIMIZU K, KOMA T, YASUDA S, ISHIHARA C, ULRICH RG, ARIKAWA J, BERND KÖLLNER. Novel serological tools for detection of Thottapalayam virus, a Soricomorpha-borne hantavirus. *Arch Virol.* 2012;157:2179–2187.
- SCHLEGEL M. Host range and spillover infections of rodent- and insectivore-borne hantaviruses [Dissertation]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2012.
- SCHLOTTAU K, JENCKEL M, VAN DEN BRAND J, FAST C, HERDEN C, HÖPER D, HOMEIER-BACHMANN T, THIELEBEIN J, MENSING N, DIENDER B, HOFFMANN D, ULRICH RG, METTENLEITER TC, KOOPMANS M, TAPPE D, SCHMIDT-CHANASIT J, REUSKEN CBEM, BEER M, HOFFMANN B. Variegated squirrel Bornavirus 1 in squirrels, Germany and the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(3):477–81.
- SCHNEIDER PA, BRIESE T, ZIMMERMANN W, LUDWIG H, LIPKIN WI. Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J Virol.* 1994;68(1):63–8.
- SCHROEDER H, VAN RENSBURG IBJ. Generalised *Listeria monocytogenes* infection in a dog. *J S Afr Vet Assoc.* 1993;64(3):133–6.

- SCHÜPPEL KF, KINNE J, REINACHER M. Bornavirus-Antigennachweis bei Alpakas (*Lama pakos*) sowie einem Faultier (*Choloepus didactylus*) und einem Zwergflußpferd (*Choeropsis liberiensis*). In: HOFMANN RR, IPPEN R, Hrsg. Verhandlungsbericht XXXVI: internationales Symposium über Erkrankungen der Zootiere. Berlin: Akademie Verlag; 1994:189–94.
- SCHWAB S, HERDEN C, SEELIGER F, PAPAIOANNOU N, PSALLA D, POLIZOPULOU Z, BAUMGÄRTNER W. Non-suppurative meningoencephalitis of unknown origin in cats and dogs: an immunohistochemical study. *J Comp Pathol.* 2007;136(2–3):96–110.
- SCHWEMMLE M, BILLICH C. The use of peptide arrays for the characterization of monospecific antibody repertoires from polyclonal sera of psychiatric patients suspected of infection by Borna disease virus. *Mol Divers.* 2004;8(3):247–50.
- SCHWEMMLE M, JEHLE C, FORMELLA S, STAEHELI P. Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet.* 1999;354(9194):1973–4.
- SHENBROT G, HUTTERER R, AMORI G, KRYŠTUFEK B, YIGIT N, MITSAIN G, PALOMO LJ. *Crocidura leucodon*. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/details/29651/0>
Assessed September 10, 2016. Published 2016. Accessed June, 2017.
- SHIBUYA M, MATSUKI N, FUJIWARA K, IMAJOH-OHMI S, FUKUDA H, PHAM NT, TAMAHARA S, ONO K. Autoantibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluids from Pug dogs with necrotizing meningoencephalitis. *J Vet Med Sci.* 2007;69(3):241–5.
- SØRENSEN KK, MØRK T, SIGURDARDÓTTIR ÓG, ÅSBAKK K, ÅKERSTEDT J, BERGSJØ B, FUGLEI E. Acute toxoplasmosis in three wild arctic foxes (*Alopex lagopus*) from Svalbard; one with co-infections of *Salmonella* Enteritidis PT1 and *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 2b. *Res Vet Sci.* 2005;78(2):161–7.
- SORG I, METZLER A. Detection of Borna disease virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissues by nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(4): 821–3.

