

DANIEL NOBACH

Potenzielle Reservoirre bei neurotrophen Bornavirus-Infektionen



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

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

1. Auflage 2021

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2021

© 2021 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
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

Potenzielle Reservoir bei neurotrophen Bornavirus-Infektionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Daniel Nobach

Tierarzt aus Stuttgart

Gießen 2021

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. Benjamin Lamp

Tag der Disputation: 10.09.2021

„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.“

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
2	Literaturübersicht.....	4
2.1	Definition und Bedeutung von Reservoiren.....	4
2.2	Borna Disease Virus-1.....	11
2.2.1.	Geschichte der Erforschung der Bornaviren.....	11
2.2.2.	Aktuelle Taxonomie von Bornaviren.....	12
2.2.3.	Genomorganisation von Bornaviren.....	16
2.2.4.	Virusproteine von BoDV-1 und mögliche Persistenzmechanismen.....	16
2.2.5.	Endogene Elemente von Bornaviren.....	18
2.2.6.	BoDV-1-Infektionen als Ursache der Bornaschen Krankheit.....	20
2.2.6.1.	Epidemiologie der Bornaschen Krankheit.....	20
2.2.6.2.	Mögliche Reservoire von BoDV-1.....	22
2.2.6.3.	Wirtsspektrum der Bornaschen Krankheit.....	25
2.2.6.4.	Klinische Symptome der Bornaschen Krankheit.....	26
2.2.6.5.	Labormethoden zum Nachweis von BoDV-1-Infektionen.....	26
2.2.6.6.	Charakteristika der BoDV-1-Infektion im Fehlwirt.....	28
2.2.6.7.	Humane BoDV-1-Infektionen.....	29
2.2.6.8.	Tiermodelle zur Untersuchung von BoDV-1-Infektionen.....	36
2.3	Spitzmäuse.....	38
2.3.1.	Biologie.....	38
2.3.2.	Spitzmäuse in Feldstudien.....	41
2.3.3.	Spitzmäuse als Labortiere.....	41
2.3.4.	Spitzmäuse als Reservoir.....	43
2.3.5.	Feldspitzmäuse als Reservoir von BoDV-1.....	43
2.4	Fledermäuse.....	46
2.4.1.	Biologie.....	46
2.4.2.	Fledermäuse in Feldstudien und als Labortiere.....	50
2.4.3.	Fledermäuse als Reservoir von Infektionserregern.....	50
2.4.4.	Bisherige Kenntnisse zu Bornavirusinfektionen bei Fledermäusen.....	54
3	Artikel 1.....	56
4	Artikel 2.....	76
5	Zusätzliche Ergebnisse.....	87
5.1	Artikel 3 (unveröffentlicht).....	87
5.2	Untersuchung von Betrieben mit equiner BD auf das Vorkommen von Fledermäusen.....	104
5.3	Charakterisierung aller Tiere der Feldspitzmaushaltung auf pathologische Veränderungen sowie die Virusverteilung in infizierten Feldspitzmäusen.....	107

5.4	Charakterisierung der Virusverteilung in BoDV-1 infizierten Tieren in der Feldspitzmaushaltung.....	109
6	Diskussion.....	112
6.1.	Etablierung einer Haltung von Feldspitzmäusen.....	113
	Fang von Feldspitzmäusen	113
	Charakteristika der Haltung.....	114
	Zucht von Feldspitzmäusen	116
	Beobachtete Krankheiten in der Haltung.....	117
6.2.	Natürliche BoDV-1-Infektion bei Feldspitzmäusen	118
	Verlauf der BoDV-1-Infektion in lebenden Feldspitzmäusen.....	118
	Ausscheidung von BoDV-1 durch infizierte Feldspitzmäuse	120
	Übertragungswege innerhalb der Feldspitzmauspopulation.....	122
	Übertragungswege zu Fehlwirten	123
6.3.	Untersuchung auf BoDV-1-Infektionen in Fledermäusen	125
	Vorkommen von Fledermäusen in Ställen mit vorherigen Fällen von equiner BD	125
	Untersuchung auf BoDV-1-Infektionen in Fledermäusen mittels RT-PCR und immunhistologischer Untersuchung	125
6.4.	Aktuelle Reservoirsituation von BoDV-1	128
	Ausblick.....	129
7	Zusammenfassung.....	131
8	Summary	134
9	Literaturverzeichnis	136
10	Anhang	161
10.1.	Zusätzliche Methoden: Bestimmung von Fledermäusen mittels Ultraschalldetektoren 161	
10.2.	Auswertung von Ultraschalldetektoren zur Bestimmung von Fledermausarten in Betrieben mit equiner BD.....	165
10.3.	Pathologische Untersuchungen bei Feldspitzmäusen - Normalbefunde	169
10.4.	Ergebnisse der pathologischen Untersuchungen bei Feldspitzmäusen der Haltung.....	176
	Eigenanteil.....	199
	Veröffentlichungen	201
	Danksagung	206

Tabellenverzeichnis

Literaturübersicht

Tabelle 1 Taxonomie und Verwandtschaft der <i>Bornaviridae</i>	S.14
Tabelle 2 <i>Bornaviridae</i>	S.15
Tabelle 3 Humane BoDV-1-Infektionen	S.32
Tabelle 4 Spitzmausarten in Deutschland	S.40
Tabelle 5 Fledermausarten in Deutschland	S.48

Artikel 1

Artikel 1: Table 1 Detection of BoDV-1 RNA in naturally infected bicolored white-toothed shrews over a period of 4 weeks	S.63
Artikel 1: Table 2 Detection of BoDV-1 RNA in naturally infected bicolored white-toothed shrews after more than at least 250 days in husbandry	S.63
Artikel 1: S1 Table. Overview of individual shrews of the study	S.75

Artikel 2

Artikel 2: Additional file 2: Table S1. Primer Sequences.	S.83
Artikel 2: Additional File 4: Table S2: Immunohistochemistry details.	S.84
Artikel 2: Additional file 5: Table S3. Bats with positive immunoreactivity	S.85

Artikel 3

Artikel 3: Table 1. Capture	S.99
Artikel 3: Table 2. Wild caught <i>Crocidura leucodon</i>	S.100
Artikel 3: Table 3. <i>Crocidura leucodon</i> born in captivity	S.100
Artikel 3: Table 4. Analysis of the shrew diet	S.101
Artikel 3: S1 Table. Overview of mating	S.102
Artikel 3: S2 Table. Evaluation of the well-being of <i>Crocidura leucodon</i>	S.103

Zusätzliche Ergebnisse

Tabelle 6 Vorkommen von Fledermäusen in Betrieben mit equiner BD	S.105
Tabelle 7 Übersicht über gefangene Feldspitzmäuse in der Haltung	S.107
Tabelle 8 Übersicht über in der Haltung geborene Feldspitzmäuse	S.108
Tabelle 9 Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung der Feldspitzmäuse aus der Haltung	S.109
Tabelle 10 Immunhistologische Auswertung der Virusverteilung bei persistent BoDV-1-infizierten Feldspitzmäusen	S.110

Anhang

Tabelle 11 Einstellungen zur Rufanalyse im Programm Song Scope	S.163
Tabelle 12 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 1	S.165
Tabelle 13 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 2	S.166
Tabelle 14 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 3	S.166
Tabelle 15 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 5	S.167
Tabelle 16 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 6	S.168

Abbildungsverzeichnis

Literaturübersicht

Abbildung 1 – Ausscheidungs und Übertragungsmöglichkeiten von Pathogenen bei Reservoirtieren S.10

Abbildung 2 – Genomorganisation von BoDV-1 S.16

Abbildung 3 – Endemiegebiete der Bornaschen Krankheit S.21

Abbildung 4 – Artmerkmale der Feldspitzmaus S.39

Artikel 1

Artikel 1 Fig 1 Relative body mass trend of non-infected and infected shrews S.62

Artikel 1 Fig 2. Detection of Borna disease virus-1 isolated from saliva (shrew #2) in rabbit embryonic brain cells S.64

Artikel 1 Fig 3. Phylogenetic analysis of BoDV-1 sequences obtained from isolated virus S.65

Artikel 1 Fig 4. Demonstration of BoDV-1 nucleoprotein, messenger RNA and genomic RNA S.66

Artikel 1 S1 Fig. Body mass change infected individuals [g] S.71

Artikel 1 S2 Fig. Body mass change non-infected animals [g] S.72

Artikel 1 S3 Fig. Organ distribution of BoDV-1 nucleoprotein, mRNA and genomic BoDV-1 RNA of individual shrews. S.73

Artikel 1 S4 Fig. No detection of BoDV-1 antigen or RNA in a non infected shrew by immunohistochemistry and in-situ hybridization, shrew was trapped dead by pest control. S.74

Artikel 2

Artikel 2 Additional file 1: Figure S1. Gel electrophoresis of PCR Products. S.83

Artikel 2 Additional file 3: Figure S2. Immunohistochemistry reactions in the intestine of *Eptesicus nilssonii*. S.84

Artikel 3

Artikel 3 Fig 1. Development of the body mass in the first months S.99

Anhang

Abbildung 5 – Rufanalyse mit dem Auswertungsfenster des Programmes Song Scope S.163

Abbildung 6 – Rufe einer Zwergfledermaus S.164

Abbildung 7 – Rufe einer Breitflügelfledermaus S.164

Abbildung 8 – Rufe einer Myotis-Fledermaus S.164

Abbildung 9 – Situs Feldspitzmaus S.169

Abbildung 10 – Speicheldrüsen bei der Feldspitzmaus S.170

Abbildung 11 – Organe der Brusthöhle	S.171
Abbildung 12 – Organe des Verdauungstraktes	S.172
Abbildung 13 – Niere und Harnblase	S.173
Abbildung 14 – Mammarydrüsen und Hoden bei der Feldspitzmaus	S.174
Abbildung 15 – Flankendrüse bei Spitzmäusen	S.175
Abbildung 16 – Rundzellentumor und eitrige Hepatitis bei Spitzmaus 1	S.184
Abbildung 17 – Leberadenom und Lungentumor bei Spitzmaus 2	S.185
Abbildung 18 – Lebertumor und Pankreastumor bei Spitzmaus 3	S.186
Abbildung 19 – Darminvagination bei Spitzmaus 5	S.187
Abbildung 20 – Hepatitis und Pneumonie bei Spitzmaus 6	S.188
Abbildung 21 – Hautknoten bei Spitzmaus 7	S.189
Abbildung 22 – Rundzellentumor im Thorax bei Spitzmaus 8	S.190
Abbildung 23 – Mastzelltumor an der linken Hintergliedmaße bei Spitzmaus 13	S.191
Abbildung 24 – Hodentumor bei Spitzmaus 15	S.192
Abbildung 25 – Lymphosarkom bei Spitzmaus 16	S.193
Abbildung 26 – Leberkarzinom und Basalzelltumor bei Spitzmaus 19	S.194
Abbildung 27 – Rundzellentumor bei Spitzmaus 20	S.195
Abbildung 28 – Rundzellentumor im Mediastinum bei Spitzmaus 21	S.196
Abbildung 29 – Rundzellentumor im Mediastinum bei Spitzmaus 23	S.197
Abbildung 30 – Alopezie im Bereich des Rückens	S.198

1 Einleitung und Fragestellung

Die Bornasche Krankheit (BD) ist als tödlich verlaufende neurologische Erkrankung von Pferden und Schafen seit mehr als 300 Jahren bekannt. Ausgelöst wird sie durch eine Infektion mit dem Borna disease virus 1 (BoDV-1), einem RNA-Virus aus der Familie *Bornaviridae* in der Ordnung *Mononegavirales*. Die Zahl an Krankheitsfällen von BD reduzierte sich stark in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts [Dürwald et al. 2006]. Seit 2017 wurde von mehreren Arbeitsgruppen entdeckt, dass eine BoDV-1-Infektion beim Menschen ebenfalls zu einer letalen Meningoenzephalitis führen kann [Korn et al. 2018, Niller et al. 2020, Schlottau et al. 2018]. In diesen und weiteren teilweise retrospektiven Studien wurden mindestens 30 Fälle identifiziert, bei denen Menschen an einer BoDV-1-Infektion gestorben sind [Korn et al. 2018, Liesche et al. 2019, Niller et al. 2020, Schlottau et al. 2018]. Dieses zoonotische Potential zeigt, dass es im Sinne des „One-Health“-Konzeptes für die Sicherung der Gesundheit von Menschen und Tieren wichtig ist, natürliche Quellen der Infektion weiter zu erforschen, um geeignete Präventivmaßnahmen zu entwickeln.

Die Epidemiologie von BoDV-1 deutet darauf hin, dass der Erreger einen oder mehrere Reservoirwirte in der Wildtierpopulation besitzt, von denen Infektionen auf Fehlwirte wie Mensch oder Pferd übertragen werden können [Dürwald et al. 2006]. In Untersuchungen in verschiedenen Endemiegebieten wurden BoDV-1-infizierte Feldspitzmäuse gefunden, die bislang als die einzige Reservoirspezies angesehen werden [Bourg et al. 2013, Dürwald et al. 2014, Hilbe et al. 2006, Puorger et al. 2010, Weissenböck et al. 2017]. Insbesondere die Virusverteilung in Feldspitzmäusen, die im Gegensatz zu der Infektion im Fehlwirt nicht auf das Nervensystem beschränkt ist, sondern durch eine zusätzliche Virusvermehrung in verschiedenen Ausscheidorganen gekennzeichnet ist, stellt die Grundlage für eine Übertragung von der Feldspitzmaus auf andere Tiere und den Menschen dar [Dürwald et al. 2014, Puorger et al. 2010]. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nicht bekannt, ob BoDV-1-infizierte Feldspitzmäuse tatsächlich infektiöse Viren ausscheiden. Alle bisherigen Untersuchungen waren an toten Wildfängen durchgeführt worden, so dass nur Vermutungen über die Infektion im lebenden Tier geäußert werden konnten. Der Vergleich mit Erkenntnissen aus verschiedenen Tiermodellen der BoDV-1-Infektion, insbesondere mit der Infektion von neonatalen Lewisratten [Herzog et al. 1984, Morales 1988], bei der es auch zu einer disseminierten Virusverteilung und daraus folgend zum Ausscheiden von infektiösen Viren kommt, lässt Analogieschlüsse über den Verlauf der Infektion im Reservoirwirt zu. Durch die Problematik, dass die in einem Modell gewonnenen Erkenntnisse regelmäßig nur eingeschränkt auf andere Tierarten oder den Menschen übertragen werden können [Davis 2008, Masopust et al. 2017, Pedersen und Babayan 2011, Perrin 2014, Sellers 2017, Hart et al. 2015], können diese Vergleiche allerdings keine Untersuchungen an dem echten Wildtierreservoir ersetzen. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb, eine Haltung und Zucht der

Feldspitzmaus zu etablieren, die Infektionsversuche zum Studium der zugrundeliegenden Pathogenese an Spitzmäusen als Reservoir von BoDV-1 ermöglicht [Nobach et al. 2015, Artikel 1].

BoDV-1 als Reservoir-gebundenes RNA-Virus gehört somit zu der großen Anzahl an Infektionserregern, die aus einem Wildtierreservoir hinaus zu schweren Krankheitsausbrüchen in Haustierpopulationen und Menschen führen [Jones et al. 2008]. Auch die das Jahr 2020 dominierende „Covid-19“-Pandemie, ausgelöst durch das Severe-Acute-Respiratory-Syndrome(SARS)-Coronavirus-2, hat durch eine Übertragung aus einem Wildtier auf den Menschen begonnen [Latif und Mukaratirwa 2020, Zhou et al. 2020]. Zahlreiche andere bedeutende Infektionsgeschehen der letzten Jahre haben in Wildtierreservoirs sowie mit der initialen Überschreitung der Speziesbarriere begonnen. Beispiele sind die Ebolaepidemie von 2015 in Zentralafrika, die Middle-East-Respiratory-Syndrome(MERS)-Pandemie von 2012 und die SARS-Pandemie von 2002 sowie die fortwährenden weltweiten Infektionen mit dem Tollwutvirus und dem West-Nil-Fieber-Virus [Griffin 2010, Jones et al. 2008, Zhu et al. 2020]. Obwohl diese Infektionsgeschehen Unterschiede bei Übertragungswegen und Krankheitsverläufen zeigen, demonstrieren sie doch die grundlegende Bedeutung von Reservoirs sowie die Folgen eines Speziesübertritts auf eine neue Wirtsspezies. Modelle, um die Mechanismen zu erforschen, die einerseits die Viruspersistenz in den Reservoirspezies ermöglichen und andererseits zu Übertragungen zu neuen Wirten (spillover-Ereignisse) führen, können damit zu grundlegenden Erkenntnissen führen, die zu der Bekämpfung und Prävention von vielen schwerwiegenden, teilweise neu-aufretender Infektionskrankheiten beitragen.

Einzelne andere Infektionserreger haben ebenfalls Reservoirs in Spitzmausarten, beispielsweise Hantaviren aus der Familie der *Bunyaviridae*, Reservoirarten aus den Ordnungen Rodentia und Chiroptera sind allerdings häufiger beschrieben [Luis et al. 2013]. Rodentia wie Mäuse und Ratten in Endemiegebieten wurden schon in mehreren Studien auf BoDV-1-Infektionen untersucht [Dürwald et al. 2006, Kolodziejek et al. 2005] und haben bisher keine Hinweise auf weitere Reservoirs von BoDV-1 ergeben. Die Datenlage zu BoDV-1-Infektionen in Fledermäusen (Chiroptera) hingegen ist lückenhaft. Da Fledermäuse aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften geeignete Reservoirs für viele Viren darstellen [Calisher et al. 2006, Drexler et al. 2012, Irving et al. 2021] und gleichzeitig der Fund von Bornavirus-ähnlichen endogenen Elementen im Genom verschiedener Fledermausarten [Belyi et al. 2010, Horie et al. 2010, Horie et al. 2016] auf eine Co-Evolution von Bornaviren und Fledermäusen hindeutet [Cui und Wang 2015], war ein weiterer Teil der Arbeit, europäische Fledermäuse auf Orthobornavirusinfektionen zu untersuchen, um weitere mögliche Reservoirarten zu identifizieren [Nobach und Herden 2020, Artikel 2].

Zusammengefasst sollte in dieser Arbeit das Wissen zum Reservoir von BoDV-1 durch zwei wesentliche ergänzende Teile erweitert und wichtige Lücken geschlossen werden. Zum einen sollte durch die Etablierung einer Spitzmaushaltung die Möglichkeit geschaffen werden, die BoDV-1-Infektion in lebenden Feldspitzmäusen, dem schon bekannten Reservoirwirt von BoDV-1, zu untersuchen. Zum anderen sollte eine mögliche Rolle von Fledermäusen als Reservoir von BoDV-1 geklärt werden. Beide Studien haben so wichtige Beiträge geliefert, die Reservoirsituation von BoDV-1 weiter zu beleuchten, auch um mögliche Bekämpfungs- und Präventionsstrategien gegen BoDV-1 zu entwickeln.

2 Literaturübersicht

2.1 Definition und Bedeutung von Reservoiren

Seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wird zunehmend von dem weltweiten Phänomen berichtet, dass neue und zuvor unbekannte Infektionskrankheiten auftreten [Jones 2008, Bedford 2019]. Im Englischen wird dieses Phänomen „emerging infectious diseases“ (EID) genannt. Dadurch, dass keine Immunität in der naiven Population gegen diese neu auftretenden Infektionskrankheiten vorhanden ist sowie das Wissen zur Pathogenese, Prophylaxe, Bekämpfung und Therapie gegen neu auftretende Krankheiten gering ist, stellen sie eine beträchtliche Gefahr für die Gesundheit der Menschheit dar. 25,4 % dieser EID gehen laut Jones et al. [2008] auf Viren oder Prionen zurück, andere Studien gehen von einem Anteil von 37-44 % aus [Cleaveland et al. 2001, Taylor et al. 2001, Woolhouse und Gowtage-Sequeria 2005]. EID-Ereignisse, die auch außerhalb der wissenschaftlichen Welt Schlagzeilen machten, sind beispielsweise die SARS-Epidemie von 2002, die MERS-Epidemie von 2012, die Ebola-Epidemie von 2014 sowie die aktuelle Covid19-Pandemie von 2020 [Wilder-Smith 2021].

Dem Auftreten dieses Phänomens liegen mehrere Faktoren zu Grunde. Durch neue Diagnostikmethoden werden mehr Krankheitserreger entdeckt und identifiziert [Jones et al. 2008]. Die globale Vernetzung führt weiterhin zu einer erhöhten globalen Ausbreitungsgeschwindigkeit sowie zu dem Transfer von Krankheitserregern in naive Populationen [Daszak et al. 2000]. Und schließlich besitzt ein Großteil (70-75 %) dieser auftretenden Infektionserreger ein Reservoir in einer Wildtierpopulation, von dem aus es in die Haustierpopulation und auf die Menschheit übertreten kann [Jones et al. 2008, Recht et al. 2020]. Die Mechanismen des Wirtswechsels, bei dem eine Speziesbarriere überwunden wird, sind dabei bei vielen Krankheitserregern noch unbekannt [Daszak et al. 2000].

Die Begriffe „Reservoir“ und „Reservoirwirt“ sind in der Fachwelt etabliert und werden instinktiv verwendet, dennoch wird über bestimmte Feinheiten der Begriffe weiterhin diskutiert [Hallmaier-Wacker et al. 2017]. Die allgemein akzeptierte Definition von „Erregerreservoir“ ist eine ökologische Nische, in der sich Krankheitserreger sammeln und vermehren können und von der eine erneute Infektion ausgehen kann [Webster 2016]. Ein Erregerreservoir kann also auch die unbelebte Umwelt sein. „Reservoirwirt“ hingegen bezeichnet eine Tierart, die als Wirt fungieren kann, in dem sich ein Reservoir an Infektionserregern stetig oder längere Zeit halten kann [Webster 2016]. Ashford [1997] erweiterte den Begriff „Reservoir“, indem er auch Systeme von mehreren Tierarten mit Infektionsketten als Reservoir bezeichnete [Ashford 1997, 2003]. Dies ist besonders nützlich bei Parasiten, die komplexe Infektionsketten mit Neben- und Endwirten zur Entwicklung benötigen. Haydon et al. [2002] bezogen in ihre Definition des Begriffes „Reservoir“ auch mit ein, dass für verschiedene Spezies unterschiedliche Quellen existieren können, von denen die höchste

Wahrscheinlichkeit einer Infektion ausgeht, und beziehen deswegen das Reservoir immer auf eine bestimmte Spezies wie beispielsweise den Menschen (den „Zielwirt“) [Haydon et al. 2002]. Drexler et al. [2012] definieren Tierreservoir als Gruppen von Tieren, in denen ein Virus in einer höheren Diversität als in anderen Tiergruppen vorkommt, in denen sich das Virus in sozialen Tiergruppen dauerhaft hält und in denen natürliche Infektionen über den Kontakt einer sozialen Tiergruppe hinaus vorkommen [Drexler et al. 2012]. Diese Definition kann gut auf schnell mutierende Viren angewendet werden, bei einer geringen Varianz des Erregers ist die Anwendbarkeit allerdings begrenzt.

Allen Definitionen von „Reservoirwirt“ ist gemeinsam, dass bestimmte Anforderungen an den Reservoirwirt gestellt werden. Es müssen:

- 1) natürliche Infektionen mit dem Erreger in dieser Tierart vorkommen,
- 2) Routen existieren, durch die der Erreger übertragen werden kann und
- 3) die Erreger in der Lage sein, Speziesbarrieren zu überwinden.

Spezies, in denen natürliche Infektionen vorkommen, die aber durch einen anderen Infektionsverlauf oder Gewebetropismus nicht zu einer Weiterverbreitung des Erregers beitragen, werden als Fehlwirt („accidental host“) oder Sackgassenwirt („deadend-host“) bezeichnet [Viana et al. 2014].

Damit Speziesbarrieren überschritten werden können, müssen verschiedene Hürden überwunden werden [Plowright et al. 2017]. Die Art und Häufigkeit der Infektionen im Reservoirwirt, die Art und Menge der Ausscheidung des Erregers durch den Reservoirwirt sowie die Überlebensfähigkeit des Erregers in der Umwelt führen zu einer Erregerlast („pathogen pressure“), der andere Spezies ausgesetzt sind. Das Verhalten der anderen Spezies beeinflusst weiter die Häufigkeit eines Kontaktes mit dem Erreger („exposure“). Die natürlichen mechanischen Barrieren des Körpers wie Haut und Schleimhäute sowie das Immunsystem beeinflussen schließlich, ob die Infektion bei einer ausreichenden Erregerlast und Kontakthäufigkeit auch in der anderen Spezies erfolgreich verläuft [Plowright et al. 2017].