- STAEHELI P, SAUDER C, HAUSMANN J, EHRENSPERGER F, SCHWEMMLE M. Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol.* 2000;81:2123–35.
- STITZ L, BILZER T, PLANZ O. The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci.* 2002;7:d541–55.
- STREICKER DG, LEMEY P, VELASCO-VILLA A, RUPPRECHT CE. Rates of viral evolution are linked to host geography bat rabies. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002720. doi:10.1371/journal.ppat.1002720
- SUMMERS BA, CUMMINGS JF, DE LAHUNTA A. *Veterinary Neuropathology.* St. Louis, MO: Mosby; 1995.
- SZENTIKS CA, TSANGARAS K, ABENDROTH B, SCHEUCH M, STENGLEIN MD, WOHLSEIN P, HEEGER F, HÖVELER R, CHEN W, SUN W, DAMIANI A, NIKOLIN V, GRUBER AD, GROBBEL M, KALTHOFF D, HÖPER D, CZIRJÁJ GÁ, DERISI J, MAZZONI CJ, SCHÜLE A, AUE A, EAST ML, HOFER H, BEER M, OSTERRIEDER N, GREENWOOD AD. Polar bear encephalitis: establishment of a comprehensive next-generation pathogen analysis pipeline for captive and free-living wildlife. *J Comp Pathol.* 2014;150(4):474–88.
- TIPOLD A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. *J Vet Intern Med.* 1995;9(5):304–14.
- TIZARD I, BALL J, STOICA G, PAYNE S. The pathogenesis of bornaviral diseases in mammals. *Anim Health Res Rev.* 2016;17(2):92–109.
- TODA Y, MATSUKI N, SHIBUYA M, FUJIOKA I, TAMAHARA S, ONO K. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. *Vet Rec.* 2007;161(8):261–4.
- TOMONAGA K, KOBAYASHI T, IKUTA K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* 2002;4(4):491–500.
- TRUYEN U, MÜLLER T, HEIDRICH R, TACKMANN K, CARMICHAEL LE. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiol Infect.* 1998;121(2):433–40.

- UCHIDA K, PARK E, TSUBOI M, CHAMBERS JK, NAKAYAMA H. Pathological and immunological features of canine necrotizing meningoencephalitis and granulomatous meningoencephalitis. *Vet J.* 2016;213:72–7.
- VAHLENKAMP TW, KONRATH A, WEBER M, MÜLLER H. Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol.* 2002;76(19):9735–43.
- VAN MOLL P, ALLDINGER S, BAUMGÄRTNER W, ADAMI M. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Vet Microbiol.* 1995;44(2–4):193–9.
- VAN RIEL D, VERDIJK R, KUIKEN T. The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J Pathol* 2015;235(2):277–87. doi: 10.1002/path.4461
- VIANA M, MANCY R, BIEK R, CLEVELAND S, CROSS PC, LLOYD-SMITH JO, HAYDON DT. Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends Ecol Evol.* 2014;29(5):270–9.
- WEISSENBOCK H, BAGÓ Z, KOLODZIEJEK J, HAGER B, PALMETZHOFER G, DÜRRWALD R, NOWOTNY N. Infections of horses and shrews with Bornaviruses in Upper Austria: a novel endemic area of Borna disease. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6:e52. doi:10.1038/emi.2017.36
- WEISSENBOCK H, KOLODZIEJEK J, HAGER B, NOWOTNY N. Infected reservoir hosts suggest a novel endemic area for Borna disease in Austria. *J Comp Pathol.* 2017;156:96.
- WEISSENBOCK H, NOWOTNY N, CAPLAZI P, KOLODZIEJEK J, EHRENSPERGER F. Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol.* 1998;36(7):2127–30.
- WENSMAN JJ, JÄDERLUND KH, STRÖM HOLST B, BERG M. Borna disease virus infection in cats. *Vet J.* 2014;201(2):142–9.
- WERNER B. Untersuchungen zur vertikalen Übertragung des Virus der Bornaschen Krankheit beim Pferd [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2000.

- WERNER-KEIŠS N, GARTEN W, RICHT JA, POROMBKA D, ALGERMISSEN D, HERZOG S, BAUMGÄRTNER W, HERDEN C. Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neuro*. 2008;34(6):590–602.
- WERTH D. Vorkommen und Bedeutung von *Chlamydia psittaci* und *Coxiella burnetii* bei Hund und Katze: eine Literaturstudie. *Berl Münch Tierärztl*. 1989;102:156–61.
- WIDÉN F, SUNDSTRÖM E, GAVIER-WIDÉN D, BERG AL, DILLNER B, BERG M. Detection of herpesvirus DNA in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*; syn. *Alopex lagopus*) with fatal encephalitis. *Res Vet Sci*. 2012;92(3):509–11.
- WILLIAMS JH, KÖSTER LS, NAIDOO V, ODENDAAL L, VAN VEENHUYSEN A, DE WIT M, VAN WILPE E. Review of idiopathic eosinophilic meningitis in dogs and cats, with a detailed description of two recent cases in dogs. *J S Afr Vet Assoc*. 2008;79(4):194–204.
- WOLFF T, HEINS G, PAULI G, BURGER R, KURTH R. (2006): Failure to detect Borna disease virus antigen and RNA in human blood. *J Clin Virol* 2006;36(4):309–11.
- WOOLHOUSE MEJ, HAYDON DT, ANTIA R. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecol Evol*. 2005;20(5):238–44.
- WU YJ, SCHULZ H, LIN CC, SAAR K, PATONE G, FISCHER H, HÜBNER N, HEIMRICH B, SCHWEMMLE M. Borna disease virus-induced neuronal degeneration dependent on host genetic background and prevented by soluble factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(5):1899–904.
- WURM R, DOBLER G, PETERS M, KIESSIG ST. Serological investigations of red foxes (*Vulpes vulpes* L.) for determination of the spread of tick-borne encephalitis in Northrhine-Westphalia. *J Vet Med B*. 2000;47(7):503–9.
- ZOLLER H. Vergleichende Telemetriestudie an Rotfuchs (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) und Marderhund (*Nyctereutes procyonoides* Gray, 1834) [Dissertation]. Rostock: Universität Rostock; 2010.

ZWICK W, SEIFRIED O. Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornaschen Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). Berl Tierärztl. 1925;41(9):129–32.

ZWICK W, SEIFRIED O. Untersuchungen über die in Hessen gehäuft auftretende Gehirn- und Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) bei Pferden. Berl Tierärztl. 1924;40(35):465–71.

10 Anhang

10.1 Arbeitsblatt „Betriebsinformationen“

Das Arbeitsblatt „Betriebsinformationen“ wurde in Zusammenarbeit mit den Stallbesitzern oder deren Vertretern bei der ersten Übergabe von Kleinsäugern aus der Schädlingsbekämpfung der Betriebe ausgefüllt.

NR:

Betriebsinformationen

Name Betrieb _____
Adresse _____
Stallbesitzer _____
Telefonnummer _____
Datum _____

1. Pferde

- 1.1. Pferdehaltung auf dem Betrieb
- Seit mehr als 50 Jahren
 - Seit 49–20 Jahren
 - Seit 19–3 Jahren
 - Seit < als 3 Jahren
- 1.2. Anzahl der Pferde
- 1–5
 - 6–20
 - 21–40
 - >40
- 1.3. Kontakte zu betriebsfremden Pferden (*Neuzugänge, Gruppenwechsel, Turniere, Lehrgänge, Wanderreitstation*)
- Regelmäßig
 - 5–10* im Jahr
 - 1–4* im Jahr
 - Weniger
- 1.4. Andere Tierarten in dem Betrieb
- Rinder
 - Esel
 - Schweine
 - Hunde
 - Katzen
 - Sonstige: _____
- 1.5. Umgebung des Betriebes
- Waldgebiet (Entfernung zum Wald in km _____)
 - Ackerlandschaft
 - Wiesenlandschaft
 - Siedlungsbereich
 - Sonstiges _____