Der Verlauf der Infektion im Reservoirwirt kann je nach Erreger unterschiedlich sein. Es gibt Krankheitserreger, bei denen kein Unterschied im klinischen Verlauf der Infektion zwischen Reservoirwirt und Zielwirt existiert. Beispielsweise führt die Infektion mit dem Tollwutvirus bei Reservoirwirten (Fuchs, freilebende Hunde) und bei Zielwirten zu einer tödlichen Enzephalitis, die unterschiedliche Rolle in der Epidemiologie ergibt sich durch die Reservoirwirt-typische Ausbreitung des Virus in die Speicheldrüsen und die dadurch entstehende Ausscheidung und Übertragung auf den Zielwirt. Es gibt aber auch eine große Anzahl an Krankheitserregern, bei denen die Infektion im Reservoirwirt subklinisch oder inapparent verläuft und der Erreger nur in Fehlwirten zum Ausbruch einer Krankheit führt [Mandl et al. 2015]. Ein Beispiel hierfür sind Hantaviren, bei denen es im Reservoirwirt Rötelmaus zu keinen Krankheitssymptomen kommt, das Virus aber mit Exkreten

ausgeschieden wird und eine fieberhafte systemische Erkrankung mit Blutungen und Nierenversagen im Zielwirt Mensch auslösen kann [Schlegel et al. 2012, Ulrich et al. 2013]. Evolutionär hat dies für das Virus den Vorteil, dass im Reservoirwirt keine Selektion auf Erregerresistenz stattfinden muss und sich das Virus in der Reservoirwirtpopulation verbreiten kann [Carval und Ferriere 2010]. Der Übertritt in Fehlwirte ist hierbei ein eher zufälliges Ereignis und nicht Teil der Übertragungsstrategie. Gefördert wird der Erhalt des Virus im Reservoir durch persistente Infektionen, die bei vielen Reservoiren mit subklinischen oder inapparenten Infektionen vorkommen [Oldstone 2006].

Für eine persistente Infektion ist es nötig, dass das Virus zum einen nicht von der Immunantwort des Wirtes eliminiert wird und dass zum anderen nicht alle Virus-infizierte Zellen durch die Replikation durch Lyse oder Apoptose zugrunde gehen [Randall und Griffin 2017]. Dabei werden bei vielen verschiedenen Viren drei grundlegende Prozesse beobachtet: (I) ein Entkommen der Überwachungssysteme des Immunsystems des Wirts, so dass die Immunabwehr sich entweder nicht effizient bildet oder die Immunabwehr das Virus nicht effizient bekämpfen kann, (II) einzigartige Replikationsstrategien, um die Lyse von infizierten Zellen zu verhindern, und (III) die Infektion von spezialisierten Wirtszellen, die häufig mit einer veränderten Funktion der Wirtszelle verbunden ist [Oldstone 2006, Randall und Griffin 2017]. Beispiele dafür sind Nervenzellen mit veränderter Neurotransmitterausschüttung oder Immunzellen mit veränderter Zytokinproduktion [Oldstone 2006]. Dadurch können auch bei persistenten Infektionen ohne erkennbare morphologische Veränderungen im infizierten Gewebe durch Veränderung der Zellfunktion Störungen der normalen Körperfunktionen beobachtet werden [Oldstone 2006]. Auch *Bornaviridae* und BoDV-1, um das es in dieser Dissertation geht, nutzen verschiedene Strategien, um eine persistente Infektion zu ermöglichen (siehe Kapitel 2.2.4 „Virusproteine von BoDV-1 und mögliche Persistenzmechanismen“).

Je nach Übertragungshäufigkeit kann die Übertragung vom Reservoir auf andere Populationen sehr unterschiedliche Verläufe haben. Entscheidend ist dafür die Reproduktionszahl R_0 [Viana et al. 2014]. Die Reproduktionszahl R_0 gibt die Zahl an Neuinfizierten an, die durch einen Träger infiziert wurden [Viana et al. 2014]. Ist R_0 deutlich größer als Eins in einer Population, führt dies zu einer starken Ausbreitung in der Population und bei damit verbundenen Symptomen zu einer Epidemie. In einem Szenario, in dem die Wirte Sackgassenwirte darstellen und den Erreger nicht autonom übertragen, ist R_0 ungefähr gleich Null. Liegt R_0 zwischen Null und Eins, führt dies zu kurzen Infektionsketten innerhalb der Population, der Erreger wird aber nicht in dieser Population erhalten bleiben [Viana et al. 2014].

Daher ist die Interaktion zwischen Erreger und Wirt entscheidend für den weiteren Verlauf der Infektion innerhalb des einzelnen Wirtes und der Population. Auf Seiten des Erregers spielt dabei die Virulenz eine entscheidende Rolle, auf Seiten des Wirtes können zwei grundlegende Prozesse beobachtet werden, die Resistenz und die Toleranz [Carval und Ferriere 2010, Schneider und Ayres

2008]. Zum einen kann die Menge an Erregern durch den Wirt reduziert werden, um schädliche Auswirkungen auf den Organismus des Wirtes zu verringern. Viele Mechanismen der Immunabwehr des Wirtes, sowohl unspezifische als auch spezifische, tragen dazu bei, Erreger zu erkennen und zu bekämpfen, dies wird als Resistenz („resistance“) bezeichnet [Carval und Ferriere 2010, Schneider und Ayres 2008]. Zum anderen können Mechanismen aber auch die schädlichen Auswirkungen der Infektion reduzieren, dies bezeichnet man als Toleranz („tolerance“) [Carval und Ferriere 2010, Schneider und Ayres 2008]. Dies geht über den Toleranzbegriff in der Immunologie hinaus, der sich auf die Erkennung des Immunsystems von körpereigenen Antigenen und Stoffen bezieht, und bezieht auch Mechanismen außerhalb des Immunsystems mit ein [Schneider und Ayres 2008]. Auf der Seite des Erregers bezeichnet man das Ausmaß der krankmachenden Eigenschaften als Virulenz [Carval und Ferriere 2010]. Resistenz und Toleranz können je nach Erreger und Wirt zusammen oder gegensätzlich wirken und die Interaktion ist eine Folge der gemeinsamen Koevolution. Dabei führt jedoch die Resistenz zu einer gegensätzlichen Evolution bei Erreger und Wirt, die bei beiden Organismen dazu führt, die Mechanismen des anderen zu umgehen [Carval und Ferriere 2010]. Liegt der Schwerpunkt auf der Toleranz, führt dies zu einer gemeinsamen Evolution, die die Mechanismen bei beiden Organismen ergänzt [Schneider und Ayres 2008]. Bei vielen Reservoirwirten überwiegt die Toleranz und durch die Koevolution haben sich Erreger und Wirt durch spezifische Interaktionen auf ein Gleichgewicht eingependelt. Im Gegensatz dazu fehlen diese spezifischen Interaktionen im Fehlwirt und führen in diesem zur Krankheit als Folge der Infektion [Schneider und Ayres 2008]. Häufig ist dies darin begründet, dass die Koevolution zwischen Erreger und Fehlwirt nicht stattfand, da kein wiederholter oder dauerhafter Kontakt während der phylogenetischen Entwicklung zwischen Erreger und Fehlwirt existierte [Woolhouse und Gowtage-Sequeria 2005]. Ein Phänomen der heutigen Zeit ist, dass die Lebensweise der Menschen vermehrte Kontakte von Erregern mit neuen Wirten ermöglicht und damit die Gefahr von Interaktionen erhöht [Daszak et al. 2000]. Dies geschieht beispielsweise durch den verstärkten Transport von Tieren, die unbekannt mit Erregern infiziert sind, in naive Populationen oder nicht-endemische Gebiete [Daszak et al. 2000], aber auch durch die Erschließung neuer Gebiete, die vermehrte Interaktionen von Menschen und Wildtieren ermöglichen [Machalaba und Karesh 2017].

25,4 % bis 44 % der EID-Ereignisse sind durch Viren und Prionen ausgelöst [Jones et al. 2008]. Ein großer Anteil der Viren mit zoonotischem Potential sind dabei RNA-Viren [Kreuder Johnson et al. 2015]. Gleichzeitig besitzen Viren häufiger ein zoonotisches Potential, wenn sie bei einer hohen Anzahl an verschiedenen tierischen Wirten vorkommen [Kreuder Johnson et al. 2015]. Dies geht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einher, dass bei diesen zoonotischen Viren auch Übertragungen innerhalb der Menschenpopulation stattfinden können [Kreuder Johnson et al. 2015]. Ursache kann die erhöhte Mutationsrate von RNA-Viren sein [Randall und Griffin 2017, Woolhouse und Gowtage-

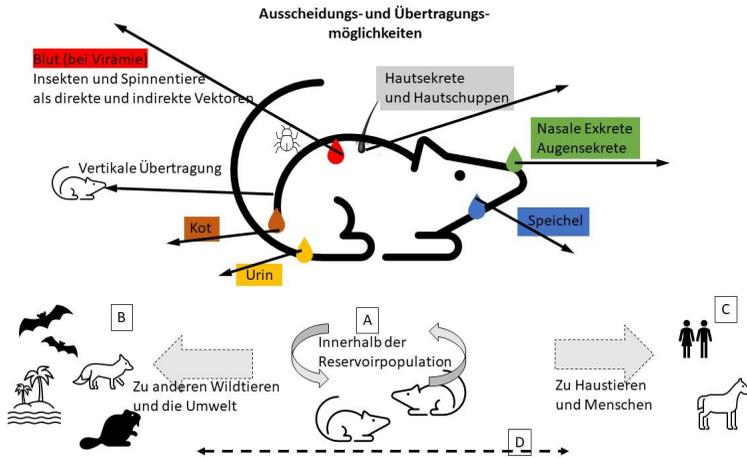
Sequeria 2005], aber auch die Tatsache, dass der Wirtswechsel bei mehreren tierischen Wirten eine Überlebensstrategie der Viren sein kann [Woolhouse und Gowtage-Sequeria 2005]. Es gibt mehrere Beispiele, bei denen Viren mit mehreren Wirten konservierte Rezeptoren mit wenigen Unterschieden zwischen den Spezies nutzen, beispielsweise das Rabiesvirus, das den nikotinergen Acetylcholinrezeptor als Eintrittspforte nutzt [Woolhouse und Gowtage-Sequeria 2005]. Aber auch eine schnelle Adaptation an neue Wirte ist bei verschiedenen Viren als Strategie beschrieben, beispielsweise bei Anpassungen des Eastern equine encephalitis virus (*Togaviridae*) an Wirbeltierwirte und Invertebratenwirte [Weaver et al. 1999]. Im Sinne des „One-Health“-Gedankens ist es daher wichtig, die Mechanismen der Wirtswechsel und Übertragungen auf den Menschen genau zu untersuchen, um künftige Pandemien aus Naturreservoirien besser zu verstehen und zu verhindern.

Die Hälfte der auftretenden Virusinfektionen durch RNA-Viren, zu denen auch BoDV-1 gehört, führen zu neurologischen Erkrankungen [Griffin 2010]. Dabei werden verschiedene Übertragungsstrategien genutzt. So breitete sich das West-Nil-Virus (*Flaviviridae*) nach der Einführung um 1999 auf den nordamerikanischen Kontinent aus, das Chikungunya-Virus (*Togaviridae*) führte 2005-2007 zu vermehrten Krankheitsfällen auf Inseln im Indischen Ozean [Griffin 2010]. Bei diesen und anderen Viren der Gruppe der „Arboviren“ findet die Übertragung über blutsaugende Insekten als Vektor statt, Voraussetzung dafür ist eine Virämie bei infizierten Wirbeltieren [Griffin 2010]. Andere Viren haben neben dem Neurotropismus einen Tropismus zu einem oder mehreren anderen Zielorganen, um die Übertragung zu ermöglichen. So kann zum Beispiel das Masernvirus (*Paramyxoviridae*), bei dem vermutet wird, dass es ursprünglich von einem tierischen Wirt stammt, aber heutzutage von Mensch zu Mensch übertragen wird, ebenfalls zu neurologischen Erkrankungen führen [Griffin 2010, Rota et al. 2016]. Es tritt über dendritische Zellen und andere Immunzellen, die den Zielrezeptor „signalling lymphocyte activation molecule“ besitzen, in den Schleimhäuten ein, vermehrt sich in den regionalen Lymphknoten, führt zu einer Virämie und befällt dann Haut und Atemwege, über die es ausgeschieden werden kann [Rota et al. 2016]. Bei Viren wie dem Rabiesvirus (*Lyssaviridae*), das vorrangig neurotrop ist [Finke und Conzelmann 2005], erfolgt der Eintritt über freie Nervenenden und der Transport innerhalb des Wirtes retrograd intraaxonal zum zentralem Nervensystem [Finke und Conzelmann 2005]. Für die Übertragung müssen diese Viren allerdings in Epithelien replizieren, um vom Wirt ausgeschieden zu werden. Ein vereinfachtes Schema der Übertragungswege findet sich in Abbildung 1.

An diesen Beispielen wird deutlich, dass selbst in der Gruppe der neurotrophen Viren vielfältige Mechanismen und Strategien zur Replikation und Übertragung beobachtet werden können. Weiterhin werden häufig gravierende Unterschiede im Infektionsverlauf zwischen Reservoirwirt und Fehlwirt beobachtet und erfordern spezielle Studien zur Untersuchung der Reservoirwirte. Da die Mehrzahl der Reservoirwirte Wildtiere sind, muss dafür entweder eine Studie „im Feld“ stattfinden oder es müssen

geeignete Modelle im Labor etabliert werden. Feldstudien bedingen meist einen einmaligen oder mehrmaligen Fang der Untersuchungsobjekte [Choate et al. 1998]. Da bei diesen Untersuchungen die Untersuchungsbedingungen nur eingeschränkt kontrolliert werden können und eine größere Varianz auftritt, wird eine größere Anzahl an Untersuchungsobjekten für eine validierte Auswertung benötigt [Choate et al. 1998, Pedersen und Babayan 2011]. Bei allen Feldstudien ist der Untersucher verantwortlich für die Unversehrtheit der untersuchten Tierpopulationen sowie des Habitats und des Lebensraumes und muss dafür unter Umständen Einschränkungen bei der Planung und Durchführung der wissenschaftlichen Studie in Kauf nehmen [Choate et al. 1998]. Tiermodelle in einer Labortierhaltung ermöglichen hingegen im größeren Maße die Kontrolle der Versuchsbedingungen [DFG 2019]. Diese unterliegen heutzutage einem strengen Hygieneregime sowie Auflagen, um im Sinne des Tierschutzes das Tierwohl im Rahmen des Versuches zu garantieren und die Auswertbarkeit und Wiederholbarkeit zu garantieren [Choate et al. 1998]. Viele Erkenntnisse wurden und werden daher an Tiermodellen gewonnen, und auch in näherer Zukunft wird die Forschung nicht auf Tiermodelle verzichten können [Genzel et al. 2020]. Aufgrund gemeinsamer Eigenschaften des Tiermodells mit anderen Populationen werden durch Analogieschlüsse diese Erkenntnisse übertragen [Sjoberg 2017]. Teilweise wird allerdings Kritik an der Übertragbarkeit der Ergebnisse geäußert [Davis 2008, Masopust et al. 2017, Pedersen und Babayan 2011, Perrin 2014, Sellers 2017, t Hart et al. 2015]. Diese Kritik bezieht sich größtenteils auf die Übertragbarkeit von Erkenntnissen von der Maus und anderen Versuchstieren auf den Menschen aufgrund der Unterschiede zwischen den Arten [Sellers 2017]. Im gleichen Maße sollte bei der Übertragung von Erkenntnissen von einer Art auf eine andere durch zusätzliche Versuche die Übertragbarkeit überprüft werden. Ein zweiter wichtiger Kritikpunkt betrifft die sauberen kontrollierten Laborbedingungen sowie die Zucht der speziellen Labortierlinien, die die beobachteten Reaktionen beispielsweise in der Immunologie beeinflussen können [Masopust et al. 2017]. Ein Weg, diese Probleme zu umgehen, können Tiermodelle sein, die in Art und Bedingungen die natürlichen Verhältnisse größtmöglich widerspiegeln. Die Haltung von Tierarten, die die Reservoir darstellen, unter Laborbedingungen kann für bestimmte Fragestellungen eine sinnvolle Vorgehensweise sein. Es muss dabei bedacht werden, dass die Haltung von wildgefangenen Tieren Anpassungen im Sinne des Tierwohls an die Standardbedingungen von Labortierhaltungen erfordern kann [Choate et al. 1998].

Abbildung 1 – Ausscheidungs- und Übertragungsmöglichkeiten von Pathogenen bei Reservoirtieren



Übertragungswege

Speichel: häufig Vermehrung des Pathogen im Mundraum und Rachen, Speicheldrüse, Lunge und oberer Atemtrakt (Husten) oder Speiseröhre und Magen (Erbrechen)

Nasale Exkrete und Augensekrete: häufig Vermehrung des Pathogen in Nase, Tränendrüse oder Lunge

Hautsekrete und Hautschuppen: häufig Vermehrung des Pathogen auf oder in der Haut (Epidermis, Haarbalge, Talgdrüsen, Schweißdrüsen)

Urin: häufig Vermehrung des Pathogen in Niere oder Harnblase

Kot: häufig Vermehrung des Pathogen in Magen und Darm oder Leber

Vertikale Übertragung: Übertragung der Pathogene im Uterus auf die Nachkommen

Blut: Übertragung bei Wunden oder durch Vektoren bei Blutnahrung, Voraussetzung ist meist eine Vermehrung des Pathogens im Blut (bei Viren Virämie); wichtigster Übertragungsweg bei den Arboviren

A) Die Übertragung über einen oder mehrere dieser Wege ermöglicht den Erhalt in der Reservoirpopulation.

B) Bei Ausscheidung des Pathogens in die Umwelt oder Kontakt zu anderen Wildtierpopulationen kann es zur Infektion weiterer Tierespezies kommen (spillover-event). Wenn sich das Pathogen dort weiter vermehren und übertragen lassen kann, kann dies zu weiteren Reservoiren führen.

C) Bei Kontakt zu Haustieren oder Menschen kann es zur Infektion kommen (spillover-event).

D) Zusätzlich zu der Übertragung von der Reservoirspezies aus kann es möglicherweise zusätzlich zu Übertragungen des Pathogens zwischen anderen Wirten kommen.

2.2 Borna Disease Virus-1

2.2.1. Geschichte der Erforschung der Bornaviren

Die Bornasche Krankheit (Borna Disease, BD) war unter dem Namen „Hitzige Kopfkrankheit“ oder „Seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung“ als Krankheit bei Pferden in Europa schon seit ca. 1700 bekannt [Dürrewald und Ludwig 1997]. Der Name Bornasche Krankheit kommt von bedeutenden Ausbrüchen bei Kavalleriepferden in der Nähe der Stadt Borna in Sachsen, die zwischen 1894-1896 auftraten. Im 20. Jahrhundert wurde durch Zwick und Seifried [Zwick und Seifried 1924, 1925] erstmals die Virusätiologie der Krankheit bewiesen. Im gleichen Zeitraum wurde das typische histologische Erscheinungsbild der Krankheit mit einer nicht-eitrigen Enzephalomyelitis beschrieben sowie die typischen intranukleären Einschlusskörperchen vom Cowdry-B-Typ, die Joest-Degenske Einschlusskörperchen genannt wurden [Joest und Degen 1909]. In den 70er/80er Jahren des 20. Jahrhunderts gelang die Anzucht des Virus in der Zellkultur [Danner und Mayr 1973] und das Virus wurde lange Zeit als einziger Vertreter und Prototyp der Familie der *Bornaviridae* in der Ordnung *Mononegavirales* eingeteilt. In Deutschland zählte die BD bis 2011 zu den meldepflichtigen Tierkrankheiten. Nachdem durch mehrere humane Enzephalitisfälle mit tödlichem Ausgang der zoonotische Charakter von BoDV-1 gezeigt wurde, besteht seit März 2020 wieder eine Meldepflicht für Bornavirusinfektionen der Säugetiere sowie für humane Bornavirusinfektionen.

Im Jahr 2007 wurden erstmalig Viren bei Papageienvögeln entdeckt, die mit der Krankheit neuropathische Drüsenmagenerweiterung der Psittazinen (Psittacine Proventricular Dilatation, auch als aviäre bornavirale Ganglioneuritis bezeichnet) assoziiert sind, und als zweite Viruspezies der Familie hinzugefügt [Honkavuori et al. 2008, Kistler et al. 2008]. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche weitere aviäre Bornaviren entdeckt [Kuhn et al. 2015], insbesondere in Papageienvögeln, Finken und Wasservögeln. 2014 wurde erstmals ein weiteres Bornavirus in Säugetieren entdeckt, das Bunthörnchen-Virus (Variegated squirrel bornavirus 1/VSBV-1). Es wurde bei exotischen Bunthörnchen (Familie Sciuridae, Unterfamilie Sciurinae), die in Deutschland gehalten wurden, nachgewiesen [Hoffmann et al. 2015]. Besitzer und Tierpfleger dieser Hörnchen erkrankten an einer tödlichen Enzephalitis, die durch das VSBV-1 ausgelöst wurde. In weiteren Studien wurde das Virus in verschiedenen in Zoos und privater Hand gehaltenen Hörnchen in Europa gefunden [Schlottau et al. 2017a, Schlottau et al. 2017b]. Das natürliche Reservoir wurde bisher noch nicht entdeckt, wird aber in Schönhörnchen in Südostasien vermutet [Cadar et al. 2021, Schulze et al. 2020]. Diese und weitere Funde von neuartigen Bornaviren in Schlangen [Hyndman et al. 2018, Stenglein et al. 2014] und Fischen [Shi et al. 2018] erforderten mehrere umfangreiche Neuklassifizierungen der Familie, die zu der folgenden Taxonomie mit den drei Gattungen Orthobornavirus, Carbovirus und Cultervirus [Afonso et al. 2016, Amarasinghe et al. 2019, Kuhn et al. 2015] führten.

2.2.2. Aktuelle Taxonomie von Bornaviren

Die Virusfamilie *Bornaviridae* gehört zur Virusordnung *Mononegavirales* [Kuhn et al. 2020]. Alle Viren der *Mononegavirales* haben ein lineares, einzelsträngiges nicht-segmentiertes RNA-Genom in negativer Polarität [Afonso et al. 2016]. Die anderen Familien, die zu den *Mononegavirales* gehören, sind *Artoviridae*, *Filoviridae*, *Lispiviridae*, *Mymonaviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Sunviridae* und *Xinmoviridae* [Afonso et al. 2016, Amarasinghe et al. 2018, Amarasinghe et al. 2019, Kuhn et al. 2020]. In diesen Familien sind Viren mit hoher humanmedizinischer oder tiermedizinischer Bedeutung unter anderem das Marburgvirus und das Ebolavirus aus der Familie der *Filoviridae*, das Hendravirus, das Nipahvirus, das Masernvirus, das Staupevirus und das Virus der atypischen Geflügelpest aus der Familie der *Paramyxoviridae* sowie das Tollwutvirus aus der Familie der *Rhabdoviridae* zu finden. Eine Übersicht dieser Taxonomie findet sich in Tabelle 1.

Zur Familie der *Bornaviridae* (Tabelle 2) gehören die Genera *Orthobornavirus*, *Carbovirus* und *Cultervirus* [Kuhn et al. 2020]. Zu dem Genus *Carbovirus* zählt man bisher 2 Spezies mit jeweils 1 Virus, die Spezies *Queensland carbovirus* mit dem jungle carpet python virus und das *Southwest carbovirus* mit dem southwest carpet python virus. Wie der Name andeutet, findet man sie bei bestimmten Teppichpythonarten [Hyndman et al. 2018]. Zu dem Genus *Cultervirus* gehört bisher nur die Spezies *Sharpbelly cultervirus* mit dem Virus Wuhan sharpbelly bornavirus, das in einem asiatischen Wildkarpfen (*Hemiculter leucisculus*) entdeckt wurde [Shi et al. 2018]. Zu dem Genus *Orthobornavirus* zählt man momentan 8 Spezies [Kuhn et al. 2020]. So wurde das *Elapid 1 bornavirus* in Reptilien gefunden [Stenglein et al. 2014]. In verschiedenen Wasservögeln wurden Viren des *Waterbird 1 bornavirus*, in Kanarienvögeln Viren des *Passeriform 1 Bornavirus* und in Finken das *Passeriform 2 bornavirus* entdeckt [Kuhn et al. 2015]. In Papageienvögeln findet man Viren des *Psittaciform 1 bornavirus* und *Psittaciform 2 bornavirus*, bei denen bestimmte Viren die neuropathische Drüsenmagendilatation der Papageien auslösen [Honkavuori et al. 2008, Kistler et al. 2008, Piepenbring et al. 2012]. In Säugetieren gelang bisher der Nachweis von 2 Spezies von Orthobornaviren. Das *Mammalian 1 bornavirus* mit dem Borna disease virus 1 (BoDV-1) als Auslöser der Bornaschen Krankheit war auch Thema der vorliegenden Dissertation. Es gibt einen equinen Fall mit einer Variante des Virus, deren Sequenz nur zu 85 % identisch zu den restlichen BoDV-1-Isolaten ist [Nowotny et al. 2000] und die als Borna disease virus 2 (BoDV-2) klassifiziert wurde [Kuhn et al. 2015]. Das *Mammalian 2 bornavirus* mit dem Bunthörnchen-Virus (Variegated squirrel bornavirus 1/VSBV-1) wurde 2014 bei exotischen Bunthörnchen (Familie Sciuridae, Unterfamilie Sciurinae), die in

Deutschland gehalten wurden, entdeckt [Hoffmann et al. 2015]. Zusätzlich gibt es einzelne Bornaviren, die aufgrund von fehlendem Virusisolat und daraus resultierendem Mangel an Daten noch nicht vollständig klassifiziert sind [Kuhn et al. 2015], dazu gehören das parrot bornavirus 6 [Weissenböck et al. 2009], das avian bornavirus MALL [Kuhn et al. 2015] und das Gaboon viper virus [Horie et al. 2010]. Das Genom der verschiedenen Virusspezies der Gattung *Orthobornavirus* ist zu ca 75 % ähnlich auf Nukleotidebene [Kuhn et al. 2015]. Ungewöhnlich an BoDV-1 ist, dass das Genom von Feldisolaten, die bei verschiedenen Ausbrüchen entdeckt werden, stark konserviert und zu über 95 % gleich auf Nukleotidebene ist [Kuhn et al. 2015], obwohl RNA-Viren durch eine höhere Fehleranfälligkeit der Polymerase üblicherweise eine hohe Mutationsrate aufweisen.