2. Haltung

- 2.1. Haltung
- Reine Boxenhaltung
 - Boxen- und Paddockhaltung (s. 2.2.)
 - Boxen- und Weidehaltung (s. 2.3.)
 - Offenstall
 - Sonstiges _____
- 2.2. Auslauffläche in m² _____
- 2.3. Weidefläche in m² _____
- 2.4. Entfernung zwischen Weidefläche und Stall/Box: _____
- 2.5. Isolation des Stalles
- Eindringen von Nagern schwer möglich (Türen und Fenster Tag und Nacht geschlossen)
 - Tagsüber Türen und Fenster im Stallgebäude offen
 - Weitere Zugänge (Spalten und Löcher) offen
 - Unterstand ohne Türen und Fenster

3. Hygiene

- 3.1. Einstreu
- Stroh
 - Späne
 - Spezialmatten
 - Sonstiges _____
- 3.2. Zeitplan Ausmisten der Boxen/Reinigung von Paddocks, Unterständen
- Mind. 1* täglich
 - 3–6* pro Woche
 - 1–2* pro Woche
 - Matratzenhaltung
 - Sonstiges _____
- 3.3. Lagerung des Kraftfutters
- In einem geschlossenen Raum (s. 3.4.)
 - Auf der Stallgasse
 - In geschlossenen Boxen/Truhen
 - Ohne Deckel/offene Futtersäcke

- 3.4. Isolation der Futterkammer
- Eindringen von Nagern schwer möglich (Türen und Fenster Tag und Nacht geschlossen)
 - Tagsüber Türen und/oder Fenster der Futterkammer offen
 - Weitere Zugänge (Spalten und Löcher) offen

4. Schadnagerbekämpfung

- 4.1. Häufigkeit der Schadnagerbekämpfung
- Ständig Bekämpfungsmaßnahmen
 - Jährlich
 - Nur bei Problemen oder Hinweis auf Befall
- 4.2. Arten der Schadnagerbekämpfung
- Katzen
Anzahl: _____
 - Lebendfallen
Anzahl: _____
 - Totschlagfallen
Anzahl: _____
 - Auslegen von Gift
An wievielen Stellen: _____
 - Sonstiges _____
- 4.3. In welchen Bereichen wird eine Schadnagerbekämpfung vorgenommen
- Gesamter Betrieb (Innen- sowie Außenbereich)
 - Futterkammer
 - Scheune
 - Außenbereich
 - Stallgasse

10.2 Informationen zu den einzelnen Pferdebetrieben mit dem Vorkommen der Bornaschen Krankheit beim Pferd

Die folgenden Tabellen beinhalten eine Übersicht der Informationen, die anhand des Arbeitsblattes „Betriebsinformationen“ (siehe Anhang 10.1) gewonnen werden konnten.

Anhang

1. Pferde

Nummer Betrieb	Pferdehaltung auf dem Betrieb (J)				Anzahl der Pferde			
	>50	49–20	19–3	<3	1–5	6–20	21–40	>40
1		x						x
2			x		x			
3			x			x		
4			x				x	
5		x				x		
6		x						x
7		x						x
8		x				x		
10			x			x		
12	x							x
14	x				x			

Nummer Betrieb	Kontakte zu betriebsfremden Pferden				Andere Tierarten im Betrieb			
	Rglm.	5–10*/Jahr	1–4*/Jahr	Weniger	Nutztiere	Hunde	Katzen	Sonstige*
1	x					x	x	x ¹
2			x				x	x ²
3	x					x	x	
4			x			x	x	
5			x					
6		x				x	x	
7	x					x		
8	x					x	x	x ³
10				x		x		
12	x					x	x	
14				x				

*Sonstige: Geflügel (x¹, x², x³) Esel (x¹), Ziege (x¹)

Nummer Betrieb	Umgebung des Betriebes (vorwiegend)			
	Wald	Ackerland	Wiesen	Siedlung
1	x		x	
2	x	x		x
3				x
4		x	x	
5			x	
6	x			
7	x	x		
8		x	x	
10		x	x	
12		x	x	
14		x	x	x