Tabelle 1 Taxonomie und Verwandtschaft der *Bornaviridae*

Bereich	Reich	Stamm (Phylum)	Subphylum	Klasse	Ordnung	Familie
<i>Riboviria</i>	<i>Orthornavirae</i>	<i>Negarnaviricota</i>	<i>Haploviricotina</i>	<i>Monjiviricetes</i>	<i>Mononegavirales</i>	<i>Artoviridae</i> <i>Bornaviridae</i> <i>Filoviridae</i> <i>Lispiviridae</i> <i>Mymonaviridae</i> <i>Nyamiviridae</i> <i>Paramyxoviridae</i> <i>Pneumoviridae</i> <i>Rhabdoviridae</i> <i>Sunviridae</i> <i>Xinnoviridae</i>

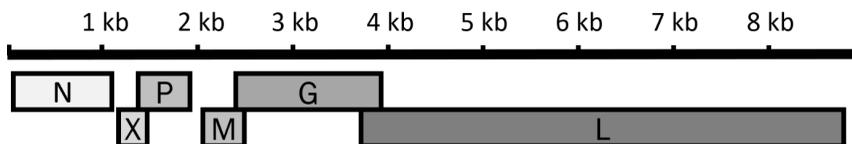
Tabelle 2 – *Bornaviridae*

Familie	Gattung (Genus)	Art (Species)	Virus mit offizieller Abkürzung	
<i>Bornaviridae</i>	<i>Carbovirus</i>	<i>Queensland carbovirus</i>	jungle carpet python virus (JCPV)	
		<i>Southwest carbovirus</i>	southwest carpet python virus (SWCPV)	
	<i>Cultervirus</i>	<i>Sharpbelly cultervirus</i>	Wuhan sharpbelly bornavirus (WHSBV)	
		<i>Elapid 1 orthobornavirus</i>	Loveridge's garter snake virus 1 (LGSV-1)	
	<i>Orthobornavirus</i>	<i>Mammalian 1 orthobornavirus</i>	<i>Borna disease virus 1</i> (BoDV-1)	Borna disease virus 1 (BoDV-1)
			<i>Borna disease virus 2</i> (BoDV-2)	Borna disease virus 2 (BoDV-2)
		<i>Mammalian 2 orthobornavirus</i>	variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1)	
		<i>Passeriform 1 orthobornavirus</i>	<i>canary bornavirus 1</i> (CnBV-1)	canary bornavirus 1 (CnBV-1)
			<i>canary bornavirus 2</i> (CnBV-2)	canary bornavirus 2 (CnBV-2)
		<i>canary bornavirus 3</i> (CnBV-3)	canary bornavirus 3 (CnBV-3)	
		<i>Passeriform 2 orthobornavirus</i>	estrilid finch bornavirus 1 (EsBV-1)	
		<i>Psittaciform 1 orthobornavirus</i>	<i>parrot bornavirus 1</i> (PaBV-1)	parrot bornavirus 1 (PaBV-1)
			<i>parrot bornavirus 2</i> (PaBV-2)	parrot bornavirus 2 (PaBV-2)
			<i>parrot bornavirus 3</i> (PaBV-3)	parrot bornavirus 3 (PaBV-3)
	<i>parrot bornavirus 4</i> (PaBV-4)		parrot bornavirus 4 (PaBV-4)	
	<i>Psittaciform 2 orthobornavirus</i>	<i>parrot bornavirus 7</i> (PaBV-7)	parrot bornavirus 7 (PaBV-7)	
<i>parrot bornavirus 5</i> (PaBV-5)		parrot bornavirus 5 (PaBV-5)		
<i>Waterbird 1 orthobornavirus</i>	<i>aquatic bird bornavirus 1</i> (ABBV-1)	aquatic bird bornavirus 1 (ABBV-1)		
	<i>aquatic bird bornavirus 2</i> (ABBV-2)	aquatic bird bornavirus 2 (ABBV-2)		

2.2.3. Genomorganisation von Bornaviren

Bornaviren sind, wie zuvor bereits erwähnt, RNA-Viren mit einem einzelsträngigen, nicht segmentiertem RNA-Genom. Die folgenden Darstellungen beziehen sich auf BoDV-1 als am besten untersuchten Vertreter der Familie und Gegenstand dieser Dissertation. BoDV-1 formt sphärische behüllte Virionen mit einer Größe von 80-100nm [Danner und Mayr 1979, Kohno et al. 1999, Richt et al. 1993]. Im Gegensatz zu anderen RNA-Viren der Ordnung *Mononegavirales* findet die Replikation und Transkription im Nukleus der Wirtszellen statt [Herden et al. 2013, Tizard et al. 2016]. Das Genom von ungefähr 8,9 Kilobasen-Länge umfasst 3 Transkriptionseinheiten und 6 offene Leserahmen, die für mindestens 6 verschiedene Proteine kodieren. Die offenen Leserahmen überlappen sich dabei teilweise. Nicht-kodierende intergenische Regionen fehlen, am 3' und 5' Ende finden sich allerdings kurze nicht-kodierende Sequenzen. Zusätzlich nutzen Orthobornaviren als zusätzliche Möglichkeit der Expressionsmodulation das Überlesen von Transkriptionsterminationssignalen und alternatives Spleißen [Übersicht in Herden et al. 2013, Kojima et al. 2019, Tomonaga et al. 2002]. Die dabei entstehenden Proteine sind: aus der ersten Transkriptionseinheit das Nukleoprotein N in zwei Isoformen (p40 und p38), aus der zweiten Transkriptionseinheit das Phosphoprotein P (p24) und das Nicht-Strukturprotein X (p10) und aus der dritten Transkriptionseinheit das Matrixprotein M (p16), das Glykoprotein G (p57, glykosyliert gp94), und die RNA-abhängige RNA-Polymerase L. Die Reihenfolge ist in Abbildung 2 zu sehen.

Abbildung 2 – Genomorganisation von BoDV-1



Modifiziert nach Herden et al. 2013

2.2.4. Virusproteine von BoDV-1 und mögliche Persistenzmechanismen

Das Nukleoprotein N stellt 50 % der Proteinmasse in den BoDV-1-Partikeln [Pyper und Clements 1994]. Die 40 kD große Isoform von N besitzt eine kurze basische Aminosäuresequenz als „nuclear localization signal“ (NLS), die für den Transport in den Nukleus wichtig ist [Kobayashi et al. 1998]. Dieses NLS fehlt bei der 38 kD großen Isoform von N. Interessanterweise scheinen Unterschiede in diesem NLS zwischen verschiedenen *Orthobornaviridae* zur Wirtsspezifität beizutragen [Komorizono et al. 2020]. Beide Isoformen von N tragen zusätzlich ein nuclear export signal, welches das Ausschleusen aus dem Nukleus vermitteln kann [Kobayashi et al. 2001] und das durch das

Phosphoprotein P maskiert werden kann [Kobayashi et al. 2001, Yanai et al. 2017]. Daneben kann N zusammen mit dem Phosphoprotein, der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und Virus-RNA helikale Ribonukleoproteinkomplexe (RNP) bilden, die alleine schon infektiös sein können [Cubitt und de la Torre 1994]. RNP sind unabdingbar für Transkription und Replikation [Richt et al. 2007]. P ist dabei ein Cofaktor der viralen Polymerase [Schneider et al. 2003, Schwemmle et al. 1997]. Es wurde gezeigt, dass das Verhältnis von Nukleoprotein und Phosphoprotein die Funktion der Polymerase moduliert und dies in der akuten und chronischen Phase der Infektion unterschiedlich ist [Perez et al. 2003, Schneider et al. 2004, Schneider et al. 2003]. Zusätzlich trägt auch P ein NLS und ist daher wahrscheinlich beim Transport in den Nukleus beteiligt [Schwemmle et al. 1998]. Das Regulationsprotein X bindet an P und reguliert so ebenfalls die Polymeraseaktivität [Mayer et al. 2005, Schneider et al. 2003]. Das Matrixprotein M interagiert mit den RNP [Honda und Tomonaga 2013, Mayer et al. 2005], moduliert aber nicht die Polymeraseaktivität [Chase et al. 2007]. Daneben hat es als stützender Bestandteil der Virushülle eine Funktion beim Zusammenbau und Budding der Virionen [Kraus et al. 2005, Kraus et al. 2001]. Das virale Glykoprotein G ist Bestandteil der Hülle des Virus [Kohno et al. 1999]. Bei der Bildung der Viruspartikel ist eine Spaltung des Glykoproteins durch Furin, ein Enzym der Wirtszelle, in zwei Untereinheiten nötig, GP-N und GP-C [Eickmann et al. 2005, Gonzalez-Dunia et al. 1998, Richt et al. 1998]. Die initiale Infektion neuer Zielzellen wird durch diese beiden Untereinheiten vermittelt. GP-N bindet an einen oder mehrere unbekannte Zellrezeptoren, das zur Clathrin-vermittelten energieabhängigen Endozytose führt [Briese et al. 1994, Gonzalez-Dunia et al. 1998, Lennartz et al. 2016]. GP-C vermittelt die nächsten Schritte, den Übergang in intrazelluläre Vesikel und die pH-abhängige Fusion mit der Membran von Endosomen [Eickmann et al. 2005, Gonzalez-Dunia et al. 1998]. Daneben werden als weitere Übertragungswege zwischen Zellen die Bildung von freien infektiösen Partikeln sowie eine Rezeptor-unabhängige Übertragung von unbehüllten RNP-Komplexen über zelluläre Verbindungen beschrieben [Cubitt und de la Torre 1994, Gosztonyi et al. 1993], denen aber laut aktuelleren Studien nur eine geringe Rolle zugeschrieben wird [Lennartz et al. 2016, Porombka 2006]. Die Verbindung von RNP mit Chromosomen führt zu einer zusätzlichen Verbreitung während der Mitose [Bonnaud et al. 2015, Matsumoto et al. 2012].

Die Expression der verschiedenen Virusproteine unterscheidet sich im Verlauf der Infektion. Auf Transkriptionsebene konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass BoDV-1-N-spezifische mRNA drei Wochen nach der Infektion die höchsten Expressionslevel zeigte, die im weiteren Verlauf geringer wurden [Porombka 2006, Werner-Keiřs et al. 2008]. Die Expression von G blieb weiter auf gleichem niedrigen Niveau [Porombka 2006]. Gleiche Verhältnisse wurden in BoDV-1-infizierten primären Astrozytenkulturen beobachtet [Kehr 2016]. Daraus wurde gefolgert, dass in frühen Phasen mit einem hohen Anteil von N die Transkription im Vordergrund steht, während in der chronischen Phase die Replikation eine zunehmende Rolle spielt [Porombka 2006, Porombka et al. 2008].

Die persistente BoDV-1-Infektion der Zellen verursacht typischerweise keine Zytolyse [Carbone et al. 1987, Carbone et al. 1991, Morales et al. 1988]. Durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen wird diese Persistenz in der Zelle ermöglicht. Durch vielfältige Interaktionen der Virusproteine mit den zelleigenen Signalwegen werden so als wichtige Grundpfeiler der Persistenz die Transkription und Replikation auf einem niedrigen Niveau gehalten, der Zelltod durch Apoptose oder Lyse der Wirtszelle verhindert und die Erkennung durch das körpereigene Immunsystem erschwert. Ausführliche Einzelheiten wurden in Tomonaga et al. [2002], Planz et al. [2009] und Tizard et al. [2016] zusammengefasst. Für die Regulation der Transkription und Replikation sind beispielsweise die oben erwähnten Interaktionen der viralen Proteine N, P und X [Mayer et al. 2005, Perez et al. 2003, Schneider et al. 2004], aber auch die Nutzung von alternativem Spleißen und dem Überlesen von Transkriptionsterminationssignalen verantwortlich [Herden et al. 2013, Kojima et al. 2019, Tomonaga et al. 2002]. Zusätzlich interagiert BoDV-1 mit den wirtseigenen Histonen und deren Acetylierung und führt dabei durch veränderte epigenetische Signale zu einer reduzierten Replikation des Virus, trägt aber gleichzeitig zu einer erhöhten Persistenz bei [Bonnaud et al. 2015, Liu et al. 2014, Matsumoto et al. 2012]. Daneben wird die Apoptose durch verschiedene Mechanismen verhindert. Beispielsweise verhindert eine Interaktion von BoDV-1-X mit den Mitochondrien eine Aktivierung der Caspase-abhängigen Apoptose [Honda und Tomonaga 2013, Poenisch et al. 2009] und die Interaktion von BoDV-1-P mit HMGB-1 (High-motility-group Protein B1) reduziert die Aktivität von p53 [Gonzalez-Dunia et al. 2005, Planz et al. 2009]. Ebenso interagieren BoDV-1-Proteine an verschiedenen Stellen mit der Phosphokinase C, dem RAF-MEK-Signalweg und dem MAP-Kinase-Signalweg, die an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind [Planz et al. 2009]. Interaktionen mit dem NFκB-Signalweg sowie der intrazellulären Interferon-1-Expression [Bourteele et al. 2005, Planz et al. 2009, Unterstab et al. 2005] tragen dazu bei, Apoptosen zu verhindern sowie die Immunabwehr zu umgehen. Weitere Mechanismen, das Immunsystem zu umgehen, beinhalten die posttranskriptionale Kürzung von viraler genomischer RNA, damit die „Pattern Recognition“ Rezeptoren (PRR) und RIG-1-Systeme nicht aktiviert werden [Habjan et al. 2008] sowie die Nutzung der zellulären RNA-spezifischen Adenosindeaminase, um die virale RNA als zelleigene RNA zu tarnen [Yanai et al. 2020]. Diese und andere komplexe Mechanismen tragen zusammen mit dem Neurotropismus von BoDV-1 mit intraaxonalem Transport zu der Persistenz im Wirt bei.

2.2.5. Endogene Elemente von Bornaviren

Im Genom verschiedener Tierspezies/Säugetiere wurden DNA-Sequenzen entdeckt, die in der Basenabfolge eine Ähnlichkeit zu den Genomen der Bornaviren aufweisen. Diese Sequenzen werden im Allgemeinen als endogene virale Sequenzen oder endogene virale Elemente (EVE) bezeichnet, bei Bornaviren im speziellen als endogene Bornavirus-ähnliche Elemente (endogeneous borna-like elements, EBL). Das Phänomen kennt man auch bei anderen Virusfamilien, insbesondere bei

Retroviren [Jern und Coffin 2008]. Bei Retroviren ist das Umschreiben von viraler RNA in DNA mittels der reversen Transkriptase ein Bestandteil der viralen Transkriptions- und Replikationsstrategie. Diese virale DNA kann an verschiedenen Stellen in das Genom des Wirts integriert werden, wobei eine Präferenz der Retroviren für bestimmte Genomabschnitte festgestellt wurde [Lewinski et al. 2006]. Geschieht diese Integration in Keimzellen des Wirts, kann das veränderte Genom mit der viralen Sequenz an die Nachkommen des Wirts weitergegeben werden. Endogene virale Elemente in Spezies werden als Beleg gesehen, dass während der phylogenetischen Entwicklung ein Kontakt mit den Herkunftsviren sowie der Prozess der Koevolution mit Anpassungen bei Wirt und Virus stattgefunden hat. Dabei haben diese Elemente zum Teil auch verschiedene Funktionen für das Virus und den Wirt. So werden beispielsweise verschiedenen endogenen retroviralen Elemente physiologische Funktionen in der angeborenen und erworbenen Immunantwort zugesprochen, aber auch in anderen physiologischen Prozessen im Bereich der Erhaltung der Pluripotenz in pluripotenten Geweben oder Stammzellen [Parrish und Tomonaga 2016]. Ein häufig zitiertes Beispiel ist das Protein Syncytin, das eine wichtige Rolle bei der Einnistung von Keimzellen in die Plazenta spielt und dessen Gen auf ein endogenes retrovirales Element zurückgeführt werden kann [Katzourakis und Gifford 2010, Mi et al. 2000]. Neben diesen positiven oder sogar lebenswichtigen Funktionen von verschiedenen retroviralen Elementen ist aber auch beschrieben, dass EVE negative Auswirkungen haben können. So ist bei einzelnen endogenen retroviralen Elementen beschrieben, dass eine erhöhte Expression mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit verbunden ist, einen Tumor zu entwickeln [Chen et al. 2019, Xue et al. 2020].

Endogene bornavirale Elemente (EBL) wurden im Genom vieler verschiedener Tierarten entdeckt, vor allem in Säugetieren wie Menschen und anderen Primaten, Fledermäusen, Nagetieren und Elefanten (Ordnung: Afrotheria), aber auch in Beuteltieren, Vögeln, Reptilien, Fischen und in Einzelfällen in einer Insektenart und einer Spinnenart [Belyi et al. 2010, Cui und Wang 2015, Gilbert et al. 2014, Horie et al. 2010, Horie et al. 2013, Hyndman et al. 2018, Katzourakis und Gifford 2010, Mukai et al. 2018]. Dabei wurden Elemente gefunden, die Ähnlichkeit zu den bornaviralen Genen für das Nukleoprotein N, das Matrixprotein M, das Glykoprotein G und die virale Polymerase L besitzen, endogene Elemente mit entsprechenden Sequenzen zu dem Phosphoprotein P und dem Regulationsprotein X wurden bisher nicht gefunden. EBL haben 30-50% Ähnlichkeit auf Aminosäurelevel zu Genomen der heutigen Bornaviren [Belyi et al. 2010]. Die Integrationsereignisse sollen vor mindestens 40 Millionen Jahren stattgefunden haben [Belyi et al. 2010, Horie et al. 2016, Horie und Tomonaga 2019]. Da die Bandbreite der Tierarten mit EBL deutlich größer ist als die heute bekannten Wirte von Bornaviren, deutet dies darauf hin, dass zur Zeit der Integration eine größere Bandbreite von Wirten von Bornavirusinfektionen betroffen war und gleichzeitig eine größere Anzahl an noch unbekanntem Bornaviren existiert haben [Horie und Tomonaga 2019]. Obwohl die Funktion der meisten EBL bisher unbekannt ist, wird bei

manchen über eine bestimmte Funktion diskutiert [Horie 2017]. So gibt es EBLs, die als DNA-Element zum Beispiel als Promoter oder Verstärker die Transkription anderer Gene beeinflussen können. Über die Entstehung von sogenannter piRNA [Parrish et al. 2015] oder long-noncoding RNA könnte über die Regulation von Genen oder direkte Interaktion mit Fremd-RNA die Abwehr der Zelle verändert werden [Sofuku et al. 2015]. Und schließlich kann es über EBL, die in Proteine umgeschrieben werden, direkt zu einer Veränderung der Immunantwort der Zelle kommen [Myers et al. 2016]. Dabei ist zum einen vorstellbar, dass durch endogene und damit körpereigene virusähnliche Proteine eine Immuntoleranz ausgebildet wird. Zum anderen ist vorstellbar und wurde auch bereits bei einem EBL, das bei gestreiften Baumhörnchen vorkommt, gezeigt [Fujino et al. 2014], dass das vom EBL kodierte Protein die Infektion mit exogenen Bornaviren beeinflusst und hemmt. Aufgrund dieser vielfältigen Möglichkeiten, durch die EBL mit dem Organismus und insbesondere der Immunabwehr interagieren können, wird vermutet, dass sie auch eine Rolle in den Reservoirwirten der Bornaviren spielen könnten.

2.2.6. BoDV-1-Infektionen als Ursache der Bornaschen Krankheit

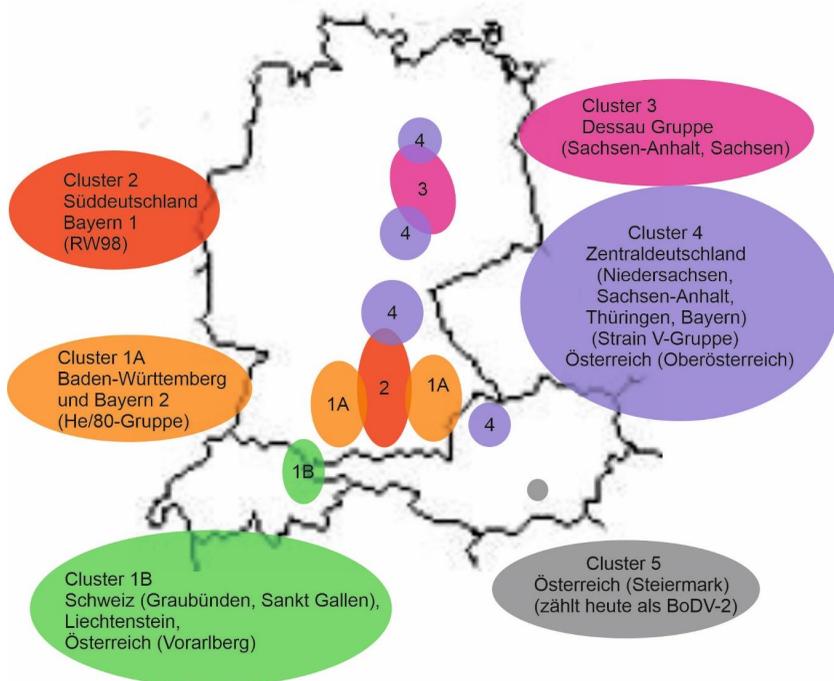
Die Bornasche Krankheit ist seit über dreihundert Jahren als neurologische Erkrankung von Pferden und Schafen bekannt (siehe Kapitel 2.2.1 „Geschichte der Erforschung der Bornaviren“) und beruht auf einer durch die BoDV-1-Infektion ausgelösten, T-Zell-vermittelten, nicht-eitrigen Meningoenzephalitis. 2017 wurde gezeigt, dass eine BoDV-1-Infektion auch beim Menschen zu einer tödlichen Enzephalitis führen kann [Korn et al. 2018, Schlottau et al. 2018].

2.2.6.1. Epidemiologie der Bornaschen Krankheit

Bis in die 60er Jahre des 20. Jahrhunderts trat die Bornasche Krankheit in periodischen Epidemien auf, seitdem ist sie mehr eine sporadisch und endemisch auftretende Krankheit [Dürwald et al. 2006]. Auch wenn es eine Seroprävalenz von 11,5 % bei Pferden in Deutschland gibt, ist die Seroprävalenz in Endemiegebieten mit 22 % höher und liegt in Pferdeställen, in denen Tiere an der Bornaschen Krankheit erkrankt sind, bei über 50 % [Grabner et al. 2002, Herzog et al. 1994]. Endemische Gebiete sind Regionen in Bayern, Sachsen-Anhalt und Sachsen sowie in Baden-Württemberg, Niedersachsen, Thüringen, Hessen und Brandenburg, in der Schweiz, in Lichtenstein [Kolodziejek et al. 2005] sowie in Vorarlberg und Oberösterreich [Weissenböck et al. 2017]. Durch den zunehmenden Pferdetransport und Verkauf auch über Staatsgrenzen hinweg gibt es einzelne Berichte von Bornascher Krankheit außerhalb dieser Gebiete, beispielsweise in England [Priestnall et al. 2011]. Da dies aber meist Einzelfälle mit vermutetem Import aus endemischen Gebieten sind oder auf serologischen Nachweisen beruhen [Bjornsdottir et al. 2013, Kinnunen et al. 2007], liegen alle bestätigten endemischen Gebiete innerhalb Zentraleuropas [Dürwald et al. 2007, Kolodziejek et al. 2005].

Feldisolatate von BoDV-1 können unabhängig von der Tierart, aus der sie isoliert wurden, den geographischen endemischen Gegenden zugeordnet werden. Hier zeigen sich 5 verschiedene Cluster (Abbildung 3) [Kolodziejek et al. 2005]. Deswegen ist zu vermuten, dass das Virus nicht von einem erkrankten Tier zum nächsten übertragen wird, sondern ein ortsgebundenes Reservoir außerhalb der erkrankten Tiere vorliegt.

Abbildung 3 – Endemiegebiete der Bornaschen Krankheit



Modifiziert nach Ebinger et al. 2021 und Kolodziejek et al. 2005

Die Inzidenz der Bornaschen Krankheit zeigt in verschiedenen Untersuchungen eine Häufung in Frühjahr und Sommer [Dürwald et al. 2006, Reichelt 2009]. Diese jahreszeitliche Schwankung ist unabhängig von Gegend und Tierart [Dürwald et al. 2006]. Da die Inkubationszeit auf mehrere Monate geschätzt wird [Herden et al. 2013, Katz et al. 1998], deutet das auf eine erhöhte Infektionsgefahr im Herbst und Winter hin. Zusätzlich zeigt sich eine Häufung der Krankheitsfälle in bestimmten Jahren, ebenso unabhängig von Gegend und Tierart [Dürwald et al. 2006]. Dies deutet auf ein Reservoir des Erregers hin, das zum einen ortsgebunden an die endemischen Gebiete ist, zum anderen aber

ortsungebunden Schwankungen zwischen den Jahren unterliegt. Ein oder mehrere Wildtierreservoirare würden diese epidemiologischen Besonderheiten der Bornaschen Krankheit erklären [Dürrewald et al. 2006].

2.2.6.2. Mögliche Reservoirare von BoDV-1

Da BoDV-1-Infektionen in einer Vielzahl von Tierarten festgestellt wurden, sind ebenso viele Tierarten als Reservoir vorstellbar. Da allerdings bei der klassischen Bornaschen Krankheit beim Fehlwirt keine Virusausscheidung beobachtet wird [Grabner et al. 2002, Herden et al. 2013], sind insbesondere Wildtiere interessant, bei denen beobachtete Besonderheiten der BoDV-1-Infektion eine Reservoirfunktion wahrscheinlich macht.

In der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) wurden in den letzten Jahren natürliche BoDV-1-Infektionen in verschiedenen Endemiegebieten gefunden. Zuerst wurden in einem endemischen Gebiet in der Schweiz mehrere infizierte Feldspitzmäuse entdeckt [Hilbe et al. 2006, Puorger et al. 2010]. In der Folge wurden auch in weiteren Gebieten in Bayern [Bourg et al. 2013], Sachsen-Anhalt und Sachsen [Dürrewald et al. 2014] sowie in Österreich infizierte Feldspitzmäuse [Weissenböck et al. 2017] nachgewiesen. Neben direktem Virusnachweis wurden auch virusspezifische Serumantikörper bei Feldspitzmäusen in endemischen Gebieten gefunden [Bourg et al. 2013], sodass die Feldspitzmaus als ein Reservoir für BoDV-1 angesehen werden kann. Auch andere Spitzmausarten wurden daraufhin verstärkt untersucht. Dabei fand man in einer Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) in Österreich BoDV-1 RNA im zentralen Nervensystem [Weissenböck et al. 2017]. Virusspezifische Serumantikörper gegen BoDV-1 fanden sich weiterhin bei zwei Hausspitzmäusen (*Crocidura russula*), zwei Waldspitzmäusen (*Sorex araneus*) und einer Zwergspitzmaus (*Sorex minutus*) aus endemischen Gebieten [Bourg 2018]. Daher erscheint es möglich, dass auch andere Spitzmausarten in endemischen Gebieten ein Reservoir für BoDV-1 darstellen könnten.

Eine Besonderheit der Infektion bei der Feldspitzmaus im Vergleich zu dem Verlauf bei Haussäugetieren ist, dass sich die Virusinfektion nicht auf das Nervensystem beschränkt, sondern sich das Virus disseminiert im gesamten Tierkörper auch in epithelialen und mesenchymalen Zellen verschiedener Organe nachweisen lässt [Bourg et al. 2013, Dürrewald et al. 2014, Puorger et al. 2010]. Dies ähnelt der experimentellen BoDV-1-Infektion von neonatalen immuntoleranten Lewisratten [Herzog et al. 1984, Morales 1988].

Bei experimentell mit BoDV-1 infizierten Lewisratten ist der Unterschied im Verlauf der Infektion in Abhängigkeit des Alters und des Immunstatus zum Zeitpunkt der Infektion schon lange bekannt [Herzog et al. 1984, Narayan et al. 1983, Pletnikov et al. 1999, Rubin et al. 1999]. Adulte Lewisratten zeigen bei experimenteller Infektion unabhängig von der Infektionsroute einen biphasischen

Krankheitsverlauf mit nicht-eitriger Enzephalitis und typischen neurologischen Symptomen [Narayan et al. 1983]. Dies ähnelt dem Krankheitsverlauf der Bornaschen Krankheit bei Fehlwirten wie dem Pferd oder auch den humanen Infektionen [Herden et al. 2013]. Infiziert man hingegen Lewisratten in den ersten Lebensstagen, führt dies zu einer Ausbreitung des Virus im Körper, aber nicht zu einer Entzündung oder zu Symptomen [Herzog et al. 1984]. Eine Enzephalitis findet man nicht, allerdings können transiente Zytokinerhöhungen sowie Veränderungen der Neuroarchitektur mit Verlust von Neuronen im Hippocampus und damit einhergehende Lern- und Verhaltensstörungen beobachtet werden [Pletnikov et al. 1999, Rubin et al. 1999, Weissenböck et al. 2000]. Das Virus kann zusätzlich zum Nervensystem auch in Epithelien von verschiedenen Organen wie Niere, Lunge und Harnblase nachgewiesen werden [Herzog et al. 1984, Morales 1988]. Neonatal infizierte Lewisratten scheiden nach 30 Tagen nach der intrazerebralen Infektion infektiöse Viren im Urin aus [Herzog et al. 1984, Morales et al. 1988]. Damit zeigen sie ein wichtiges Kriterium, um als Überträger von BoDV-1 fungieren zu können. Da zum damaligen Zeitpunkt alle anderen Tiere, die mit BoDV-1 infiziert werden konnten, aufgrund fehlender Ausscheidung sich als Sackgassenwirte erwiesen hatten, waren Ratten die Hauptverdächtigen als Wildtierreservoir [Sauder und Staeheli 2003]. In Freilanduntersuchungen konnten allerdings keine natürlichen BoDV-1-Infektionen bei Ratten gefunden werden [Kolodziejek et al. 2005, Vahlenkamp et al. 2002]. Da sich die Verteilung des Virus bei experimentell infizierten neonatalen Lewisratten und natürlich infizierten Feldspitzmäusen ähnelt, wurde bereits in ersten Publikationen vermutet, dass auch Feldspitzmäuse das Virus ausscheiden können und damit als Überträger fungieren können [Bourg et al. 2013, Dürrwald et al. 2014, Puorger et al. 2010].

Aufgrund des Nachweises von BoDV-1-Serumantikörpern in Rötelmäusen in Schweden [Kinnunen et al. 2007] wurden Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) intrazerebral mit BoDV-1 infiziert [Kinnunen et al. 2011]. Die infizierten Rötelmäuse zeigten auch eine Virusausbreitung sowohl im Nervensystem als auch in den peripheren Organen. Aufgrund dieses Verteilungsmusters könnten Rötelmäuse daher auch als Virusüberträger in Frage kommen. Allerdings wurden bei weiteren Freilanduntersuchungen in anderen Gebieten weder weitere serologisch-positive Rötelmäuse noch BoDV-1 in Rötelmäusen nachgewiesen [Bourg 2018, Bourg et al. 2013, Dürrwald et al. 2006]. Da die initial serologisch-positiven Rötelmäuse nicht aus den Endemiegebieten der Bornaschen Krankheit stammen, ist auch eine Infektion mit anderen, noch unbekanntem Bornaviren nicht ausgeschlossen.

Verschiedene andere Wildtiere, die in endemischen Gebieten vorkommen, wurden auch bereits auf BoDV-1-Infektionen untersucht, um weitere potenzielle Reservoirs zu finden. Dauphin et al. wiesen mittels RT-PCR zwei BoDV-1-positive Füchse nach [Dauphin et al. 2002], diese Funde sind aber umstritten, da die Ergebnisse in anderen Laboren nicht wiederholt werden konnten [Dauphin et al. 2002] und es keine weiteren Hinweise auf ein endemisches Gebiet in Frankreich gibt. Bourg et al. entdeckten in 37 von 225 Füchsen BoDV-1-spezifische Serumantikörper [Bourg et al. 2016]. Da diese

seropositiven Tiere aber sowohl in endemischen als auch nicht-endemischen Gebieten auftraten, ist eine Kreuzreaktion mit anderen, noch unbekanntem Bornaviren als Ursache vorstellbar. Dürrwald untersuchte in einer Studie Katzen, Hunde, Füchse, Dachse, Marder, Hasen, Eichhörnchen, Wildschweine und Hausmäuse und fand keine infizierten Wildtiere [Kolodziejek et al. 2005]. Weitere Kleinsäuger wurden von Bourg untersucht, dabei wurden virusspezifische Serumantikörper bei zwei Hausmäusen (*Mus musculus*), einer Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*), einer Zwergmaus (*Musculus minutus*) und einer Wühlmaus (*Microtus species*) gefunden [Bourg 2018]. Zusammengefasst kann man sagen, dass es bei verschiedenen Wildtieren zusätzlich zu der Feldspitzmaus Hinweise gibt, dass sie Kontakt zu Bornaviren haben könnten, durch das Fehlen weiterer BoDV-1-Virusnachweise ein Beleg für ein Reservoir aber nicht gegeben ist.

Vögel sind für manche Viren wichtige Reservoirs [Dürrwald et al. 2006, Nabi et al. 2021], beispielsweise spielen sie eine wichtige Rolle als Reservoir der aviären Influenza [Berg et al. 2001, Nabi et al. 2021]. Obwohl die hohe Mobilität von fliegenden Lebewesen dem streng endemischen Charakter der BD widerspricht, könnten durch zusätzliche ortsgebundene Faktoren wie beispielsweise Präferenzen bei Nestern auch bei einem Vogelreservoir die beobachteten endemischen Gebiete erklärt werden. Vor der Entdeckung von vogelspezifischen Bornaviren wurden Wildvögel wie Enten auf BoDV-1 mit einzelnen positiven Nachweisen untersucht [Berg et al. 2001]. Diese Funde sollten mit dem heutigen Wissen über Orthobornaviren bei Wasservögeln erneut überprüft werden. Auch BoDV-1-spezifische Antikörper bei Tieren außerhalb der endemischen Gebiete können auf eine Kreuzreaktion mit aviären Bornaviren zurückgehen [Bjornsdottir et al. 2013]. Die gleichen Überlegungen zur Mobilität gelten neben Vögeln auch für Fledermäuse. Da diese fliegenden Säugetiere aber neben Nagetieren die Tiergruppe darstellen, die am häufigsten als Virusreservoir fungiert [Luis et al. 2013], wird auf die Beziehung zu Bornaviren später genauer eingegangen (siehe Kapitel 2.4.4 „Bisherige Kenntnisse zu Bornavirusinfektionen bei Fledermäusen“).

Neben dem einfachen Szenario, dass das Reservoir von BoDV-1 in der Population einer Wildtierart liegt, innerhalb der es durch Infektionen und direkte Übertragung aufrechterhalten wird und es durch direkten Kontakt zu anderen Tieren zu Infektionen von Fehlwirten kommt, kann man sich auch kompliziertere Szenarien mit mehreren Wirten und belebten und unbelebten Vektoren vorstellen. Die ungewöhnliche Stabilität des Genoms könnte auf die Beteiligung von mehreren Wirten hinweisen [Dürrwald et al. 2006]. Bei Arboviren sind blutsaugende Insekten als beliebter Vektor bekannt und unabdingbar für die Replikation der Viren. Allerdings sind solche komplizierteren Infektionsketten bei anderen Viren der Gruppe *Mononegavirales* nicht bekannt. Theoretisch besteht bei BoDV-1 die Möglichkeit, dass Insekten, Spinnentiere oder andere Gliedertiere eine Rolle als Zwischenwirt oder Vektor spielen. In einzelnen untersuchten Regenwürmern aus Ställen mit BD konnte kein Virus nachgewiesen werden [Dürrwald et al. 2014]. Eine gezielte perorale Infektion von Zecken (*Ixodes*

ricinus) zeigte, dass das Virus in ihnen innerhalb von 15 Tagen nicht mehr nachweisbar war, es keinen Hinweis auf eine Replikation in Zecken gab und sie daher wahrscheinlich auch keine Rolle bei der Übertragung spielen [Schindler 2004]. Schon in frühen Infektionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass mit Blut von infizierten Tieren (Kaninchen, Pferde, Schafe) das Virus nicht übertragen werden kann [Zwick et al. 1927, Zwick und Witte 1931]. Eine Übertragung durch blutsaugende Insekten ist daher unwahrscheinlich. Bei diesen Versuchen wurden Fehlwirte als Virusquelle verwendet, bei denen das Virus den starken Neurotropismus zeigt und die keine Virämie aufweisen. Auch bei Reservoirwirten gibt es bisher keine Belege für eine Virämie. Der Tropismus des Virus zu Hautanhangsgebilden wie Haarwurzeln oder Talgdrüsen sowie dem Epithel könnte aber komplexere Übertragungsketten mit Beteiligung von Hautparasiten möglich machen. Solche Übertragungswege sind selten bei anderen Viren beschrieben, bei SARS-CoV-2 wird beispielsweise diskutiert, ob eine Übertragung durch humane Ektoparasiten (*Demodex sp.*) ein Faktor sein kann [Tatu et al. 2021].

2.2.6.3. Wirtsspektrum der Bornaschen Krankheit

Die höchste Inzidenz an Krankheitsfällen der Bornaschen Krankheit findet man bei Pferden. Zwischen 1896 und 1940 sind beispielsweise im Bundesland Sachsen 16600 Pferde an der Bornaschen Krankheit verstorben. Die Krankheitsausbrüche zeigten meist einen epidemischen Charakter [Dürrwald et al. 2006]. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts nahm die Inzidenz pro Jahr immer mehr ab [Dürrwald et al. 2006]. Im Bundesland Bayern gab es zwischen 1990 und 2008 451 gemeldete Krankheitsfälle [Reichelt 2009].

Neben Pferden kam die Krankheit gehäuft bei Schafen vor [Dürrwald et al. 2006, Vahlenkamp et al. 2002]. Obwohl im 20. Jahrhundert bei Schafen im Gegensatz zu Pferden die Tierzahl in endemischen Gebieten auf gleichem Niveau blieb und sich nicht verringerte, konnte auch hier eine Abnahme der Inzidenz beobachtet werden [Dürrwald et al. 2006]. Daneben gibt es einzelne Fallberichte von Eseln, Ziegen [Dürrwald et al. 2006], Rindern [Caplazi et al. 1994] und Neuweltkameliden [Dürrwald et al. 2006, Jacobsen et al. 2010, Malbon et al. 2021, Schulze et al. 2020], sowie Kaninchen, Hirschen und Zootieren (Faultier, Zwergnilpferd) [Dürrwald et al. 2006]. Bei Katzen wird BoDV-1 im Zusammenhang mit der sogenannten „Staggering Disease“ beschrieben, die Ätiologie ist aber aufgrund der fehlenden Zugehörigkeit zu endemischen Gebieten umstritten [Lundgren et al. 1995, Wensman et al. 2014]. Insgesamt scheint die Krankheit sporadisch bei vielen Säugetieren auftreten zu können. Ob die Häufung bei Pferden und Schafen aufgrund einer besonderen Empfänglichkeit gegenüber dem Virus oder aufgrund einer stärkeren Exposition mit dem Virus zusammenhängt, ist nicht bekannt.

2.2.6.4. Symptome der Bornaschen Krankheit

Die Bornasche Krankheit kann akut bis subakut verlaufen; selten treten chronische Verläufe auf. Durch das große Wirtsspektrum kann die Ausprägung der Krankheit zwischen verschiedenen Spezies variieren, am besten dokumentiert sind die Symptome bei Equiden. Durch die Varianz in den am stärksten betroffenen Gehirnarealen können auch die beobachteten Symptome zwischen betroffenen Tieren einer Spezies variieren [Grabner et al. 2002]. Als extraneuronale Symptome werden therapieresistentes, wiederkehrendes Fieber sowie eine Störung der Futter- und Wasseraufnahme beobachtet [Grabner et al. 2002]. Neurologische Symptome können in Störungen des Verhaltens („Pfeifenrauchen“, Vorwärtsdrängen, Übererregbarkeit, Aggressivität) und des Bewusstseins (Depression, Apathie, Somnolenz, Stupor), in Veränderungen des Bewegungsablaufs (Ataxie, Störung der Bewegungskoordination und Propriozeption), in Ausfälle von Hirnnerven (Dysphagie, Fazialisparese, Nystagmus, Strabismus) und Krampfanfälle eingeteilt werden [Grabner et al. 2002, Herden et al. 2013].

Bei erkrankten Pferden tritt gewöhnlich 1-6 Wochen nach erstem Beobachten der Symptome der Tod ein. Die Inkubationszeit nach experimenteller intrazerebraler Infektion bei drei Ponys war 15-26 Tage [Katz et al. 1998], nach natürlichen Infektionen rechnet man mit 2-6 Monaten [Herden et al. 2013, Priestnall et al. 2011].

2.2.6.5. Labormethoden zum Nachweis von BoDV-1-Infektionen

Zur Diagnose einer BD können verschiedene Nachweismethoden genutzt werden. Bei Fehlwirten können die histopathologischen Veränderungen Hinweise geben, andere Ätiologien als Ursachen einer Enzephalitis kommen aber als Differentialdiagnosen in Betracht [Herden et al. 2013]. Daher steht der Erregernachweis im Vordergrund. Genutzt werden können BoDV-1-spezifische RT-PCR-Assays zum Nachweis von BoDV-1-RNA, die vor allem die stark exprimierten Transkripte des BoDV-1-Nukleoproteins und des BoDV-1-Phosphoproteins amplifizieren [Schindler et al. 2007]. Zusätzlich wurden RT-PCR-Assays entwickelt, die neben BoDV-1 die entsprechenden RNA-Abschnitte von anderen Orthobornaviren erkennen [Hoffmann et al. 2015]. Die RT-PCR hat eine Sensitivität von 100 %, während die Virusisolation mittels Anzucht von infektiösem Virus eine Sensitivität von 87 % hat [Grabner et al. 2002]. Dabei werden empfängliche Zellen wie beispielsweise primäre Kaninchenhirnzellen (Rabbit Embryonic Brain Cells) mit homogenisiertem Probenmaterial inokuliert und die Infektionen nach mindestens einer Passage der Zellen nachgewiesen [Herzog et al. 2010, Herzog und Rott 1980]. Die geringere Sensitivität ist größtenteils auf den Zustand des Probenmaterials zurückzuführen [Grabner et al. 2002].

Zur Bestätigung kann mittels Sequenzierung die virale RNA-Sequenz eines nachgewiesenen Virus bestimmt werden [Kolodziejek et al. 2005, Weissenböck et al. 2017]. Dies ermöglicht auch die

Durchführung phylogenetischer Studien, bei denen die Sequenz mit anderen veröffentlichten BoDV-1-Sequenzen verglichen wird [Dürwald et al. 2007].

Neben diesen Untersuchungen an homogenisiertem Probenmaterial kann BoDV-1 auch direkt auf Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Zum Nachweis von viralem Antigen kann die Immunhistochemie verwendet werden. Diese Methode ist bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern wie beispielsweise dem Antikörper Bo18, der das BoDV-1-Nukleoprotein erkennt [Herden et al. 2000, Werner-Keiß et al. 2008] sehr spezifisch. Es sind aber einzelne Mutationen bei BoDV-1 bekannt, durch die die Epitope nicht mehr erkannt werden, was zu falsch negativen Ergebnissen führen kann [Richt et al. 2007]. Die Verwendung von polyklonalen Antikörpern kann durch die Nutzung mehrerer Epitope dieses Problem umgehen. Teilweise wurde dabei aber eine Kreuzreaktivität zu anderen Orthobornaviren beobachtet [Hoffmann et al. 2015, Piepenbring et al. 2012]. BoDV-1-RNA im Gewebe kann mittels *in-situ*-Hybridisierung dargestellt werden [Werner-Keiß et al. 2008], dabei ist durch die Verwendung von verschiedenen gerichteten Sonden die Darstellung der Expression von viraler mRNA mittels einer „antisense“-Sonde und die Darstellung von genomischer RNA von BoDV-1 mittels einer „sense“-Sonde möglich [Bourg 2018, Werner-Keiß et al. 2008].

Neben diesen direkten Nachweisen des Virus werden auch verschiedene indirekte Nachweismethoden für Antikörper gegen BoDV-1 verwendet. Goldstandard ist der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) mit einer Sensitivität von 88 % [Grabner et al. 2002, Herzog et al. 2010, Herzog und Rott 1980]. Immunoblots können als Ergänzung oder zur Bestätigung verwendet werden [Tappe et al. 2019b].

Der direkte Nachweis benötigt infiziertes Gewebe, daher kann er häufig erst *post mortem* angewendet werden, wenn Proben von Gehirnarealen gewonnen werden können. Mittels RT-PCR kann auch im Liquor cerebrospinalis BoDV-1 bei infizierten Tieren nachgewiesen werden, die Sensitivität beträgt hierbei allerdings nur 28 % [Grabner et al. 2002]. *Intra vitam* werden daher häufig indirekte Nachweise verwendet. Hierbei ist ein Antikörpertiter im Liquor cerebrospinalis bei bestehender Blut-Hirn-Schranke ein deutliches Zeichen einer akuten BoDV-1-Infektion [Grabner et al. 2002]. Ebenso deutet ein Titeranstieg im Serum um drei bis vier Stufen auf eine akute BoDV-1-Infektion hin [Grabner et al. 2002]. Ein Serumtiter ohne weitere Symptome oder Anhaltspunkte deutet nicht auf eine akute BoDV-1-Infektion hin, da eine Seroprävalenz von bis zu 11,5 % auch außerhalb endemischer Gebiete gefunden werden kann [Herzog et al. 1994]. Ursache könnte eine Kreuzreaktivität mit anderen Bornaviren sein [Bjornsdottir et al. 2013].

2.2.6.6. Charakteristika der BoDV-1-Infektion im Fehlwirt

Wie im Abschnitt „Epidemiologie der Bornaschen Krankheit“ (Kapitel 2.2.6.1) beschrieben, sprechen phylogenetische Untersuchungen für unabhängige Spilloverevents bei den Übertragungen vom Reservoir auf den Fehlwirt [Dürwald et al. 2006]. Als wahrscheinlichste Eintrittspforte wird bei Pferden und anderen Fehlwirten das olfaktorische Epithel angesehen [Kupke et al. 2019]. Ein Eintritt des Virus in die Nase über infektiöse Stäube ist bei Hantaviren beschrieben [Schwarz et al. 2009] und auch bei BoDV-1 vorstellbar [Bourg et al. 2013, Kupke et al. 2019]. Über intraaxonalen retrograden Transport verbreitet sich das Virus dann über olfaktorische Bahnen ins limbische System [Carbone et al. 1987, Shankar et al. 1992] und weiter in Regionen im gesamten Gehirn [Herden et al. 2013]. Zielzellen des BoDV-1 sind Neurone und Astrozyten, daneben können auch andere Zellen wie Oligodendrozyten oder Ependymzellen infiziert werden [Herden et al. 2013]. Das Virus findet man bevorzugt in bestimmten Regionen wie dem Hippocampus, dem Nucleus caudatus, dem Thalamus, dem Bulbus olfactorius, dem basalen Kortex und den periventrikulären Regionen der Medulla oblongata. Zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion breitet es sich in andere Regionen des Nervensystems wie das Kleinhirn und das Rückenmark aus [de la Torre 2002, Herden et al. 2013, Narayan et al. 1983, Tizard et al. 2016]. Als Folge einer T-Zell-vermittelten Immunpathogenese findet man eine ausgeprägte nicht-eitrige Meningoenzephalitis mit perivaskulären und parenchymatösen Infiltraten im zentralen Nervensystem, die von einer Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia begleitet wird [Algermissen 2010, Herden et al. 2013, Herden et al. 2005, Narayan et al. 1983]. Charakteristisch sind intranukleäre eosinophile kleine Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry B in Neuronen und Astrozyten, die sogenannten Joest-Degensche Einschlusskörperchen [Joest und Degen 1909].