Anhang

2. Haltung

Nummer Betrieb	Haltung				Isolation des Stalls			
	Box	Box+ Paddock	Box+Weide	Offenstall	geschlossen	tags. offen	immer offen	Unter- stand
1		x	x			x	x	
2		x				x	x	
3		x	x			x	x	
4		x	x			x	x	
5			x			x	x	
6				x		x	x	
7	x	x				x	x	
8		x	x			x	x	
10			x		k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
12	x	x	x			x	x	
14	x						x	

k.A. keine Angabe

3. Hygiene

Nummer Betrieb	Einstreu				Ausmisten, reinigen von Box/Paddock/Unterstand			
	Späne	Stroh	Matten	Sonstiges	>1* tägl.	3-6*/Woche	1-2*/Woche	Matratze
1	x	x			x			
2		x			x			
3		x			x			
4		x						x
5		x			x			
6		x						x
7	x	x			x			
8	x				x			
10	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
12	x	x			k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
14		x				x		

k.A. keine Angabe

Nummer Betrieb	Lagerung von Krafffutter				Isolation der Futterkammer		
	eig. Raum	Stallgasse	Truhe	offen	geschlossen	tlw. offen	mult. Zugänge
1		x		x		x	x
2		x	x			x	x
3			x	x		x	x
4		x	x			x	x
5			x			x	x
6			x			x	x
7				x		x	x
8		x				x	x
10							
12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
14	x				x		

k.A. keine Angabe

Anhang

4. Schädnerbekämpfung

Nummer Betrieb	Arten der Schädnerbekämpfung				Häufigkeit der Maßnahmen*		
	Katzen	Lebendfallen	Totschlag- fallen	Giftköder	ständig	jährlich	bei Hinweis
1	x		x	x			x
2	x			x	x		
3	x			x			x
4	x			x			x
5							x
6	x						
7				x	x		
8	x		x				x
10							x
12	x						x
14							x

*Bekämpfung durch Katzen nicht eingeschlossen

Nummer Betrieb	Bereiche in denen Schädner bekämpft werden				
	Gesamtbetrieb	Futter- kammer	Scheune	Außen- bereich	Stallgasse
1		x			x
2				x	
3				x	
4		x	x		x
5					
6					
7	x				
8		x			
10	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
14					

k.A. keine Angabe

10.3 Untersuchung von 100 Kleinsäugetern auf anti-BoDV-1-Antikörper und BoDV-1-RNA

Kennung	Art	Herkunft	Herkunft	BoDV-1 PCR	IIFT
10001	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10002	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10003	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10004	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10005	<i>M. musculus</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10006	<i>C. leucodon</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10007	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10008	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10009	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
10010	<i>A. flavicollis</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	<1:10
11002	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	<1:10
11003	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	<1:10
12001	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Eichstätt	BY	Negativ	<1:10
6012	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6013	<i>Microtus sp.</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6014	<i>Microtus sp.</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6016	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6017	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6018	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6019	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6020	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6021	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
4003	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4004	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4005	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4006	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4007	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4008	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4009	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4010	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4011	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4012	<i>Hausmaus</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4013	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4014	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4015	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4016	<i>M. glareolus</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4017	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4018	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4019	<i>M. musculus</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4020	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4021	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4022	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4023	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4024	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4025	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10

Anhang

Kennung	Art	Herkunft	Herkunft	BoDV-1 PCR	IIFT
4026	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
4027	<i>Microtus sp.</i>	LKR Unterallgäu	BY	Negativ	<1:10
6022	<i>M. glareolus</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6023	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6024	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6025	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6026	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
6027	<i>Microtus sp.</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
8007	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Weilheim-Schongau	BY	Negativ	< 1: 10
8008	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Weilheim-Schongau	BY	Negativ	< 1: 10
8009	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Weilheim-Schongau	BY	Negativ	< 1: 10
11004	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1: 10
11005	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1: 10
11006	<i>M. musculus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	k.A.
10011	<i>A. terrestris</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	< 1: 10
10012	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i.d. Oberpfalz	BY	Negativ	< 1: 10
5073	<i>M. musculus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	< 1: 10
5074	<i>S. minutus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	k.A.
11007	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1:10
11010	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1: 10
11011	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1:10
11012	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1:10
11013	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	k.A.
11015	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1: 10
11016	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	k.A.
11017	<i>A. flavicollis</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	k.A.
11018	<i>A. flavicollis</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1: 10
11019	<i>S. coronatus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	< 1: 10
12002	<i>M. glareolus</i>	LKR Eichstätt	BY	Negativ	k.A.
5076	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	< 1:10
11020	<i>A. terrestris</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	<1:10
11022	<i>A. flavicollis</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	<1:10
5078	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
5079	<i>C. leucodon</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
14001	<i>C. leucodon</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
5080	<i>C. leucodon</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	k.A.
11023	<i>C. leucodon</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	k.A.
F5	<i>A. flavicollis</i>	LKR Gießen	HE	Negativ	<1:10
11008	<i>C. leucodon</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	<1:10
11009	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	<1:10
11021	<i>S. minutus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	Negativ	<1:10
9002	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
9003	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
9004	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
9005	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
9006	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
5075	<i>C. leucodon</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
13001	<i>A. sylvaticus</i>	Hochtaunuskreis	HE	Negativ	<1:10
13003	<i>C. russula</i>	Hochtaunuskreis	HE	Negativ	<1:10
13004	<i>C. russula</i>	Hochtaunuskreis	HE	Negativ	<1:10

Anhang

Kennung	Art	Herkunft	Herkunft	BoDV-1 PCR	IIFT
13005	<i>A. sylvaticus</i>	Hochtaunuskreis	HE	Negativ	<1:10
13006	<i>A. sylvaticus</i>	Hochtaunuskreis	HE	Negativ	<1:10
6006	<i>A. terrestris</i>	LKR Augsburg	BY	Negativ	<1:10
9007	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10
9008	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Günzburg	BY	Negativ	<1:10

10.4 Kein Nachweis von anti-BoDV-1-spezifischen Antikörpern bei 107 Kleinsäugetern

Kennung	Art	Herkunft	Herkunft	IIFT
11024	<i>S. minutus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5
11025	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11026	<i>S. minutus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5
11027	<i>S. minutus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5
11028	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11029	<i>M. glareolus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11031	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11032	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11033	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11034	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11035	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11036	<i>A. flavicollis</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11037	<i>A. terrestris</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
12003	<i>Microtus sp.</i>	LKR Eichstätt	BY	<1:10
12004	<i>Microtus sp.</i>	LKR Eichstätt	BY	<1:10
12005	<i>Microtus sp.</i>	LKR Eichstätt	BY	<1:10
12007	<i>S. araneus</i>	LKR Eichstätt	BY	<1:5
12008	<i>Microtus sp.</i>	LKR Eichstätt	BY	<1:10
12009	<i>Microtus sp.</i>	LKR Eichstätt	BY	<1:10
12010	<i>S. araneus</i>	LKR Eichstätt	BY	<1:5
10013	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10014	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10015	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10016	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10017	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10018	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10019	<i>A. terrestris</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10020	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10021	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10022	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10023	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10024	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10025	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10026	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10027	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10028	<i>Microtus sp.</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
10029	<i>A. terrestris</i>	LKR Neumarkt i. d. Oberpfalz	BY	<1:10
8010	<i>S. coronatus</i>	LKR Weilheim-Schongau	BY	<1:5
8011	<i>S. araneus</i>	LKR Weilheim-Schongau	BY	<1:5
8012	<i>S. araneus</i>	LKR Weilheim-Schongau	BY	<1:5
11038	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5