Die Entzündungsreaktion als Folge einer BoDV-1-Infektion wurde in verschiedenen Tiermodellen intensiv untersucht, der zugrundeliegende Mechanismus im Fehlwirt ist eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion. Die zellulären Infiltrate bestehen aus CD4- und CD8-T-Lymphozyten mit Makrophagen sowie zu späteren Zeitpunkten B-Lymphozyten und Plasmazellen [Deschl et al. 1990, Narayan et al. 1983]. CD4-T-Lymphozyten dominieren hierbei im Vergleich zu CD8-T-Lymphozyten [Deschl et al. 1990], die CD4-T-Lymphozyten liegen vermehrt in den perivaskulären Infiltraten, während CD8-T-Lymphozyten auch im Gewebe gefunden werden [Bilzer et al. 1995, Deschl et al. 1990]. Die Bedeutung der T-Lymphozyten für die Pathogenese wurde in verschiedenen Studien bestätigt. Zum einen führt die Infektion von immun-inkompetenten, immunsupprimierten Ratten oder Ratten ohne Thymus zu keinen Krankheitsanzeichen [Narayan et al. 1983]. Zum anderen löst die Übertragung von Zellen aus der Milz erkrankter Ratten oder BoDV-1-spezifischer CD4-T-Lymphozyten-Zelllinien die Krankheit aus [Narayan et al. 1983, Richt et al. 1994, Stitz et al. 2002].

B-Lymphozyten scheinen keine entscheidende Rolle für den Krankheitsverlauf zu spielen. Infizierte Tiere produzieren virusspezifische Serumantikörper, insbesondere gegen N und P, die aber nicht neutralisierend wirken, und in späteren Phasen in geringerer Menge gegen G und M [Briese et al. 1995, Furrer et al. 2001, Stitz et al. 1998]. Den in späteren Phasen der Infektion produzierten Serumantikörpern gegen G und M wird eine neutralisierende Wirkung zugesprochen [Furrer et al. 2001, Stitz et al. 1998]. In Rattenversuchen tragen sie dazu bei, die Virusinfektion auf das Nervensystem zu beschränken [Furrer et al. 2001, Stitz et al. 1998].

Sowohl Gehirnzellen als auch Entzündungszellen schütten Zytokine aus, die in der Anfangsphase der Infektion unter anderem aus Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin-1, -2, -6 und Interferon-gamma bestehen und zu einer klassischen M1-Aktivierung von Mikroglia führen [Hatalski et al. 1998, Jha et al. 2016, Shankar et al. 1992]. In späteren Phasen mit geringerer Entzündungsreaktion findet man niedrigere Level an TNF und höhere Level an Interleukin-4, was als Wechsel von Th1 zu einer Th2-Antwort interpretiert werden kann [Hatalski et al. 1998]. Aktivierte Astrozyten und Mikroglia können bereits in frühen Phasen der Infektion festgestellt werden [Deschl et al. 1990, Herden et al. 2005]. Die Gliaktivierung bleibt auch in späteren Phasen der Infektion, obwohl die Entzündungszellinfiltrate zurück gehen [Deschl et al. 1990, Herden et al. 2005]. Die Ausschüttung von reaktiven Stickstoffverbindungen durch aktivierte Mikroglia trägt zu den Schäden im Gehirn wie beispielsweise Neuronennekrosen durch zytotoxische T-Zellen bei [González et al. 2014]. Daneben wurden zahlreiche andere Interaktionen von Zytokinen, Gehirnzellen und Immunzellen im Gehirn beschrieben, beispielsweise eine Veränderung der Glutamatausschüttung und dadurch eine erhöhte Erregbarkeit [Ovanosov et al. 2007, Reuter et al. 2010], die zur Pathogenese im Fehlwirt beitragen [zusammengefasst in Nobach et al. 2020, Stitz et al. 2002, Tizard et al. 2016].

2.2.6.7. Humane BoDV-1-Infektionen

Inwieweit für BoDV-1 ein zoonotisches Potential besteht, war mehrere Jahrzehnte lang Gegenstand heftiger Diskussion. Ein erhöhter Anteil von seropositiven Menschen in einer Gruppe von psychisch erkrankten Menschen in einzelnen Studien sowie sich widersprechende Ergebnisse [Hornig et al. 2012, Rott et al. 1985], die teilweise auf Laborkontaminationen und unterschiedlich spezifische Testsysteme zurückzuführen waren [Dürwald et al. 2007, Schwemmler et al. 1999], führte zur Hypothese, dass BoDV-1 an der Entstehung von psychischen Erkrankungen beteiligt sei. Diese Hypothese wird heutzutage von einem Großteil der wissenschaftlichen Welt abgelehnt [Lipkin et al. 2011, Rubbenstroth et al. 2019]. Im Jahr 2017 führte allerdings der Nachweis von BoDV-1 in zwei voneinander unabhängigen Fallberichten zu neuen Erkenntnissen. In einem Fall starb ein einzelner Patient an einer durch BoDV-1 ausgelösten nicht-eitrigen Enzephalitis [Korn et al. 2018], im anderen

Fall erkrankten drei Organempfänger desselben Organspenders an nicht-eitrigen Enzephalitiden mit Nachweis von BoDV-1, zwei davon starben [Schlottau et al. 2018].

In der Folge wurden durch verstärkte Aufmerksamkeit auf diesen Erreger mehrere akute Fälle sowie retrospektiv weitere Nachweise bei Todesfällen durch Enzephalitiden ungeklärter Ursache mit BoDV-1 in Verbindung gebracht. Eine Übersicht über die bisher 30 veröffentlichten Fälle findet sich in Tabelle 3. Die BoDV-1-Infektion beim Menschen führt innerhalb kurzer Zeit nach Auftreten der ersten Symptome wie Kopfschmerzen und Fieber zu schweren neurologischen Ausfällen sowie meist zu Koma oder Tod [Niller et al. 2020]. Histologisch findet sich eine nicht-eitrige Panenzephalitis, die den Befunden bei tierischen Fehlwirten stark ähnelt [Liesche et al. 2019]. Eine Studie, die Blutseren von Tierärzten und Blutspendern aus endemischen Gebieten nach virusspezifischen Antikörpern gegen BoDV-1 untersucht hat, hat in ca 1000 Proben nur ein positives Serum entdeckt [Tappe et al. 2019a]. Dies deutet auf einen hohen Manifestationsindex von BoDV-1-Infektionen hin. Dies wurde weiter durch Niller et al. belegt, die in ihrer retrospektiven Studie bei unklaren Enzephalitisfällen mit tödlichem Ausgang einen hohen Anteil von BoDV-1-Infektionen fanden [Niller et al. 2020]. Dies zeigt, dass BoDV-1-Infektionen beim Menschen selten vorkommen, aber schwerwiegende letale Verläufe haben können. Die genaue Übertragung ist in einem Großteil der Fälle noch ungeklärt. Es wird aufgrund der Ähnlichkeit zu den BoDV-1-Infektionen bei Haussäugetieren und der geografischen Zuordnung der Virussequenzen aus humanen Krankheitsfälle zu den bekannten endemischen Regionen vermutet, dass auch die humanen Krankheitsfälle durch Kontakt mit einem Wildtierreservoir verursacht wurden [Niller et al. 2020]. Der genaue Übertragungsweg zum Menschen ist noch unbekannt. Die ersten entdeckten Fälle beinhalteten drei Menschen, die durch eine Organtransplantation mit BoDV-1 infiziert wurden [Schlottau et al. 2018]. Bei den anderen Fällen wird ein direkter Kontakt zu Spitzmäusen und daraufhin eine intranasale Infektion vermutet [Liesche et al. 2019, Niller et al. 2020], wie bei tierischen Fehlwirten beschrieben [Kupke et al. 2019]. Über eine Beteiligung von Katzen, die über ihre Eigenschaft als Spitzmausfänger als Vektoren fungieren können, wird spekuliert [Niller et al. 2020]. Während Liesche et al. [2019] bei den mittels Immunhistologie untersuchten Menschen individuelle Unterschiede in der Virusverteilung fanden, entdeckten Finck et al. [2020], die durch retrospektiven Vergleich von Magnetresonanzbildern und Histopathologie die Virusausbreitung im Menschen untersuchten, Ähnlichkeiten im Vergleich zu tierischen Fehlwirten mit dem Nucleus caudatus, der Insel, dem Thalamus und dem Operculum als primäre Zielregionen bei einem Großteil betroffener Menschen, von denen sich das Virus in die benachbarten Areale ausbreitet. Im Gegensatz zum tierischen Fehlwirt mit einer intranasalen Eintrittspforte und einem retrograden axonalen Transport des Virus wird aufgrund der geringen Beteiligung des Bulbus olfaktorius über eine hämatogene Ausbreitung spekuliert [Finck et al. 2020]. Virämien sind bei BoDV-1-Infektionen bei

Tieren bisher nicht beschrieben, die intravenöse Infektion gelingt jedoch bei aviären Bornaviren [Piepenbring et al. 2016, Piepenbring et al. 2012].

Tabelle 3 Humane BoDV-1-Infektionen

Bezeichnung laut Quelle	Quelle	Alter	Geschlecht	Symptome initial	Symptome mittlere Krankheitsdauer	Späte Symptome	Zeit Symptome bis Tod	Pathologische Diagnosen
Patient Korn	Korn et al. 2018	25	Mann	Fieber, Kopfschmerzen, Schwäche, Verwirrung	Desorientierung, unsicherer Gang, myoklonische Zuckungen, Fieber, Lethargie	Fortschreitender Bewusstseinsverlust, Ausfall der Hirnstammreflexe	1 Monat	Lymphohistiozytäre und nekrotische Enzephalitis
Leberempfänger	Schlottau et al. 2018	65	Mann	Fazialisparese, Sprachstörung, Kognitive Defizite			Beginn Symptome Tag 98 nach Transplantation ; überlebt	keine Angabe (k. A.)
Nierenempfänger 1 (S), Patient 11 (F)	Schlottau et al. 2018 Finck et al. 2020	66	Mann	Progressive aufsteigende Tetraparese		Koma	96 Tage (Tag 112 bis Tag 208 nach Transplantation) (S), 42 Tage (F)	k. A.
Nierenempfänger 2 (S), Patient 1 (L), Patient 8 (F),	Schlottau et al. 2018; Liesche et al. 2019; Finck et al. 2020	74	Frau	Progressive aufsteigende Tetraparese (Guillain Barre Syndrom-ähnlich)	Tetraplegie, Kopfhervendefizite	Tiefes Koma	14 Wochen	Nicht-eitrige Panenzephalomyelitis und Neuritis von peripheren Nerven
Patient 2 (L), Patient 7 (F)	Liesche et al. 2019; Finck et al. 2020	21	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome mit Fieber und Kopfschmerzen	Gedächtnisschwund, Apathie, epileptische Anfälle	Fortschreitender Bewusstseinsverlust, Ausfall der Hirnstammreflexe	39 Tage	Nicht-eitrige Panenzephalomyelitis

Bezeichnung laut Quelle	Quelle	Alter	Geschlecht	Symptome initial	Symptome mittlere Krankheitsdauer	Späte Symptome	Zeit Symptome bis Tod	Pathologische Diagnosen
Patient 3 (L), Patient 4 (F)	Liesche et al. 2019; Finck et al. 2020	13	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome mit Fieber	Sprachprobleme, Ataxie, Nystagmus, Schläfrigkeit, fehlender Würgreflex	Fortschreitender Bewusstseinsverlust, vegetative Dysregulation mit Hypertonie und Tachykardie	25 Tage	Nicht-eitriges Panenzephalomyelitis
Patient 4 (L), Patient 16 (F)	Liesche et al. 2019; Finck et al. 2020	17	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome mit Fieber	Kopfschmerzen, Verwirrung, Anfälle	Fortschreitender Bewusstseinsverlust	6 Wochen (L), 12 Tage (F)	Nicht-eitriges Panenzephalomyelitis
Patient 5 (L), Patient 9 (F)	Liesche et al. 2019; Finck et al. 2020	78	k. A.	einseitige Schwäche, unsicherer Gang, Fieber	epileptische Anfälle	Fortschreitender Bewusstseinsverlust, Atemprobleme	4 Wochen (L), 25 Tage (F)	Nicht-eitriges Panenzephalomyelitis
Patient 6	Liesche et al. 2019	55	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome, Fieber, Kopfschmerzen	Wortfindungsstörung	Fortschreitender Bewusstseinsverlust	2 Wochen	Nicht-eitriges Panenzephalomyelitis
Patient 1996	Coras et al. 2019	31	Frau	Progressiv aufsteigende Tetraparese (Guillain-Barre-Syndrome ähnlich), Fieber		Tiefes Koma	24 Tage	k. A.
Patient 1	Nilier et al. 2020	k. A.	k. A.	Kopfschmerz, Fieber, Verwirrung, progressiver Bewusstseinsverlust		Tiefes Koma	k. A.	Panenzephalitis
Patient 2	Nilier et al. 2020	k. A.	k. A.	Kopfschmerz, Meningealzeichen, Dysphagie, Verwirrung, Fieber, progressiver Bewusstseinsverlust		Tiefes Koma, Ausfall der Hirnstammreflexe	k. A.	Panenzephalitis
Patient 3	Nilier et al. 2020	k. A.	k. A.	Schwindel, Sprachstörungen und optische Halluzinationen		Wachkoma (Vegetative state)	k. A.	Meningoenzephalitis, Frontale Atrophie

Literaturübersicht

Bezeichnung laut Quelle	Quelle	Alter	Geschlecht	Symptome initial	Symptome mittlere Krankheitsdauer	Späte Symptome	Zeit Symptome bis Tod
Patient 4	Niller et al. 2020	k. A.	k. A.	Fieber, Kopfschmerzen, Meningismus, Verwirrung, epileptische Anfälle	Tiefes Koma, Ausfall der Hirnstammreflexe	k. A.	Panenzephalitis
Patient 5	Niller et al. 2020	k. A.	k. A.	Kopfschmerz, Fieber, epileptische Anfälle, Meningismus, Koma	Gehirnödem, tiefes Koma, Hirntod	k. A.	Panenzephalitis und Myelitis
Patient 6	Niller et al. 2020	k. A.	k. A.	Fieber, Kopfschmerzen, Apathie, Gedächtnisverlust, Anfälle, Bewusstseinsstörung	Tiefes Koma, Ausfall der Hirnstammreflexe	k. A.	Panenzephalitis und Myelitis
Patient 7	Niller et al. 2020	k. A.	k. A.	Fieber, Kopfschmerz, Verwirrung, leichte Hemiparese, Ataxie, Anfälle	Tiefes Koma, Ausfall der Hirnstammreflexe	k. A.	Meningoenzephalitis, Hypophysitis
Patient 8	Niller et al. 2020	k. A.	k. A.	Fieber, Kopfschmerz, Sprachstörung, Verwirrung, Koma innerhalb 6 Tage	Gehirnödem, tiefes Koma, Ausfall der Hirnstammreflexe	k. A.	Meningoenzephalomyelitis mit Fokus auf Hirnstamm
Patient 1	Finck et al. 2020	40-44	k. A.	Fieber, Apathie, Bewusstseinsstörung	k. A.	26 Tage	k. A.
Patient 2	Finck et al. 2020	10-14	k. A.	Fieber, gestörtes Allgemeinbefinden, Erbrechen, Inkontinenz, Ataxie	k. A.	28 Tage	k. A.
Patient 3	Finck et al. 2020	70-74	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome, Gliederschwäche	k. A.	12 Tage	k. A.
Patient 5	Finck et al. 2020	10-14	k. A.	Fieber, Anfälle, Schläfrigkeit	k. A.	31 Tage	k. A.
Patient 6	Finck et al. 2020	50-54	k. A.	Fieber, fortschreitende Verwirrung	k. A.	45 Tage	k. A.
Patient 10	Finck et al. 2020	45-49	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome, Kopfschmerzen, Desorientierung	k. A.	39 Tage	k. A.
Patient 12	Finck et al. 2020	30-34	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome, Kopfschmerzen	k. A.	31 Tage	k. A.

Bezeichnung laut Quelle	Quelle	Alter	Geschlecht	Symptome initial	Symptome mittlere Krankheitsdauer	Späte Symptome	Zeit Symptome bis Tod	Pathologische Diagnosen
Patient 13	Finck et al. 2020	35-39	k. A.	Fieber, Benommenheit, Schwindel		k. A.	53 Tage	k. A.
Patient 14	Finck et al. 2020	40-44	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome, Kopfschmerzen, fortschreitende Bewusstseinsdrückung		k. A.	67 Tage	k. A.
Patient 17	Finck et al. 2020	65-69	k. A.	Reduziertes Allgemeinbefinden, Sprachstörungen, Halluzinationen		k. A.	74 Tage	k. A.
Patient 18	Finck et al. 2020	30-34	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome, Bauchschmerzen		k. A.	48 Tage	k. A.
Patient 19	Finck et al. 2020	70-75	k. A.	Grippe-ähnliche Symptome, Verwirrung		k. A.	k. A.	k. A.

Bei Angaben zu einem Patienten in mehreren Quellen Zuordnung in Klammern: (F) = Finck et al. 2020, (L) = Lische et al. 2019, (S) = Schlottau et al. 2018

2.2.6.8. Tiermodelle zur Untersuchung von BoDV-1-Infektionen

Experimentell lässt sich eine Erkrankung durch eine BoDV-1-Infektion bei einer Vielzahl von Tierarten auslösen. Häufig wurden Mäuse und Ratten genutzt, daneben gibt es aber auch Untersuchungen an Gerbilen [Nakamura et al. 1999, Watanabe et al. 2001], Kaninchen [Metzler et al. 1978, Otta und Jentzsch 1960], Tupaia [Sprankel et al. 1978], Affen [Cervós-Navarro et al. 1981, Stitz et al. 1981], Meerschweinchen und Hamstern [Herden et al. 2013] und Rötelmäusen [Kinnunen et al. 2011]. Allerdings zeigen sich insbesondere bei Mäusen und Ratten starke Unterschiede in der Empfänglichkeit zwischen Altersstufen und verschiedenen Linien, bei denen zum Teil eine genetische Determination bekannt ist [Hallensleben et al. 1998].

Die experimentelle Infektion von adulten Labormäusen verschiedener Linien führt im Allgemeinen zu einer asymptomatischen Infektion [Kao et al. 1984]. Durch serielle Passage in Mäusen können einzelne Viruspräparationen erstellt werden, die nach intrazerebraler Infektion bei adulten Tieren empfänglicher Linien wie Murphy Roth Large-Mäusen (MRL) und BALB/c-Mäusen zu einer nicht-eitrigen Enzephalitis und bei MRL auch zu Hyperaktivität führt [Rubin et al. 1993]. Die Infektion von neonatalen Mäusen führt bei MRL, C3H- und CBA-Mäusen zu einer tödlichen nicht-eitrigen Enzephalitis mit neurologischen Symptomen [Hallensleben et al. 1998]. Die neonatale Infektion von BALB/c oder C57BL/6-Mäusen führt auch zu neurologischen Symptomen, die aber 2 Wochen nach Beginn der Symptome wieder verschwinden können [Hallensleben et al. 1998, Kramer et al. 2012].

Bei adulten Wistarratten, Schwarzkopfratten und Hamstern führt die experimentelle Infektion zu einer nicht-eitrigen Enzephalitis, ohne dass klinische Symptome beobachtet werden können. Bei adulten Lewisratten führt die intrazerebrale Infektion zu einem typischen zweiphasigen Infektionsverlauf [Carbone et al. 1987, Herden et al. 2013, Narayan et al. 1983]. Diese Tiere wurden schon früh als Tiermodell für die Bornasche Krankheit verwendet [Narayan et al. 1983] und sind das am besten charakterisierte Tiermodell der BoDV-1-Infektion. Die BoDV-1-Infektion von neonatalen Lewisratten führt hingegen zu einer entzündungsfreien Persistenz des Virus mit Ausbreitung des Virus auch auf Gewebe außerhalb des Nervensystems, wie bereits im Abschnitt „Mögliche Reservoir von BoDV-1 (Kapitel 2.2.6.1)“ genauer beschrieben.

In Rhesusaffen führte die Infektion mit BoDV-1 zu einem Krankheitsbild wie bei tierischen und humanen Fehlwirten mit nicht-eitriger Enzephalitis und neurologischen Symptomen [Schlottau et al. 2021, Stitz et al. 1981]. Bei Tupaia (*Tupaia glis*), die phylogenetisch nahe bei den Affen eingeordnet werden, führt die Infektion mit BoDV-1 ebenfalls zu einer nicht-eitrigen Enzephalitis und einer persistenten Infektion. Hier kann auch abnormes soziales Verhalten und Hyperaktivität beobachtet werden [Sprankel et al. 1978].

Die Anzahl an Tiermodellen für BoDV-1-Infektionen ist groß und viele Aspekte der Immunpathologie und Persistenz konnten dadurch bereits gezeigt werden. Die Anzahl an Tiermodellen, die die Reservoirsituation widerspiegeln, ist allerdings gering. Neonatale Ratten wurden bisher als bestes Modell für Untersuchungen zur Infektion von Reservoiren verwendet [Herzog et al. 1984, Morales 1988, Narayan et al. 1983]. Daneben wurden für einzelne Fragestellungen immuninkompetente Tiere verwendet, insbesondere bei der Untersuchung der Immunpathogenese der BD konnten sie gute Dienste leisten [Narayan et al. 1983, Richt et al. 1994, Stitz et al. 2002]. Kinnunen et al. [2011] untersuchten bei Rötelmäusen die experimentelle intrazerebrale Infektion von Neonaten. Das dabei beobachtete Verteilungsmuster der Virusausbreitung mit Fokus auf dem zentralen und peripheren Nervensystem unter Beteiligung der Harnblase und dem Nachweis von BoDV-1-RNA in Urin und Kot qualifizierte Rötelmäuse als weiteres Modell für die Reservoirsituation [Kinnunen et al. 2011]. Bei 10/41 Rötelmäusen konnten neurologische Symptome beobachtet werden, nur bei 2 dieser Tiere konnte ein Verlust von Purkinjenzellen histologisch entdeckt werden, die anderen Rötelmäuse mit Symptomen zeigten keine histologischen Läsionen [Kinnunen et al. 2011]. Durch die gravierenden Unterschiede beim Krankheitsverlauf in unterschiedlichen Linien von Mäusen und Ratten und Rötelmäusen als Nagetiere ist auch die Möglichkeit der Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf die Reservoirspezies Feldspitzmaus als *Eulipotyphla* als fraglich anzusehen. Als Antwort auf diese Übertragungsproblematik sollte in dieser Arbeit direkt die Feldspitzmaus als Versuchstier genutzt werden.

2.3 Spitzmäuse

2.3.1. Biologie

Die Familie der Spitzmäuse gehört zur Ordnung Eulipotyphla, die bis zum Beginn des 21. Jahrhunderts offiziell Insectivora genannt wurde [Douady et al. 2002]. Charakteristisch für diese Ordnung ist eine räuberische Lebensweise. Neben Spitzmäusen (Soricidae) zählen Igel (Erinaceidae), Maulwürfe (Talpidae) und Schlitzzüßler (Solenodontidae) sowie die ausgestorbenen karibischen Spitzmäuse (Nesophontidae) zu dieser Ordnung. Tabelle 5 informiert über die in Deutschland bestätigten Arten der Familie der Soricidae und ihren Gefährdungsstatus nach der offiziellen Roten Liste [International Union for Conservation of Nature and Nature Resources (IUCN) 2013].

Spitzmäuse zählen zu den kleinsten Säugetieren der Welt. Gleichzeitig haben sie eine der höchsten Stoffwechselraten [Ochocinska und Taylor 2005]. Bei normaler Aktivität müssen sie täglich mehr als ihr Gewicht an Nahrung zu sich nehmen, um ihren Energiebedarf zu decken, der bei der Hausspitzmaus (*Crocidura russula*) ungefähr 3,4 kJ/g/Tag und bei der Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) 6,7-9,7 kJ/g/Tag beträgt [Churchfield 1990]. Dadurch ist ihre Hauptaktivität die Nahrungssuche [Do et al. 2013]. Die Bestandteile der Nahrung variieren leicht zwischen den Arten und sind abhängig vom Nahrungsangebot, verschiedene Invertebraten wie Insekten und Gliederwürmer sind bei der Feldspitzmaus häufig Bestandteil der Nahrung [Churchfield 1990, Kraft 2008]. Futteranalysen zeigen, dass bei einer derartigen Ernährung nur geringe Mengen an Calcium und nur geringe Mengen an Vitamin A, D, E, Thiamin und Niacin aufgenommen werden [Finke 2002].