Anhang

Kennung	Art	Herkunft	Herkunft	IIFT
11039	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5
11040	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11041	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
11042	<i>S. minutus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5
11043	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5
11044	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:5
11051	<i>S. araneus</i>	LKR Erlangen-Höchstadt	BY	<1:10
12	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
15	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
21	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
23	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
25	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
44	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
48	<i>A. sylvaticus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
52	<i>A. terrestris</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
67	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
68	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
71	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
72	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
73	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
74	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
10	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
16	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
20	<i>S. coronatus</i>	LKR Reutlingen	BW	<1:10
20A	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
40	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
41	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
42	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
47	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
49	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
50	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
60	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
61	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
62	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
65	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
77	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
198	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
207	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
225	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
237	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
242	<i>S. coronatus</i>	LKR Rottweil	BW	<1:10
245	<i>S. araneus</i>	LKR Rottweil	BW	<1:10
14	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
24	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
26	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10

Anhang

Kennung	Art	Herkunft	Herkunft	IIFT
38	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
39	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
43	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
46	<i>M. musculus</i>	LKR Sigmaringen	BW	<1:10
51	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
63	<i>C. russula</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
75	<i>M. musculus</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
76	<i>Microtus sp.</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
U1	<i>Microtus sp.</i>	k.A.	BW	<1:10
U2	<i>A. terrestris</i>	Zollernalbkreis	BW	<1:10
H2	<i>C. russula</i>	Lahn-Dill-Kreis	HE	<1:5
H3	<i>C. russula</i>	LKR Giessen	HE	<1:5
H4	<i>A. sylvaticus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
H5	<i>C. russula</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
16001	<i>M. musculus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
16002	<i>M. musculus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
16003	<i>M. musculus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
16004	<i>M. musculus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
16005	<i>M. musculus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
16006	<i>M. musculus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10
16007	<i>M. musculus</i>	LKR Giessen	HE	<1:10

Eigenanteil

Nachweis der Eigenleistung von Manon Bourg bei den zwei Veröffentlichungen und dem Kapitel „Zusätzliche Untersuchungen“ für die kumulative Dissertation

Veröffentlichung 1: **BOURG M**, HERZOG S, ENCARNAÇÃO JA, NOBACH D, LANGE-HERBST H, EICKMANN M, HERDEN C. Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany [letter]. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(12):2064-6.

Veröffentlichung 2: **BOURG M**, NOBACH D, HERZOG S, LANGE-HERBST H, NESSELER A, HAMANN HP, BECKER S, HÖPER D, HOFFMANN B, EICKMANN M, HERDEN C. Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis. *Virology*. 2016;13:151. doi: 10.1186/s12985-016-0608-1.

Konzeption und Planung sowie Durchführung der Studien, Auswertung der Resultate und Manuskripterstellung

Manon Bourg konzipierte die Studien zusammen mit ihrer Betreuerin. Sie suchte eigenständig nach Kooperationspartnern für die Beschaffung der Proben von wildlebenden Tieren und übernahm die Kommunikation mit den Kooperationspartnern von anderen Universitäten und öffentlichen Instituten, den praktischen Tierärzten, den Jägern und den Pferdebesitzern. Sie organisierte die Abholung der Kleinsäuger und der Proben der kleinen Karnivoren in Bayern, Baden-Württemberg und Hessen, die Dokumentation und Probenlagerung, sowie den Austausch zwischen den beteiligten Laboren. Außerdem übernahm Sie die Planung der verschiedenen Untersuchungen.

Manon Bourg charakterisierte die an Studie 1 beteiligten Pferdebetriebe mit dem Vorkommen von Bornascher Krankheit mit Hilfe der Auswertung eines selbst erstellten Fragebogens. Sie übernahm die Bestimmung, Sektion und Probenentnahme bei den Kleinsäufern. Zum Teil beprobte sie die kleinen Karnivoren eigenständig auf Jagdveranstaltungen in Hessen und Bayern. Die Beurteilung der histologischen Schnitte mittels Lichtmikroskopie, die komplette BoDV-1-Immunhistologie und In-situ-Hybridisierung und deren Interpretation gehörten zu Ihren Aufgaben. Sie half bei der Planung, Durchführung

und vor allem Auswertung der molekularbiologischen Resultate zum Nachweis von Bornaviren, Flaviviren und Parvoviren mittels pan-Borna-RT-PCR, pan-Flavi-RT-PCR und Parvovirus-PCR sowie den immunhistologischen Analysen zum Nachweis anderer Erreger wie BoDV-1 (Canine Staupe-, Adeno-, sowie Parvoviren, *Toxoplasma gondii* und Suides Herpesvirus 1).