Die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) ist in Zentraleuropa und Asien verbreitet. In Europa scheint das Verbreitungsareal zweigeteilt zu sein mit einem Korridor ohne Feldspitzmäuse in den Alpen, in den österreichischen Alpen kommt sie jedoch noch auf Bergen bis zu 700 m Höhe vor [Nagel und Nagel 2005] und wird auch in der Schweiz in Gebieten der östlichen Alpen gefunden [Vogel et al. 2002]. In den letzten Jahrzehnten wurde in einzelnen Gebieten eine Verdrängung der Feldspitzmaus durch die Hausspitzmaus beobachtet [Frank 1984, Vogel et al. 2002]. In anderen Gegenden schienen die Populationen dagegen eher anzuwachsen, da sie von warmen und trockenen Sommern profitierten [Kraft 2008]. Die Feldspitzmaus hat eine Körperrumpflänge von ungefähr 7 cm mit einer Schwanzlänge von 3,4 cm und ein Körpergewicht von ungefähr 10 g [Nagel und Nagel 2005]. Sie bevorzugt trockene Kulturlandschaften und lichte Waldränder, daneben ist sie auch in Gärten, Ackerland und extensiv genutzten landwirtschaftlichen Flächen zu finden. Sie ist ein territorialer Einzelgänger [Churchfield 1990], im Winter können aber auch soziale Nester entstehen [Simeonovska-Nikolova 2004a]. Die Paarungszeit beginnt im Frühling und geht bis zum Herbst, in dieser Zeit bekommt das Weibchen bis zu 4 Würfe mit einer Tragezeit von 30 Tagen und einer Aufzuchtphase von ca. 20 Tagen [Churchfield 1990, Hellwing 1973]. Die Wurfgröße liegt dabei bei 3-5 Welpen [Hellwing 1973]. Durch die geringe

räumliche Verteilung der Nachkommen nach dem Absetzen durch die Mutter können in der Natur Paarungen zwischen verwandten Tieren stattfinden [Duarte et al. 2003]. Bei der nahe verwandten Hausspitzmaus (*Crocidura russula*) konnte gezeigt werden, dass diese natürliche Inzucht keine Fitnessreduktion verursacht [Duarte et al. 2003]. Die Lebensdauer beträgt selten mehr als 1,5 Jahre mit einer hohen Mortalität im Winter. Fressfeinde sind vor allem Eulen, aber auch räuberische Säugetiere wie Marder und seltener Füchse. In Ortsnähe fangen auch Hauskatzen regelmäßig Feldspitzmäuse, werden aber durch den Geruch vom Fressen abgehalten [Nagel und Nagel 2005].

Abbildung 4 – Artmerkmale der Feldspitzmaus



- A) Feldspitzmaus mit deutlicher Trennlinie zwischen dunkelgrauem bis braunem Rücken und weißem Bauch
- B) große unbehaarte Ohrmuscheln
- C) Zähne mit weißen Spitzen
- D) seitliche Wimpernhaare am kurzem Schwanz

Tabelle 4 Spitzmausarten in Deutschland

Art	deutscher Name	englischer Name	Familie	Gefährdungstatus	Verbreitungsgrad
<i>Crocidura leucodon</i>	Feldspitzmaus	Bicolored white-toothed shrew	Soricidae	Vorwarnliste	Mäßig häufig
<i>Crocidura russula</i>	Hausspitzmaus	Greater white-toothed shrew	Soricidae	Ungefährdet	Häufig
<i>Crocidura suaveolens</i>	Gartenspitzmaus	Lesser white-toothed shrew	Soricidae	Daten unzureichend	Selten
<i>Sorex araneus</i>	Waldspitzmaus	Common shrew	Soricidae	Ungefährdet	Sehr häufig
<i>Sorex coronatus</i>	Schabrackenspitzmaus	Crowned shrew	Soricidae	Ungefährdet	Häufig
<i>Sorex minutus</i>	Zwergspitzmaus	Eurasian pigmy shrew	Soricidae	Ungefährdet	Häufig
<i>Sorex alpinus</i>	Alpenspitzmaus	Alpine shrew	Soricidae	Vom Aussterben bedroht	Extrem selten
<i>Neomys fodiens</i>	Wasserspitzmaus	Eurasian water shrew	Soricidae	Vorwarnliste	Mäßig häufig
<i>Neomys anomalus</i>	Sumpfspitzmaus	Mediterranean water shrew	Soricidae	Stark gefährdet	Selten

Modifiziert nach Haupt et al. [2009]

2.3.2. Spitzmäuse in Feldstudien

Tierkörper von Spitzmäusen werden in der Natur vereinzelt gefunden, werden von Katzen gebracht [Nagel und Nagel 2005] oder treten als ungeplanter Fang bei der Schädlingsbekämpfung auf [Bourg et al. 2013]. Für wissenschaftliche Studien werden meist verschiedene Fangsysteme verwendet [Little und Gurnell 1989]. Der Untersucher ist bei Planung und Durchführung dafür verantwortlich, dass keine unbeabsichtigten Schäden für die Spitzmauspopulation, andere Tierarten oder das untersuchte Habitat verursacht werden [Sikes 2016]. Daher muss die Wahl des Fangsystems und der Konzeption des Fangprotokolls das Wohl des Tieres berücksichtigen und unnötige Leiden und Schäden verhindern [Sikes 2016]. Prinzipiell entscheidet das Untersuchungsziel über Totfang oder Lebendfangmethoden. Verschiedene Eimerfallen („pitfalls“) sowie Fallen mit Türschließmechanismus sind verfügbar, durch Köder und natürliche Neugier werden die Spitzmäuse angelockt [Sikes 2016]. Dabei werden auch verschiedene andere Kleinsäuger ähnlicher Größe gefangen, ungefähr ein Zehntel der gefangenen Tiere sind Spitzmäuse [Little und Gurnell 1989]. Die anderen gefangenen Tiere sind größtenteils Langschwanzmäuse (Muridae) und Wühlmäuse (Arvicolinae) [Jenrich et al. 2010]. Bei Lebendfang kann durch eine häufige Kontrolle der Fallen und Bestückung der Fallen mit Nahrung und Wasser die Mortalität von Spitzmäusen durch Hypothermie, Exsikkose und Energiemangel auf 10 % bis 25 % reduziert werden [Do et al. 2013].

2.3.3. Spitzmäuse als Labortiere

Die meisten Laborhaltungen von Spitzmäusen wurden nur für eine kurze, begrenzte Zeit aufrechterhalten, um eine spezielle Fragestellung der jeweiligen Studie zu beantworten [Ochocinska und Taylor 2005, Page et al. 2012, Siemers et al. 2009, Simeonovska-Nikolova 2004b, Von Merten und Siemers 2012]. Länger betriebene Zuchtkolonien sind selten beschrieben worden.

Niethammer und Frank fingen unabhängig voneinander einzelne Exemplare von Hausspitzmäusen und hielten sie für eine kurze Zeit in einem Glasterrarium, um erste Beobachtungen zur Paarung, Vermehrung und Jungenaufzucht aufzustellen [Frank 1953, Niethammer 1950]. Zippelius dokumentierte unter ähnlichen einfachen Bedingungen die Karawanenbildung bei der Feldspitzmaus genauer, ein Phänomen bei Weißzahnschäfermäusen, bei denen während der Aufzuchtphase bei nötigen Nestwechseln die Jungen wie in einer Karawane hinter der Mutter herlaufen [Zippelius 1957].

Eine große Kolonie von zuerst Hausspitzmäusen und danach Feldspitzmäusen wurde 1973 von Hellwing beschrieben [Hellwing 1973]. Die Hausspitzmauszucht gab es von 1965 bis 1971, in dieser Zeit erfolgten 937 Geburten. Die Feldspitzmauszucht gab es von 1970 bis 1971 mit insgesamt 19 Geburten. Die Haltungsbedingungen waren bei beiden Spezies gleich, am besten funktionierte die Zucht in monogamen Zuchtpaaren und Familienkäfigen [Hellwing 1973].

Verschiedene andere Spitzmausarten wurden ebenfalls als Labortiere gezüchtet. Searle hielt 1985 Waldspitzmäuse mit 101 erfolgreich aufgezogenen Jungtieren [Searle 1984]. Ohno etablierte 1992 *Crocidura dsinezumi*, eine japanische Spitzmausart, als Labortier [Ohno et al. 1992]. Beim Vergleich dieser drei detailliert beschriebenen Haltungen fallen verschiedene Varianten auf.

In der Hellwing-Zucht wurden Stahlboxen mit Maschendrahtdeckeln mit den Maßen 34 x 50 x 20 cm für je ein Zuchtpaar verwendet. Als Bodensubstrat wurde Sand und Sägespäne verwendet und zusätzlich Stroh als Nistmaterial. Als zusätzliche Einrichtung wurde eine hölzerne Nistbox oder ein umgedrehter Blumentopf verwendet [Hellwing 1973]. Searle et al. verwendeten Holzboxen mit einer gläsernen Vorderfront und einem Löcherdeckel aus Zink. Die Maße waren 30 x 45 x 25 cm, bei Zuchtpaaren wurden zwei dieser Boxen zu einer Doppelbox verbunden. Als Bodensubstrat wurde Erde und Torf verwendet, als zusätzliche Einrichtung gab es ein Hamsterrad sowie eine Nistbox gefüllt mit Heu und Zellstoffpapier oder Baumwolle [Searle 1984]. Bei Ohno et al. wurden initial Holzkäfige mit den Maßen 25 x 42 x 18 cm benutzt, als Bodensubstrat wurde Erde und Sägespäne verwendet. Nach 4-5 Generationen wechselten sie zu Plastikkäfigen mit Drahtdeckel mit den Maßen 15 x 22 x 12 cm. Hier wurden Sägespäne als Bodensubstrat verwendet. Als zusätzliche Einrichtung wurde eine Nistbox mit Papierschnitzeln als Nistmaterial zur Verfügung gestellt [Ohno et al. 1992].

Sowohl Hellwing et al. als auch Searle et al. benutzten Käfige außerhalb von Gebäuden [Hellwing 1973, Searle 1984]. Ohno et al. verwendeten die ersten Jahre die Außenweltbedingungen, dann wechselten sie zu einem kontrollierten Raum mit 18-25°C Lufttemperatur und 14 Stunden Lichtdauer, die Luftfeuchtigkeit wurde nicht kontrolliert [Ohno et al. 1992]. Die neueren Haltungen für kurze Zeiträume verwendeten klimatisierte Räume (15-18°C, 60-80 % Luftfeuchtigkeit) [Page et al. 2012, Siemers et al. 2009, Von Merten und Siemers 2012].

Hellwing et al. verwendeten Fliegenlarven und Wasser ad libitum sowie eine Mischung aus Fleisch (Rind oder Huhn), gekochten Eiern, Getreide, Fischmehl sowie Milch als Calciumquelle und zweimal pro Woche eine Vitaminmischung [Hellwing 1973]. Bei Searle et al. wurde eine Mischung aus Ochsenherz, Hühnchenfleisch, Ochsenleber, Weizen, Hafer, Eier und Vitamin- und Mineralstoffzusätze verwendet [Searle 1984]. Ohno et al. verwendeten zuerst nicht näher beschriebenes pelletiertes Futter für Spitzmäuse sowie im Handel erhältliches Katzenfutter, Hafermehl und Seidenspinnerpuder zusammen und wechselten dann zu Forellenpellets und Katzenfutter [Ohno et al. 1992].

Kollars et al. testeten an *Sorex araneus* und *Sorex minutus* ein kommerziell erwerbbares Labortierfutter [Kollars und Baumler 1994]. Dabei zeigten sich zwischen diesen beiden Arten Unterschiede in der Akzeptanz, *Sorex minutus* akzeptierte es in einer Mischung mit Hundefutter mit höherem Wasseranteil, *Sorex araneus* konnte vollständig auf zerriebene Pellets umgestellt werden, die einmal

pro Woche erneuert werden mussten [Kollars und Baumler 1994]. Dies reduzierte die Kosten und den Aufwand für die Fütterung [Kollars und Baumler 1994].

In allen Haltungsformen wurde Wasser mit Hilfe von Wasserschalen ad libitum zur Verfügung gestellt.

2.3.4. Spitzmäuse als Reservoir

Spitzmäuse können als Reservoir für Protozoen, Bakterien und Viren fungieren. Wie viele andere Kleinsäuger können sie Zwischenwirt für *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* sein [Meerburg et al. 2012]. Verschiedene Leptospiren, darunter die humanpathogene Spezies *Leptospira kirschneri*, können in Spitzmäusen vorkommen [Mayer-Scholl et al. 2014]. Ihre Bedeutung als Reservoir ist bei diesen Krankheitserregern aufgrund des häufigeren Vorkommens von anderen Reservoirarten wie Feldmäusen (*Microtis arvalis*) allerdings als gering anzusehen. Bestimmte Hantaviren sind dagegen bisher nur in Spitzmausarten entdeckt worden, wie beispielsweise das Asikkalavirus oder das Seewisvirus [Radosa et al. 2013]. Hier kann eine besondere Adaptation der Viren an das Spitzmausreservoir vermutet werden.

Mehrere Spitzmaus-Hepatitis B-Viren (*Orthohepadnaviridae*) sind in verschiedenen Spitzmausarten entdeckt worden [Rasche et al. 2019]. Sie sind allerdings unterschiedlich von den bei Menschen isolierten Hepatitis B-Viren und scheinen andere Eintrittsrezeptoren zu benutzen [Rasche et al. 2019]. Daher werden sie nicht als zoonotisch angesehen [Rasche et al. 2019]. Sie werfen aber ein interessantes Licht auf die Phylogenie und Koevolution von Hepatitis B-Viren [Rasche et al. 2019]. Da diese Viren trotz weitflächiger Beprobung nur an einzelnen sehr begrenzten Standorten in Spitzmäusen gefunden wurden, zeigt dies den geringen Austausch von Infektionserregern zwischen räumlich getrennten Spitzmauspopulationen.

2.3.5. Feldspitzmäuse als Reservoir von BoDV-1

Besondere Aufmerksamkeit erlangte die Feldspitzmaus, als in der Schweiz Anfang der 2000er Jahre das erste Mal drei Feldspitzmäuse mit natürlichen Bornavirusinfektionen entdeckt wurden [Hilbe et al. 2006]. Bei diesen Feldspitzmäusen konnte mittels RT-PCR BoDV-1-RNA und mittels Immunhistologie BoDV-1-Antigen in Gehirn und Herz nachgewiesen werden, ohne dass Entzündungsanzeichen zu finden waren; weitere Proben wurden zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht [Hilbe et al. 2006]. Die Fortsetzungsstudie mit 2 weiteren natürlich infizierten Feldspitzmäusen zeigte, dass RNA und Antigen in einer Vielzahl von Organen nachzuweisen waren. Insbesondere war das Virus neben dem Nervensystem auch in epithelialen und mesenchymalen Geweben der Haut, Lunge und Niere nachweisbar [Puorger et al. 2010]. Das Verteilungsmuster war ähnlich wie bei den experimentell infizierten Lewisratten bei einer neonatalen Infektion, bei denen die Ausscheidung von infektiösem Virus nachgewiesen wurde [Morales 1988, Morales et al. 1988]. Da dadurch eine Ausscheidung des

Virus bei natürlich infizierten Feldspitzmäusen wahrscheinlich war, wurde die Feldspitzmaus als Reservoir und Überträger von BoDV-1 vorgeschlagen. Der mittels RT-PCR untersuchte Urin war in dieser Studie PCR-negativ [Puorger et al. 2010]. Durch Funde von weiteren natürlich infizierten Feldspitzmäusen in Bayern [Bourg 2013], Sachsen-Anhalt [Dürwald et al. 2014] und Oberösterreich [Weissenböck et al. 2017] wurde in den darauffolgenden Jahren die These der Feldspitzmaus als Reservoir für BoDV-1 in weiteren endemischen Gebieten bekräftigt. Auch in diesen untersuchten Feldspitzmäuse konnte Virus in einer Vielzahl der untersuchten Organsysteme nachgewiesen werden, ohne dass entzündliche oder degenerative Veränderungen gefunden wurden [Bourg et al. 2013, Dürwald et al. 2014, Puorger et al. 2010]. Infizierte Feldspitzmäuse wiesen einen Titer von BoDV-1-spezifischen Serumantikörpern auf, der eine Titerstufe bis zu 1:20480 erreichen konnte [Bourg et al. 2013]. Es wurden aber auch BoDV-1-spezifische Antikörper bei Feldspitzmäusen gefunden, in denen mittels RT-PCR oder Immunhistologie kein direkter Virusnachweis erbracht werden konnte [Bourg et al. 2013]. Dies könnte auf eine Viruseliminierung hindeuten [Bourg 2018]. In einer Feldspitzmaus wurde mittels direktem Virusnachweis die Infektion nachgewiesen, obwohl im Blut mittels indirektem Immunfluoreszenztest kein Titer von BoDV-1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte [Bourg 2018]. Bei dieser und einer weiteren Spitzmaus [Bourg 2018] wurde das Virus im Nervensystem und im olfaktorischen System, aber nur vereinzelt in peripheren Organen nachgewiesen, so dass über einen frühen Infektionszeitpunkt spekuliert wurde [Bourg 2018]. Durch Verwendung einer spezifischen PCR auf das BoDV-1-N-Gen auf DNA-Ebene anstatt RNA-Ebene zeigten Dürwald et al., dass bei natürlichen Infektionen in Feldspitzmäusen DNA-Kopien des Virus nachzuweisen sind [Dürwald et al. 2014]. Dies kann auf eine mögliche Integration ins Genom hindeuten, die genaue Bedeutung des Phänomens und die Bedeutung in der Pathogenese sind noch nicht geklärt.

Eine räumliche Studie (Geoinformationssystem/GIS-Analyse), die geographische Daten in Zusammenhang mit Verbreitungsdaten von Feldspitzmäusen und epidemiologischen Daten von BoDV-1-Krankheitsfällen gebracht hat, kam zu dem Schluss, dass in Bayern in endemischen Gebieten der Bornaschen Krankheit vermehrt mit dem Auftreten von Feldspitzmäusen zu rechnen ist [Encarnacao et al. 2013]. Dies ist insbesondere deswegen bemerkenswert, da sich in Bayern die Verbreitungsgebiete von mehreren Spitzmausarten überschneiden, inklusive aller drei Weißzahnspitzmausarten (Gattung *Crocidura*), die in Deutschland vorkommen [Dürwald et al. 2014]. Inwieweit andere Spitzmausarten als BoDV-1-Reservoir in Frage kommen, ist noch ungeklärt. Eine BoDV-1-infizierte Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) wurde in Oberösterreich gefunden [Weissenböck et al. 2017]. Diese zeigte keine pathomorphologischen Veränderungen, im Gegensatz zu den meisten Feldspitzmäusen konnte allerdings Virusantigen nur in Zellen des Nervensystems nachgewiesen werden. Ob dies auf eine Fehlinfektion durch ein spillover-Ereignis oder einen frühen Infektionszeitpunkt hindeutet, konnte nicht geklärt werden [Weissenböck et al. 2017]. In anderen

Untersuchungen waren alle untersuchten Rotzahnspitzmäuse (Gattung: *Sorex*) BoDV-1-negativ [Bourg et al. 2013, Dürrwald et al. 2014]. Bei den Weißzahnspitzmäusen (Gattung: *Crocidura*) kommt auch die Hausspitzmaus (*Crocidura russula*) in manchen BoDV-1-Endemiegebieten, beispielsweise in Bayern vor. Bei allen bisher auf BoDV-1 untersuchten Hausspitzmäusen waren weder BoDV-1-RNA oder BoDV-1-Antigen nachweisbar, allerdings wurden 2 Hausspitzmäuse mit einem niedrigen Titer von BoDV-1-spezifischen Antikörpern gefunden (1:80, 1:320), die auf einen Kontakt mit Bornaviren hindeuten [Bourg 2018, Bourg et al. 2013].

2.4 Fledermäuse

2.4.1. Biologie

Die Ordnung Fledertiere (Chiroptera) ist nach den Nagetieren (Rodentia) die artenreichste Ordnung innerhalb der Klasse Säugetiere. Während in tropischen Gebieten die Unterordnung Flughunde (Megachiroptera) vorherrscht, kommen in Europa und Deutschland nur Vertreter der Unterordnung Fledermaus (Microchiroptera) vor. Daher konzentriert sich diese Arbeit auf diese Unterordnung, auch wenn manche Aspekte ebenso auf Flughunde zutreffen können. Fledermäuse ernähren sich im Gegensatz zu den fruchtessenden Flughunden im Großteil von Insekten. Tabelle 6 informiert über die in Deutschland bestätigten Fledermausarten und ihren Gefährdungsstatus nach der offiziellen Roten Liste [International Union for Conservation of Nature and Nature Resources (IUCN) 2013].

Die große Gruppe von verschiedenen Fledermausarten ist in vielen Bereichen sehr heterogen, da sich die Arten an ihre speziellen Nischen angepasst haben. So können beispielsweise bei der Futtersuche, beim Jagdverhalten und im Sozialverhalten bei den unterschiedlichen Arten verschiedene Strategien beobachtet werden. Es gibt Jäger des freien Luftraumes (wie beispielsweise die Abendsegler (*Nyctalus sp.*)), Fledermausarten, die um Gehölzstrukturen herum jagen (wie beispielsweise die Zwergfledermaus (*Pipistrellus pipistrellus*)) und Fledermausarten, die ihre Beute von Oberflächen ablesen (wie beispielsweise die Wimperfledermaus (*Myotis emarginatus*)). Die Wimperfledermaus ist bekannt dafür, im Sommer bevorzugt in Viehställen zu jagen [Steck und Brinkmann 2015]. Im Folgenden wird versucht, einen Überblick über wichtige Eigenschaften der Fledermäuse zu geben, die von mehreren Arten geteilt werden. Für Details und Besonderheiten von Arten muss auf die spezielle Literatur verwiesen werden [Braun und Dieterlen 2005].

Alle Fledermausarten in Deutschland sind fähig, akustische Signale im Ultraschallbereich im Kehlkopf zu produzieren und auszusenden. Diese Rufe werden zur Kommunikation zwischen Artgenossen genutzt. Zusätzlich können sie sich durch die Wahrnehmung der zurückgeworfenen Echos im Dunklen orientieren und Beute finden. Die Art der Signale ist zwischen den Arten unterschiedlich und kann daher zur Artbestimmung genutzt werden [Barataud 2015].

Fledermäuse sind nachtaktiv. Den Tag verbringen sie in ihren Quartieren und haben eine von Art unterschiedliche Ausflugszeit um den Sonnenuntergang bis zum Sonnenaufgang. Die Quartiere werden bei den meisten Arten innerhalb des Jahres gewechselt. Im Sommer bilden sich Aufzuchtquartiere (Wochenstuben) und Jagdquartiere. Im Winter (Oktober/November bis Februar/März) ziehen sich Fledermäuse in ein Winterquartier zurück und fallen in den Torpor, einen lethargischen Zustand mit verringerter Körpertemperatur und verringertem Stoffwechsel, in dem sie ohne Nahrungssuche von ihren Fettreserven leben. In geeigneten Quartieren können beispielsweise bei der Wimperfledermaus über 100 Individuen überwintern [Steck und Brinkmann 2015], von

manchen Quartieren ist auch bekannt, dass verschiedene Arten sie parallel nutzen [Dietz und Kiefer 2004]. Zwischen den verschiedenen Quartieren können bei einigen Spezies hunderte Kilometer liegen. So kann der Große Abendsegler (*Nyctalus noctula*), die Zweifarbfledermaus (*Vespertilio murinus*) und die Rauhautfledermaus (*Pipistrellus nathusii*) bis zu 1000 km auf dem Weg in Überwinterungsgebiete zurücklegen [Meschede und Rudolph 2004]. Andere Arten wie beispielsweise die Fransenfledermaus (*Myotis natteri*) oder die Hufeisennasenfledermäuse (*Rhinolophus spp.*) sind hingegen eher ortstreu, hier liegen Sommer- und Winterquartiere nur etwa 50 km auseinander [Dietz und Kiefer 2004].

Die benutzten Quartiere sind sehr vielseitig, dennoch zeigen die einzelnen Arten eine Präferenz für bestimmte Unterschlüpfen. Die europäischen Arten verwenden als Winterquartiere häufig Höhlen und unterirdische Spalten, wohingegen die Quartiere im Sommer häufiger in Bäumen und Gebäuden liegen [Dietz und Kiefer 2004]. Von der Fransenfledermaus (*Myotis natteri*) ist beispielsweise bekannt, dass sie als Sommerquartiere gerne Dächer von Ställen nutzt [Smith und Racey 2005].

Als Nachwuchs bekommen Fledermäuse nach dem Winterschlaf 1-2 Nachkommen, die sie in großen Wochenbettquartieren aufziehen. Die geringe Reproduktion pro Jahr gleichen sie durch eine für ihre Größe ungewöhnlich lange Lebensdauer von 5—10 Jahren aus [Braun und Dieterlen 2005].

Tabelle 5 Fledermausarten in Deutschland

Art	deutscher Name	englischer Name	Familie	Gefährdungstatus	Verbreitungsgrad
<i>Barbastella barbastellus</i>	Mopsfledermaus	Western barbastelle bat	Vespertilionidae	Stark gefährdet	Sehr selten
<i>Eptesicus nilssonii</i>	Nordfledermaus	Northern bat	Vespertilionidae	Gefährdung unbekanntes Ausmaßes	Selten
<i>Eptesicus serotinus</i>	Breitflügel-fledermaus	Serotine bat	Vespertilionidae	Gefährdung unbekanntes Ausmaßes	Mäßig häufig
<i>Hypsugo savii</i>	Alpenfledermaus	Savi's pipistrelle bat	Vespertilionidae	Daten unzureichend	Unbekannt
<i>Myotis alcathoe</i>	Nymphen-fledermaus	Alcathoe whiskered bat	Vespertilionidae	Vom Aussterben bedroht	Sehr selten
<i>Myotis bechsteinii</i>	Bechstein-fledermaus	Bechstein's bat	Vespertilionidae	Stark gefährdet	Selten
<i>Myotis brandtii</i>	Große Bartfledermaus/ Brandtfledermaus	Brandt's bat	Vespertilionidae	Vorwarnliste	Mäßig häufig
<i>Myotis dasycneme</i>	Teichfledermaus	Pond bat	Vespertilionidae	Daten unzureichend	Sehr selten
<i>Myotis daubentonii</i>	Wasserfledermaus	Daubenton's bat	Vespertilionidae	Ungefährdet	Häufig
<i>Myotis emarginatus</i>	Wimperfledermaus	Geoffroy's bat	Vespertilionidae	Stark gefährdet	Sehr selten
<i>Myotis myotis</i>	Großes Mausohr	Greater mouse-eared bat	Vespertilionidae	Vorwarnliste	Mäßig häufig
<i>Myotis mystacinus</i>	Kleine Bartfledermaus	Whiskered bat	Vespertilionidae	Vorwarnliste	Mäßig häufig

Art	deutscher Name	englischer Name	Familie	Gefährdungstatus	Verbreitungsgrad
<i>Myotis nattereri</i>	Fransenfledermaus	Natterer's bat	Vespertilionidae	Ungefährdet	Mäßig häufig
<i>Nyctalus leisleri</i>	Kleiner Abendsegler	Leisler's bat	Vespertilionidae	Daten unzureichend	Selten
<i>Nyctalus noctula</i>	Großer Abendsegler	Noctule bat	Vespertilionidae	Vorwarnliste	Mäßig häufig
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Weißrandfledermaus	Kuhl's pipistrelle bat	Vespertilionidae	Ungefährdet	Selten
<i>Pipistrellus nathusii</i>	Rauhautfledermaus	Nathusius' pipistrelle Bat	Vespertilionidae	Ungefährdet	Häufig
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Zwergfledermaus	Common pipistrelle	Vespertilionidae	Ungefährdet	Sehr häufig
<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	Mückenfledermaus	Soprano pipistrelle	Vespertilionidae	Daten unzureichend	Unbekannt
<i>Plecotus auritus</i>	Braunes Langohr	Brown long-eared bat	Vespertilionidae	Vorwarnliste	Mäßig häufig
<i>Plecotus austriacus</i>	Graues Langohr	Grey long-eared bat	Vespertilionidae	Stark gefährdet	Selten
<i>Vespertilio murinus</i>	Zweifarb-fledermaus	Parti-coloured bat	Vespertilionidae	Daten unzureichend	Unbekannt
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Große Hufeisennase	Greater horseshoe bat	Rhinolophidae	Vom Aussterben bedroht	Extrem selten
<i>Rhinolophus hipposideros</i>	Kleine Hufeisennase	Lesser horseshoe bat	Rhinolophidae	Vom Aussterben bedroht	Sehr selten

Modifiziert nach [Haupt et al. 2009]

2.4.2. Fledermäuse in Feldstudien und als Labortiere

Als fliegende, dämmerungs- und nachtaktive kleine Wildtiere stellen Fledermäuse die Untersucher in Feldstudien vor mehrere Herausforderungen. Die grundlegende Arbeit für wissenschaftliche Studien ist die Quartiersuche durch Begehung und Betrachtung geeigneter Quartiermöglichkeiten unter Berücksichtigung der Vorlieben der verschiedenen Arten [Braun und Dieterlen 2005]. Zur weiteren Bestimmung der Arten aus der Ferne können mit technischen Hilfsmitteln die Rufe im Ultraschallbereich herangezogen werden. Dabei werden zum einen Ultraschalldetektoren genutzt, die die Rufe in hörbare Frequenzen übersetzen [Barataud 2015]. Anhand des Rhythmus und des Klangbildes mit „feuchten“ und „trockenen“ Tönen können so manche Gattungen oder Arten bestimmt werden. Zum anderen können die Ultraschallrufe mit Sonogrammen graphisch dargestellt werden und die dabei beobachteten Muster bestimmten Arten zugeordnet werden. Zur Untersuchung aus der Nähe werden Fangmethoden mit Netzen verwendet, die sowohl die nähere Betrachtung und Bestimmung als auch die Beprobung von Individuen ermöglichen. Durch artspezifisches Verhalten der verschiedenen Gattungen und Arten von Fledermäusen in Europa lässt sich bei den verschiedenen Untersuchungsmethoden eine Selektion in den Ergebnissen beobachten [Steck und Brinkmann 2015]. So werden beispielsweise Arten der Gattung *Pipistrellus* häufiger mit akustischen Untersuchungsmethoden nachgewiesen, da sie eine große Rufweite haben, während sie mit Netzen seltener gefangen werden, da sie in größerer Höhe fliegen als andere Arten [Steck und Brinkmann 2015].

Junge unerfahrene Fledermäuse können sich bei den ersten größeren Flügen in Wohnungen verirren und werden daher häufig mit Traumata oder Erschöpfung bei Tierärzten oder Pflegestationen vorgestellt. Die Exemplare, die euthanasiert werden müssen, werden häufig für wissenschaftliche Studien gesammelt und stellen eine wertvolle Quelle für Untersuchungen dar [Muhldorfer et al. 2011].

Neben Feldstudien werden in den letzten Jahren mit steigender Tendenz Fledermäuse verschiedener Spezies (*Myotis natterii*, *Pteropus alecto*, *Eidolon helvum*, *Rousettus aegyptiacus*) als Tiermodelle in Labortierhaltungen verwendet [Begeman et al. 2020, Page et al. 2012, Schlottau et al. 2020, Woon et al. 2020], um Studien unter kontrollierten Bedingungen durchführen zu können.

2.4.3. Fledermäuse als Reservoir von Infektionserregern

Fledermäuse und Flughunde werden von einer Vielzahl von Publikationen als Reservoir von zoonotischen Infektionserregern dargestellt [Calisher et al. 2006, Johnson und Smith 2017]. Fledertiere sind nach den Nagetieren die artenreichste Ordnung der Säugetiere, und in diesen beiden Ordnungen können auch die meisten zoonotischen Infektionserreger gefunden werden [Johnson et al. 2020]. Laut einer Untersuchung von 2013 tragen Nagetiere rein nach Zahlen mehr zoonotische Viren, Fledertiere tragen aber die meisten zoonotischen Viren pro Spezies [Luis et al. 2013]. Dass sich

Fledermäuse und Flughunde besonders gut als Reservoir für zoonotische Viren eignen, liegt in verschiedenen Eigenschaften und Verhaltensweisen der Tiere dieser Ordnung begründet.

Fledertiere bilden große Kolonien. Bei Flughunden sind Kolonien von mehreren Tausend Tieren bekannt [Meschede und Rudolph 2004], aber auch bei europäischen Arten gibt es Wochenstuben oder Winterquartiere mit hundert Exemplaren [Meschede und Rudolph 2004]. In diesen gemeinsamen Quartieren bestehen durch die Häufigkeit von Kontakten unter den Tieren viele Gelegenheiten, bei denen Krankheitserreger übertragen werden können [Meschede und Rudolph 2004]. Dadurch, dass sich teilweise auch verschiedene Arten ein Quartier teilen [Dietz und Kiefer 2004], kommen auch Übertragungen zwischen verschiedenen Fledermausarten gehäuft vor [Calisher et al. 2006].

Dass Fledertiere als einzige Gruppe der Säugetiere den Flugraum erobert haben, fördert ähnlich wie bei Vögeln zusätzlich die Ausbreitung von Infektionen. Bei den täglichen Ausflügen zur Futtersuche können sie ein großes Areal durchfliegen [Meschede und Rudolph 2004]. Noch wichtiger sind die jahreszeitlichen Wanderungen zum Winterquartier oder zu den Wochenstuben und Sommerquartieren, bei denen infizierte Tiere Infektionserreger über viele hundert bis tausend Kilometer aus Endemiegebieten hinaus transportieren können [Brosset 1990, Calisher et al. 2006]. Da die Zusammensetzung der Winter- und Sommerquartiere an Tieren sich auch unterscheidet, gibt es weitere Möglichkeiten der Übertragung von Krankheitserregern [Calisher et al. 2006]. Trotz dieser hohen Mobilität von Fledertieren können auch lokal begrenzte Krankheitsausbrüche durch Übertragungen von Fledertieren verursacht werden. Beispielsweise wurde dies bei Nipah-Ausbrüchen in Asien beobachtet [Epstein et al. 2020, Han et al. 2015]. Hierbei kursierte der Erreger in der Population von Fledertieren, es wurde aber noch ein zusätzlicher, ortsgebundener Faktor benötigt, damit eine Übertragung auf andere Tiere oder Menschen stattfinden konnte. Dieser Faktor kann ein Einfluss auf die Ausscheidung des Erregers sein oder eine Besonderheit in der landschaftlichen Gestaltung, wie beispielsweise bei Nipah-Ausbrüchen das Vorkommen bestimmter Palmarten direkt an landwirtschaftlichen Betrieben, die durch Anlocken der Flughunde zum Kontakt führt [Epstein et al. 2020, Han et al. 2015].

Fledermäuse zeigen eine für kleine Säugetiere ungewöhnlich hohe Lebensdauer. Im Gegensatz zu beispielsweise den meisten Nagetierarten, die durch eine hohe Anzahl an Fressfeinden und die Nahrungsknappheit im Winter selten älter als ein Jahr werden, sind bei Fledermäusen Arten mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 5-10 Jahren keine Seltenheit [Calisher et al. 2006]. Dadurch besteht bei infizierten Fledermäusen eine längere Zeitdauer, in der Krankheitserreger ausgeschieden werden können [Calisher et al. 2006]. Diese längere Zeitdauer führt zu einer Reproduktionszahl R_0 , die deutlich über 1 liegen kann [Calisher et al. 2006].

Dass durch eine höhere Lebensdauer auch ein längerer Ausscheidungszeitraum entsteht, ist auch darauf zurückzuführen, dass ein hoher Anteil an Infektionen in Fledermäusen zu einer persistenten Infektion mit wenig Krankheitsanzeichen führt [Brook et al. 2020, Streicker et al. 2012]. Die genauen Gründe dafür werden noch diskutiert [Randall und Griffin 2017] und sind möglicherweise auch bei verschiedenen Krankheitserregern unterschiedlich. Besonderheiten des Immunsystems von Fledermäusen könnten den asymptomatischen persistenten Infektionen zugrunde liegen [Baker et al. 2013, Irving et al. 2021]. Das Immunsystem von Fledermäusen beruht auf der unspezifischen Immunantwort, mit Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Interferon als Hauptbestandteile [Schountz 2014]. Beispielsweise verringerte das fledermausspezifische „Myxovirus resistance“-1-Protein (Mx1), ausgelöst durch Interferon Typ I und Typ III als Reaktion auf die Erkennung von viralen Bestandteilen durch die zelleigenen Erkennungssysteme („pattern recognition system“), die Polymeraseaktivität ausgewählter Viren der Orthomyxoviren, Filoviren, Rhabdoviren und Bunyaviren [Fuchs et al. 2017]. Die natürlichen Interferon-Level scheinen bei einigen Fledermausarten höher zu sein als bei anderen Säugetieren, und die Interferon-induzierten Mechanismen in der Zelle zeigen teilweise Unterschiede zu anderen Säugetieren [Brook et al. 2020, Hölzer et al. 2019, Irving et al. 2021]. Dagegen ist die spezifische Immunantwort auf erregerspezifische Antigene mit T- und B-Lymphozyten und Gedächtniszellen rudimentär entwickelt [Schountz 2014]. Zusätzlich gibt es Mechanismen, die durch höhere Level von Hitzeschockproteinen oder verringerte Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen Zellschäden durch die Immunantwort reduzieren [Irving et al. 2021]. Durch die Kombination dieser Mechanismen werden persistente Infektionen gefördert.

Die wichtigste und am besten untersuchte zoonotische Infektionskrankheit mit Erregerreservoir in Fledermäusen stellt die Tollwut dar. Ausgelöst wird sie durch das Rabiesvirus und verwandte Viren der Familie *Lyssaviridae* [Calisher et al. 2006]. 11 Genotypen sind momentan bekannt [Calisher et al. 2006]. Gegen den Erreger gibt es aktive und passive Immunisierungen, darüber hinaus gibt es keine Therapie und die Erkrankung endet tödlich. Der häufigste Übertragungsweg sind Bisse von infizierten Tieren, daneben sind beim Menschen auch iatrogene Übertragungen durch Blut und Organtransplantate bekannt. Während weltweit gesehen der Großteil der Tollwutfälle auf Übertragungen von infizierten Hunden und anderen Caniden zurückzuführen ist [Streicker et al. 2012], sind Krankheitsfälle selten, die auf eine Übertragung durch Fledermäuse zurückzuführen sind [Calisher et al. 2006]. In vielen Ländern einschließlich den Ländern Zentraleuropas sind aber Fledermäuse die Hauptansteckungsquelle, weil die terrestrische Tollwut zurückgedrängt wurde [Calisher et al. 2006].

Hendra- und Nipahviren sind Viren der Familie *Paramyxoviridae* mit Reservoiren in Flughunden [Epstein et al. 2020]. Das Hendravirus führt zu einer tödlichen Krankheit in Pferden und Menschen, Nipahviren können neben Menschen auch Schweine infizieren und führen durch Keulungsprogramme

zu wirtschaftlichen Schäden. Die Krankheiten kommen in tropischen Ländern (unter anderem Australien, Malaysia, Indien) vor [Calisher et al. 2006, Epstein et al. 2020].

Neben diesen beispielhaft dargestellten Viren, für die Fledermäuse als Reservoir fungieren, gibt es auch mehrere Viren, bei denen Fledermäuse als Ursprungsreservoir angesehen werden, auch wenn die Übertragung innerhalb der Population nach dem Spillover-Event unabhängig von Fledermäusen geschieht. Beispiele hierfür sind unter anderem SARS-like Coronaviren [Calisher et al. 2006] inklusive SARS-CoV-2 und Ebolaviren [Calisher et al. 2006, Leroy et al. 2005].

Im Gegensatz zur weltweiten Situation wurden europäische Fledermäuse nur für sehr wenige Infektionskrankheiten als Reservoir identifiziert.

Die Tollwut, verursacht durch Bat-Lyssaviren, ist die einzige Krankheit in Europa mit einem bestätigten Reservoir in Fledertieren [Kohl und Kurth 2014]. European Bat Lyssavirus 1 ist vor allem in *Eptesicus serotinus* gefunden worden, European Bat Lyssavirus 2 kommt vor allem in *Myotis daubentonii* und *Myotis dasycneme* vor [Kohl und Kurth 2014]. Trotz der hohen Letalität einer Infektion beim Menschen sind seit 1963 weniger als 10 Fälle ($n = 2-5$) durch Bat-Lyssaviren verursacht worden, eine Übertragung ist demnach sehr selten [Kohl und Kurth 2014].

Die anderen in europäischen Fledermäusen entdeckten viralen Erreger sind durch PCR und andere genom-basierte Detektionssysteme nachgewiesen worden. Dadurch ist es bei diesen Erregern nicht möglich, die Kochschen Postulate vollständig zu erfüllen, da eine Erregerisolation mit nachfolgender Infektion gesunder Modellorganismen nicht erfolgen konnte [Kohl und Kurth 2014]. Über eine zoonotische Bedeutung kann durch vergleichende Überlegungen spekuliert werden.

So wurde das Lloviu-Virus aus der Familie der *Filoviridae* 2002 in *Miniopterus schreibersii*-Kolonien in Südeuropa entdeckt [Negredo et al. 2011]. Die betroffenen Kolonien verzeichneten zur gleichen Zeit einen starken Rückgang, so dass von einer Virulenz für betroffene *Miniopterus schreibersii* ausgegangen wird [Negredo et al. 2011]. Da mehrere andere Filoviren pathogen für den Menschen sind und schwere Krankheitsverläufe verursachen können (beispielsweise Ebolavirus), empfehlen die Autoren eine erhöhte Aufmerksamkeit [Kohl und Kurth 2014, Negredo et al. 2011].

Durch Coronaviren wurden einige der meistbeachteten Epidemien der jüngeren Vergangenheit ausgelöst, namentlich SARS 2002, MERS 2012 und 2020 die Covid-19-Pandemie [Latif 2020]. Bei allen wurde eine initiale Übertragung von Fledertieren nachgewiesen oder vermutet. Verschiedene Studien haben mehrere SARS-ähnliche oder MERS-ähnliche Coronaviren in europäischen Fledermausarten nachgewiesen [Übersicht in Kohl und Kurth 2014]. Das SARS-Virus zeigt eine Mutation in einem Spikeprotein, die die Pathogenität für den Menschen durch die dadurch ermöglichte Bindung an den humanen Rezeptor ACE-2 gefördert hat, in den bei europäischen Fledermäusen gefundenen

Coronaviren zeigt sich keine derartige Mutation [Kohl und Kurth 2014]. Nach aktuellem Stand ist beim MERS-Virus noch keine derartige Mutation als Voraussetzung für das zoonotische Potential bekannt, allerdings wurden Dromedare als Ansteckungsquelle für den Menschen und Reservoir des MERS-Virus identifiziert [Latif und Mukaratirwa 2020]. Das zoonotische Potential der ähnlichen Coronaviren bei europäischen Fledermäusen ist noch unklar.

Weiterhin wurden verschiedene Paramyxoviren in mehreren europäischen Fledermausarten entdeckt. Sie sind aber nicht näher mit den bekannten zoonotischen Paramyxoviren mit Reservoir in Fledermäusen (Henipavirus) verwandt und es gibt keine Hinweise für eine zoonotische Bedeutung [Kohl und Kurth 2014, Kurth et al. 2012].

Drei Reoviren wurden von *Plecotus auritus* und *Myotis mystacinus* isoliert und mehrere andere identische Reoviren in verschiedenen zusätzlichen europäischen Fledermausarten entdeckt. Diese Reoviren ähnelten in der Genomsequenz Isolaten, die aus Hunden mit hämorrhagischer Enteritis sowie einem menschlichen Kind mit Gastroenteritis und Menschen mit Meningitis gewonnen wurden. Das zoonotische Potential dieser Reoviren ist noch unklar [Kohl und Kurth 2014].

2.4.4. Bisherige Kenntnisse zu Bornavirusinfektionen bei Fledermäusen

Bisher wurden in keiner Studie exogene Bornaviren in Fledertieren nachgewiesen, obwohl mithilfe von Metagenom-Analysen auch Fledermäuse aus Europa auf RNA-Viren untersucht wurden [Brinkmann et al. 2020, Dacheux et al. 2014, Kohl et al. 2021]. Verschiedene Studien haben allerdings endogene Sequenzen im Genom von verschiedenen Fledermausarten gefunden, die Ähnlichkeiten zu Bornaviren aufweisen [Dacheux et al. 2014, Horie et al. 2016, Mukai et al. 2018]. Diese endogenen bornaähnlichen Elemente (EBL) deuten auf einen Kontakt zwischen Bornaviren und Fledermäusen in der phylogenetischen Entwicklung hin. Teilweise sind es kurze Abschnitte, in *Eptesicus fuscus*, *Eptesicus serotinus* und *Eptesicus nilssonii* wurde allerdings auch ein ganzer offener Leserahmen (Open reading frame) einer Bornavirus-ähnlichen Polymerase entdeckt [Horie et al. 2016]. Aufgrund der phylogenetischen Trennung der Arten dieser Gattung und der Vermutung, dass die Integration ins Genom vor der Artentrennung stattfand, berechnet man das Integrationsereignis auf vor über 11,8 Millionen Jahren [Horie et al. 2016]. Die Funktion dieser EBL ist noch nicht geklärt. Verschiedene Funktionen sind vorstellbar und bei anderen Bornavirus-ähnlichen Elementen schon gezeigt (siehe Kapitel 2.2.5 „Endogene Elemente von Bornaviren“). Eine hypothetische Funktion ist eine Beteiligung der Polymerase beim RNA-Interferenz-System der Zellen, wie es bei RNA-abhängigen RNA-Polymerasen bei Pflanzen, Nematoden und Hefen beschrieben ist [Zong et al. 2009]. Dieses System ist Teil der unspezifischen Abwehr gegenüber Viren. Eine andere hypothetische Funktion ist eine direkte Abwehr gegenüber Bornaviren [Horie et al. 2016]. In Streifenhörnchen wurde gezeigt, dass die Expression von Bornavirus-ähnlichen Sequenzen die BoDV-1-Replikation behindert [Fujino et al. 2014].

In manchen Nagern und Affen werden Bornavirus-ähnliche Sequenzen als piRNAs exprimiert, die an der Verhinderung einer Bornavirusinfektion beteiligt sind [Parrish et al. 2015]. Durch eine Dysregulation der Expression und Replikation der Bornavirusgene kann eine Infektion verhindert oder gestört werden. Ein solches spezifisch gegen Bornaviren gerichtetes Abwehrsystem deutet allerdings auf einen regelmäßigeren Kontakt während der phylogenetischen Entwicklung hin, damit aufgrund eines evolutionären Vorteils dieses System beibehalten wird. Es ist damit sehr wahrscheinlich, dass auch in Fledermäusen Bornaviren vorkommen können.

3 Artikel 1

Daniel Nobach, Manon Bourg, Sibylle Herzog, Hildburg Lange-Herbst, Jorge A Encarnação, Markus Eickmann, Christiane Herden

Shedding of Infectious Bornavirus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews

PLoS ONE 10(8): e0137018. doi:10.1371/journal.pone.0137018

RESEARCH ARTICLE

Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews

Daniel Nobach¹, Manon Bourg¹, Sibylle Herzog², Hildburg Lange-Herbst², Jorge A. Encarnação³, Markus Eickmann⁴, Christiane Herden^{1*}

1 Institute of Veterinary Pathology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany, **2** Institute of Virology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany, **3** Mammalian Ecology Group, Department of Animal Ecology and Systematics, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany, **4** Institute of Virology, Philipps-University, Marburg, Germany

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


 OPEN ACCESS

Citation: Nobach D, Bourg M, Herzog S, Lange-Herbst H, Encarnação JA, Eickmann M, et al. (2015) Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews. *PLoS ONE* 10(8): e0137018. doi:10.1371/journal.pone.0137018

Editor: Jens H. Kuhn, Division of Clinical Research, UNITED STATES

Received: March 9, 2015

Accepted: August 10, 2015

Published: August 27, 2015

Copyright: © 2015 Nobach et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: DNA sequences are available from the Genbank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>); accession number KM349818, KM 349819. All other relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

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

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Many RNA viruses arise from animal reservoirs, namely bats, rodents and insectivores but mechanisms of virus maintenance and transmission still need to be addressed. The bicolored white-toothed shrew (*Crocidura leucodon*) has recently been identified as reservoir of the neurotropic Borna disease virus 1 (BoDV-1).

Principal Findings

Six out of eleven wild living bicoloured white-toothed shrews were trapped and revealed to be naturally infected with BoDV-1. All shrews were monitored in captivity in a long-term study over a time period up to 600 days that differed between the individual shrews. Interestingly, all six animals showed an asymptomatic course of infection despite virus shedding via various routes indicating a highly adapted host-pathogen interaction. Infectious virus and viral RNA were demonstrated in saliva, urine, skin swabs, lacrimal fluid and faeces, both during the first 8 weeks of the investigation period and for long time shedding after more than 250 days in captivity.

Conclusions

The various ways of shedding ensure successful virus maintenance in the reservoir population but also transmission to accidental hosts such as horses and sheep. Naturally BoDV-1-infected living shrews serve as excellent tool to unravel host and pathogen factors responsible for persistent viral co-existence in reservoir species while maintaining their physiological integrity despite high viral load in many organ systems.