Manon Bourg war für die Planung, Interpretation, Diskussion und Niederschrift der erzielten Ergebnisse verantwortlich, die sie in zwei wissenschaftlichen Artikeln in peer-reviewed Fachzeitschriften veröffentlichte. Sie bereitete die Manuskripte mit der Interpretation der Daten, allen Tabellen und Abbildungen sowie der Diskussion nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft vor. Nach dem Feedback der Ko-Autoren stellte sie die fertigen Manuskripte zusammen. Manon Bourg reichte beide Artikel eigenständig ein und war für die Revision mit den schriftlichen Stellungnahmen zuständig.

Folgende Untersuchungen wurden von Kollegen durchgeführt:

Indirekter Immunofluoreszenztest, Western Blot, BoDV-1-RT-qPCR und nested-RT-PCR, Tollwut-IFT, Staupe-RT-PCR und NGS.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Christiane Herden für die Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung im Verlaufe der Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Sibylle Herzog, deren Kontakte nach Bayern diese Arbeit möglich machten und die mich durch zielführende Diskussionen und anhaltende Hilfestellung begleitet und unterstützt hat. Ein weiteres großes Dankeschön geht an Daniel Nobach, der es möglich gemacht hat, diese Arbeit trotz großer Entfernungen fertig zu stellen und auf den ich mich immer 100% verlassen konnte. Danke auch an Herrn Dr. Markus Eickmann, Herrn Prof. Jorge Encarnação und Frau Dr. Hildburg Lange-Herbst für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit.

Ein großer Dank geht an Dr. Gebhard Fröba, Dr. Anne Nesseler, Dr. Michael Suntz, Dr. Ernst Grossmann, Dr. Birgit Werner, Dr. Karl Bechter, Dr. Dr. Hans Rapp, Dr. Rupprecht Betz, Dr. Johannes Strehle, Remig Erlinger und Dr. Sabrina Cibulski für die Bereitstellung von Probenmaterial.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie bin ich dankbar für die zahlreiche Unterstützung: Dr. Alexandra Kupke für die Einführung in viele technische Methoden; Silke Engel, Dr. Werner Hecht und Gisele Boos für die „molekularbiologische Unterstützung“; Silke Gantz, Diana Klotz, Sabine Wack, Alexandra Luh für die Geduld bei den gefühlt tausenden Immunhistos sowie Stefan Streit für die Hilfe bei den Sektionen.

Danke an Anne Jablonka, Sara Malberg, Daniel Nobach und Dr. Julia Post die mich immer wieder herzlich aufgenommen haben, wenn ich in Gießen oder in Nürnberg gestrandet bin. Ein Dank geht auch an mein Drachenboot-Team auf der Hellas, das mich immer wieder zu Höchstleistungen angespornt hat.

Danke auch an Christel Kayser, Julia Siebenaler, Dr. Ann Kiefer, Erna Kornelis, Véra und Jeanne Adam die mit ihrem Know-How in unterschiedlichen Gebieten, die Artikel und diese Dissertation abgerundet haben.

Danksagung

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie, besonders meinen Eltern, danken für den Glauben in mich und in den Erfolg dieser Arbeit. Auch Fernand Wictor, Sarah Kolber, Sophie Hoffmann, Daniel Dallo und Yannick Lefèvre sowie den Mädels aus meiner Studienzeit in Wien danke ich herzlich für die Unterstützung während der anstrengenden und manchmal schwierigen Zeit.

DANKE!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6700-7



9 783835 196700 7