Introduction

Most of emerging viruses that are continuously detected belong to the RNA viruses and are often zoonotic in nature with epidemic or epizootic potential in case of transmission to livestock or humans [1–3]. Interestingly, approximately 50% of the highly pathogenic diseases caused by these agents affect the central nervous system [4–6]. Emerging viruses and also viruses highly pathogenic for animal species often arise from animal reservoirs, namely bats, rodents and insectivores. Thus, reliable animal models for the *in vivo* analysis of host-pathogen interactions in respective reservoir species and the mechanisms that drive crossing of species barriers are urgently needed. This could also allow characterization of transmission routes and maintenance in reservoir populations of these viruses. The order *Mononegavirales* comprises non segmented negative stranded RNA viruses with a considerable number of highly pathogenic viruses which reside inconspicuously in natural reservoirs, e.g. lyssaviruses, paramyxoviruses and henipaviruses in bats. In case of transmission to susceptible animals or humans they cause fatal disease [7, 8]. Borna disease virus-1 (BoDV-1) also belongs to the order *Mononegavirales* and was classified within an own and currently growing family named *Bornaviridae*. A new classification of this family with subdivision into 5 species has been proposed with the classical Borna disease virus-1 as part of the species *Mammalian 1 bornavirus* [9]. Recently, a variegated squirrel-derived bornavirus (VSBV-1) was found in association with the death of three people indicating the zoonotic potential for this newly discovered bornavirus [10]. Comparably to other reservoir-bound viruses of the order *Mononegavirales*, BoDV-1 infection can lead to a lethal neurological disorder in accidental hosts such as horses and sheep due to a severe immune mediated non purulent meningoencephalitis [11]. The strictly endemic course of Borna disease with seasonal appearance in spring and early summer, the varying incidence between years with peaks every three to five years as well as the highly conserved viral genome pointed to a natural reservoir for BoDV-1 already for a long time [12]. However, many studies in wild rodents did not reveal any signs of BoDV-1 infection in these species [13]. First evidence of natural BoDV-1 infection in small mammals was provided by the detection of BoDV-1 antigen and RNA in bicolored white-toothed shrews (*Crocidura leucodon*) originating from an endemic area in Switzerland [14, 15]. This was substantiated by a study based on a geographic information system analysis which connects the prevalence of Borna disease and the distribution of *C. leucodon* [16]. Recently, similar occurrence of BoDV-1 infection in *C. leucodon* in endemic areas in Bavaria and in Saxony-Anhalt [17, 18] further underlines the role of this shrew species as BoDV-1 reservoir. Overlapping feature of all BoDV-1-infected shrews—regardless of their endemic origin—is the widespread virus distribution not only in the central nervous system (CNS) but also in peripheral organs capable of shedding virus in secretions and excretions [15, 17, 18]. Experimental BoDV-1 infection of neonatal immune incompetent rats leads to a quite comparable mode of virus distribution [19]. In these animals, persistent infection is achieved by immune tolerance. Obvious neurological signs are lacking but behavioural deficiencies have been noted. In contrast, adult Lewis rats exhibit a severe neurological biphasic disease due to a non purulent meningoencephalitis closely resembling the accidental host situation. Certain mice strains develop a fatal neurological disease only after intracerebral infection of newborns [20, 21]. Thus, outcome of experimental BoDV-1 infection in rodents such as mice and rats depend on the species and even the particular strain and, the age at time point of infection. The latter is most likely explainable by the status of the immune system. This leads to significant differences in virus-host interactions resulting in variable clinical outcome and fatality of disease, reaction pattern of the immune system, virus distribution and shedding.

Whether natural BoDV-1 infection of *C. leucodon* may fit to any of the known experimental courses or even run a different and so far unknown way of infection remains unknown. Thus,

clinical outcome, routes of virus shedding including demonstration of infectivity was characterized in BoDV-1-infected *C. leucodon*. This contributes to understand not only BoDV-1 pathogenesis but also serve as in vivo model for the analysis of general mechanisms of viral co-existence of reservoir-bound neurotropic viruses in physiologically normal appearing hosts.

Material and Methods

Animals

To further characterize viral maintenance in reservoir species, bicolored white-toothed shrews were caught alive. Trapping was performed at two sites in the administrative district of Swabia (permission No. 55.1-8646-2/75), a known endemic area for BoDV-1 infections and clinical apparent disease (Borna disease) in horses. After trapping, shrews were transported separately and put in husbandry. The animals were kept isolated from each other in single cages. They were kept in adapted standard cages type 4 and with respect to the natural requirements they were fed with a mixture of chicken heart muscle, chicken liver and insects. After an adaption period of 4 weeks and the initial veterinary care the animals stayed in husbandry for breeding. With respect to the high vulnerability to stress of wild-born animals, a health monitoring was installed. Once a day a visual examination of body condition, haired skin and behaviour was carried out and food intake was measured. Once a week body mass was recorded. The animals were monitored for any sign of direct abnormal behaviour or any indirect evidence like altered food intake, altered skin care or loss of body weight. In case of suffering, an early humane endpoint scheme adopted from laboratory rodents could be applied including euthanasia by anaesthesia conducted with CO₂ and decapitating. A postmortem examination scheme with evaluation of gross and histologic lesions could be performed to evaluate the cause of death.

For comparative analysis, tissues from three naturally BoDV-1-infected dead bicolored white-toothed shrews from pest control (#2001 and #5017, [17] and another animal #5072 from the same stable as #5017) were used.

Methods

At trapping, infection status of the animals was unknown therefore high hygiene standards were applied to avoid accidental transmission. To detect naturally BoDV-1-infected animals, first samples of skin surface were taken directly on first day in husbandry and screened for the presence of BoDV-1 RNA as described below. Non-infected animals were sampled in the same way. In animals caught in 2013 (group 1: female #2, male #5, female #6), after an adaption phase of one month, samples of saliva, lacrimal fluid, skin surface, urine and excrements from the BoDV-1-infected shrews were taken weekly over a period of 4 weeks as necessary veterinary care. Initial veterinary care could be reduced in animals caught in 2014 (#9, #10, #12) and only an initial sampling was performed. As health monitoring, possibility of long lasting virus shedding after at least more than 250 days in the husbandry was investigated and infected shrews (group 2: female #2, male #9, male #10, male #12) were sampled again. Quantitative amplification of BoDV-1 RNA was carried out by real time RT-PCR as described elsewhere [22] by using commercially available kits for RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (QIAasympyphony RNA Kit, OneStep RT-PCR kit, Qiagen).

Qualitative isolation of infectious virus was performed on rabbit embryonic brain cells (REB cells) according to Herzog et al., 1980 [23]. Briefly, cells were incubated with diluted samples from shrews no #2, #5, #6 and virus replication in REB cells was visualized by indirect immunofluorescence test [24]. Viral RNA was extracted from REB cells persistently infected with the isolated BoDV-1 by using commercially available kits for RNA-extraction (RNeasy Mini Kit,

Qiagen) and was sequenced according to previous protocols [25]. The nucleotide sequences were submitted to GenBank database.

Phylogenetic studies were performed as described elsewhere [25] using the Phylogeny Inference Program package, PHYLIP [26]. Representative sequences of all five regional BoDV-1 subclusters were obtained from GenBank (Group 1A: L27077, AY374524; Group 1B: AY374551, AY374550; Group 2: AY374521, AY374531; Group 3: AY374519, AY374534; Group 4: U04608, AY374522; Borna Disease Virus-2 AJ311524). Firstly, SEQBOOT program was used for testing stability of the trees by bootstrap resampling analysis of 100 replicates. Secondly, genetic distances between each pair of sequences were calculated based on the Kimura two-parameter model, transition/transversion ratio of 2, computed with the DNADIST program. Thirdly, using the neighbour-joining method of the NEIGHBOR program a phylogenetic tree was generated and printed out as a consensus tree by the CONSENSE program. Finally, the phylogenetic tree was displayed using SEAVIEW [27].

Immunohistochemistry (IHC) was carried out using the monoclonal anti-BoDV-1 nucleoprotein (BoDV-1-N) antibody Bo18 as described elsewhere [28, 29]. In-situ hybridization (ISH) to detect genomic RNA and respective mRNA sequences of the BoDV-1-N gene was performed additionally applying established protocols [29].

All statistical analyses were performed using Statistica 10 software package (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Female shrew #3 was excluded from the statistical analyses of relative body mass trend as it was used for breeding during the observation period and could therefore show changes of body mass due to pregnancy. Relative body mass trend was calculated by ratio of body mass of an individual at time point x to the body mass at day 1 of husbandry. Normality of data was assessed using Kolmogorov-Smirnov and Lilliefors tests. We used a Kruskal-Wallis test to assess significant differences in weekly body mass trend between individuals. We used Mann-Whitney-U test to test for significant differences relative in body mass trend between non-infected and infected shrews within the same week in husbandry. The criterion to accept statistical significance was $p < 0.05$.

Ethics Statement

Animal husbandry and health management were performed in accordance with the German law and were declared to the Animal Welfare Officer of the University, additional ethical waiver of an ethical Animal Care and Use Committee was not required. Prior to animals capture, capture protocol and gathering of animals were approved and permitted by the administrative district of Swabia (permission No. 55.1-8646-2/75) for establishing an insectivore animal model. Additional approval by an animal ethics committee for capture of wild animals was not required. Capture of wild animals was performed by skilled veterinarians according to the "Guidelines for the capture, handling and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists" of the Animal Care Use Committee [30]. Animals were kept in an animal facility of the Philipps-University in Marburg, animal housing was licenced (Az LRV FD 83.4.1-19c 20/21) by the administrative district of Marburg-Biedenkopf according to the law (Animal Welfare Act = "Tierschutzgesetz", §11) and to the guidelines of the Veterinarian Association for animal welfare (= "Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V."). Only non-invasive diagnostic sampling procedures during routine veterinary care were applied that did not need to be additionally approved by an animal ethics committee.

Rabbit embryonic brain cells were generated in the early 1990s by S. Herzog and frozen until usage. Generation of these primary cells was licenced (Gi 23-1/89) by the administrative district of Giessen.

Results

Eleven bicolorated white-toothed shrews were caught (4 females [#2, #3, #6, #8], 7 males [#1, #5, #7, #9, #10, #12, #13]). An overview about the different shrews is given in [S1 Table](#). As animals were integrated into husbandry at different time points, the observation period varied between the animals. In totally six out of eleven shrews (female #2, male #5, female #6, male #9, male #10, male #12) natural BoDV-1-infection was confirmed by detection of viral RNA, in three out of eleven shrews (female #2, male #5, female #6) additionally by detection of infectious virus. Two of the naturally infected shrews (male #5, female #6) died about 9 weeks after the start of the observation period (see below). The five other shrews did not exhibit any evidence for BoDV-1-infection, neither infectious virus nor viral RNA was detected at any time point investigated. During the whole observation period up to 600 days, activity and behaviour during day or night light regime and food intake did not differ between infected and non-infected animals. Furthermore, there was no significant difference of relative body mass trend between infected and non-infected individuals (Mann-Whitney U-test, $p > 0.06$ for each comparison) ([Fig 1](#)). There was also no significant difference of relative body mass trend between different weeks in husbandry of non-infected animals (Kruskal-Wallis-Test: $H(10;42) = 4.3123$; $p = 0.9322$) and between different weeks in husbandry of infected animals (Kruskal-Wallis-Test: $H(10;50) = 6.8237$; $p = 0.7420$). Body mass of the individual shrews are shown in [S1 Fig](#). Six shrews (#2, #7, #9, #10, #12, #13), both infected and non-infected ones, developed focal alopecia after 4 to 5 months. Two animals of group 1 (#5, #6) were found dead without previous symptoms shortly after the initial health monitoring. Post mortem examination revealed intestinal invagination as cause of death in one case and hepatitis and pneumonia without known etiology in the other case.

Infected animals caught in 2013 received an intensive initial health monitoring including shedding of the virus for 4 weeks. In these three naturally infected shrews (#2, #5, #6), viral RNA was present in saliva, lacrimal fluid, skin swabs, urine and faeces as well as in the ground substrate from their lairs ([Table 1](#)). During the observation period viral RNA was consistently present in swabs from saliva and skin, however detection varied in urine, lacrimal fluid and was solely sporadically possible in faeces. Ct-values were lowest in samples of saliva.

For the investigation of long lasting virus shedding BoDV-1 infected animals were sampled again after at least more than 250 days in the husbandry. In these four naturally infected shrews (#2, #9, #10, #12), viral RNA was present in swabs from saliva, lacrimal fluid, skin and urine, but was not detectable in faeces ([Table 2](#)). Ct-values varied between different animals and between the samples but were lowest in saliva in two animals.

Furthermore, infectious virus was successfully isolated on REB cells from all of the BoDV-1-positive shrews caught in 2013 (#2, #5, #6) in samples from saliva (#2, #6), skin/sebum (#2, #6) and urine (#5, #6) ([Fig 2](#)). Viral RNA of isolates from saliva of #2 and saliva of #6 was sequenced (GenBank accession no. KM349818, KM 349819). In a 2150 nucleotide stretch (nt 17 to 2161 covering the N, X, P, half of M-protein-encoding regions) sequences of both isolates revealed a homology of 99% compared to a recent BoDV-1-sequence (GenBank accession no. KF275185) obtained from a shrew of the same endemic area and to an equine BoDV-1-sequence from a horse housed in the same region (GenBank accession no. KF275184) [12]. Both isolates are part of the regional BoDV-1 subcluster 1a. ([Fig 3](#))

The results obtained from the living shrews were compared to the organ distribution of viral antigen and BoDV-1-RNA in three naturally BoDV-1-infected *C. leucodon* from pest control (#2001 and #5017, [12] and another animal #5072 from the same stable as #5017) and in the two deceased shrews. Detailed information about organ distribution is given in [S3 Fig](#). In all of these animals, mRNA, genomic RNA and/or viral antigen were detected in the nervous system

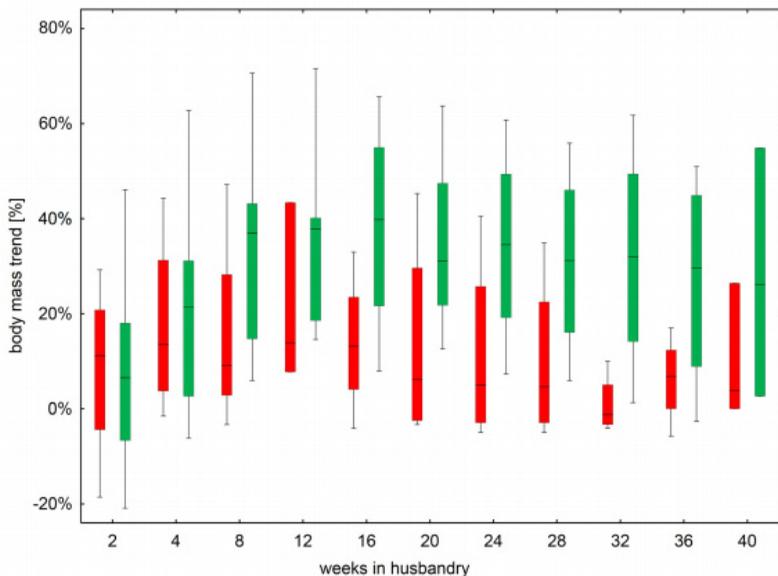


Fig 1. Relative body mass trend of non-infected and infected shrews. Relative body mass trend of non-infected and infected shrews at 11 time points (weeks in husbandry 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40) with no differences in non-infected (demonstrated in green, Kruskal-Wallis-Test: $H(10;42) = 4.3123$, $p = 0.9322$) and infected animals (demonstrated in red, Kruskal-Wallis-Test: $H(10;50) = 6.8237$; $p = 0.7420$) and between groups (Mann-Whitney U-test, $p > 0.06$)

doi:10.1371/journal.pone.0137018.g001

and widespread in peripheral organs (e.g. epithelial cells of the parotid gland, lacrimal gland, sebaceous glands, bronchi, kidney tubules, esophagus and epidermal keratocytes) [17] (Fig 4). Interestingly, viral antigen was also present in the uterus in one shrew. Thus, detection of viral RNA and infectious virus from secretions and excretions in the living shrews (saliva, lacrimal fluid, skin swabs, urine and faeces) fits well with the morphological demonstration of viral antigen and RNA in the respective organ systems and further confirms successful viral replication in peripheral organs. Beside virus shedding via secretions and excretions shedding of BoDV-1 seems also to be possible via scaling of epidermal epithelial cells.

Discussion

Reservoir-bound RNA viruses reside typically inconspicuously in animal reservoirs such as bats, rodents and insectivores. However, transmission routes, host-pathogen interactions

Table 1. Detection of BoDV-1* RNA in naturally infected bicolor white-toothed shrews over a period of 4 weeks.

Shrew	Sample	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
#2	Saliva	38 ^a	29,8 ^b	27,85 ^c	28,99 ^c
	Lacrimal fluid	34 ^a	nd*	27,3 ^c	- ^{c,*}
	Skin swab	36 ^a	34,5 ^b	29,48 ^c	30,2 ^c
	Urine	39 ^a	- ^b	30,07 ^c	nd
	Faeces	- ^a	36,3 ^b	31,59 ^c	- ^c
	Lair	nd	nd	nd	32,96 ^c
#5	Saliva	28,53 ^d	30,36 ^d	30,57 ^d	32,50 ^d
	Lacrimal fluid	32,15 ^d	33,12 ^d	34,48 ^d	36,38 ^d
	Skin swab	35,02 ^d	34,91 ^d	34,10 ^d	36,06 ^d
	Urine	34,68 ^d	38,86 ^d	34,83 ^d	35,59 ^d
	Faeces	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
	Lair	- ^d	35,50 ^d	- ^d	38,92 ^d
#6	Saliva	31,12 ^d	33,31 ^d	33,35 ^d	31,27 ^d
	Lacrimal fluid	35,06 ^d	35,61 ^d	36,60 ^d	32,95 ^d
	Skin swab	36,4 ^d	36,97 ^d	36,89 ^d	32,97 ^d
	Urine	37,34 ^d	36,41 ^d	- ^d	34,47 ^d
	Faeces	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
	Lair	35,64 ^d	- ^d	- ^d	33,04 ^d

Footnote [Table 1](#): * BoDV-1 = Borna disease virus; — = negative; nd = not done
 Results are presented as ct-values of different real time RT-PCR runs: a = first run; b = second run; c = third run; d = fourth run

doi:10.1371/journal.pone.0137018.t001

Table 2. Detection of BoDV-1* RNA in naturally infected bicolor white-toothed shrews after more than at least 250 days in husbandry.

Shrew	time point of sampling	Sample	ct-value
#2	634 days a.c. *	Saliva	32,44
		Lacrimal fluid	34,93
		Skin swab	nd*
		Urine	33,94
		Faeces	-*
#9	315 days a.c.	Saliva	27,4
		Lacrimal fluid	26,76
		Skin swab	31,64
		Urine	nd
		Faeces	-
#10	315 days a.c.	Saliva	25,95
		Lacrimal fluid	29,62
		Skin swab	33,93
		Urine	nd
		Faeces	-
#12	284 days a.c.	Saliva	34,47
		Lacrimal fluid	32,21
		Skin swab	33
		Urine	32,19
		Faeces	-

Footnote [Table 2](#): * BoDV-1 = Borna disease virus; a.c. = after capture; — = negative; nd = not done;
 Results are presented as ct-values

doi:10.1371/journal.pone.0137018.t002

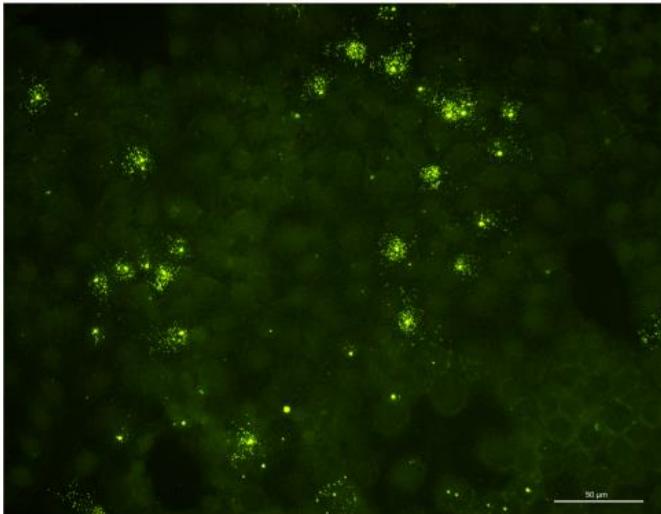


Fig 2. Detection of Borna disease virus-1 isolated from saliva (shrew #2) in rabbit embryonic brain cells (3rd passage after isolation). Immunofluorescence, polyclonal anti-BoDV-1 rat serum.

doi:10.1371/journal.pone.0137018.g002

necessary for viral maintenance in the respective animal population and factors needed to cross the species barrier are still rudimentarily known. Thus, reliable animal models are urgently needed. The order *Mononegavirales* comprises many viruses with high zoonotic and pathogenic properties, e.g. *filoviruses*, *henipaviruses*, *paramyxoviruses* and *lyssaviruses* which reside in bat reservoirs [7, 31]. In their biological behaviour, bornaviruses, as known from the mammalian Borna disease virus-1 (BoDV-1), are unique [10, 32], but in several aspects pretty comparable to other neurotropic *Mononegavirales*. The recently found zoonotic variegated squirrel 1 Bornavirus (VSBV-1) clearly differs in its homology to the classical mammalian BoDV-1 but provides evidence for its zoonotic capacities [10]. As the current knowledge is sparse, it is not known if VSBV-1 share features with BoDV-1 behaviour. However, detection of VSBV-1 in several organs including CNS and peripheral organs like lung and kidney of the squirrel [10] also indicate a widespread virus distribution comparable to the BoDV-1 infected bicolored white-toothed shrew.

Typically shrews rear up to four litters from March to September and winter resource shortage is the most important source for mortality [33]. Trapping took place during summer and autumn, therefore caught shrews were likely born in the same year and the age at time of trapping could be estimated between 1 to 6 months. As most of the offspring settles locally [33] kinship between the individuals and joint rearing cannot be excluded.

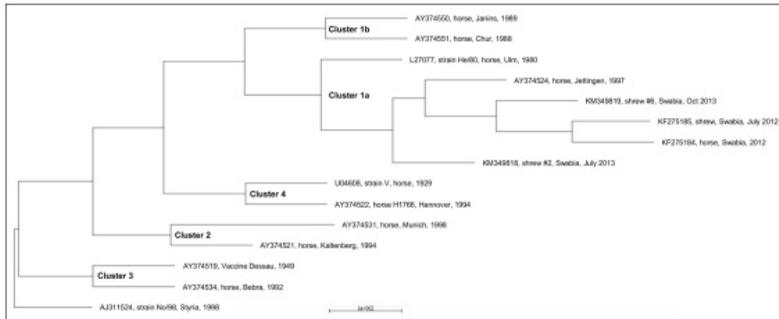


Fig 3. Phylogenetic analysis of BoDV-1 sequences obtained from isolated virus. 2150 nt long nucleic sequences comprising N, P, X genes of two isolated virus isolates (shrew #2, shrew #6), two sequences obtained from a shrew and a horse of the same region (KF275184, KF275185) and other representative BoDV-1 of endemic subclusters [25]. Cluster 1: Southwest Germany and Southern Rhine valley group with Cluster 1a: Baden-Württemberg and parts of Bavaria, Germany (L27077, AY374524) and Cluster 1b: Switzerland, The Principality of Liechtenstein and Austria (AY374550, AY374551), Cluster 2: South German Group (AY374521, AY374531), Cluster 3: Southern Saxony-Anhalt and Saxony (AY374519, AY374534), Cluster 4: Central German group (U04608, AY374522). Tree is rooted with BoDV-2 (AJ311524).

doi:10.1371/journal.pone.0137018.g003

During trapping, infection status of the individuals was unknown. Previous studies showed different infection prevalence of shrews that also differed between the trapping sites in the study. Hilde et al. [14] found only infected shrews (100%), Puorger et al. [15] detected 2/6 infected shrews (33%), Bourg et al. [17] showed 1/1 infected shrews (100%) at one site und 1/19 infected shrews (5%) at the other site whereas Dürrwald et al. [18] found an amount of 9/17 infected shrews (53%) at one site with a variance between the years from 25% to 100%. These differences can be due to the small number of animals in the respective population or represent the natural variation within the shrew population between sites and years. Since examination of larger cohorts has not been carried out so far, the percentage of naturally infected shrews among the trapped animals could not be predicted in detail. Six naturally infected shrews out of eleven shrews implies a percentage of 55% of infected shrews with variations between the sites and years from 50% (site A, year 2013 3/6, year 2014 1/2) to 66% (site B, year 2014 2/3). As all non-infected animals did not show any shedding during the whole observation period, transmission of the virus in the husbandry could be successfully prevented in captivity.

Current data from living shrews provide reliable evidence that natural BoDV-1-infection in these animals is indeed clinically inconspicuous over a long time period as already previously assumed [15, 18] despite persistent infection with shedding of infectious virus via various sites. During the observation period of up to 600 days, only two naturally infected animals were lost due to an intestinal invagination in one case and hepatitis/pneumonia in the other case which did not seem to be directly related to BoDV-1 infection. In the bronchial epithelium of the animal suffering from hepatitis/pneumonia only few cells harboured BoDV-1 nucleoprotein, BoDV-1 mRNA and genomic RNA without associated distribution to the pneumonia and in the liver only genomic RNA was detected in very few cells.

Interestingly, shedding of viral RNA was continuously present. As shrews were naturally infected before trapping, the time between the infection and first virus release remain

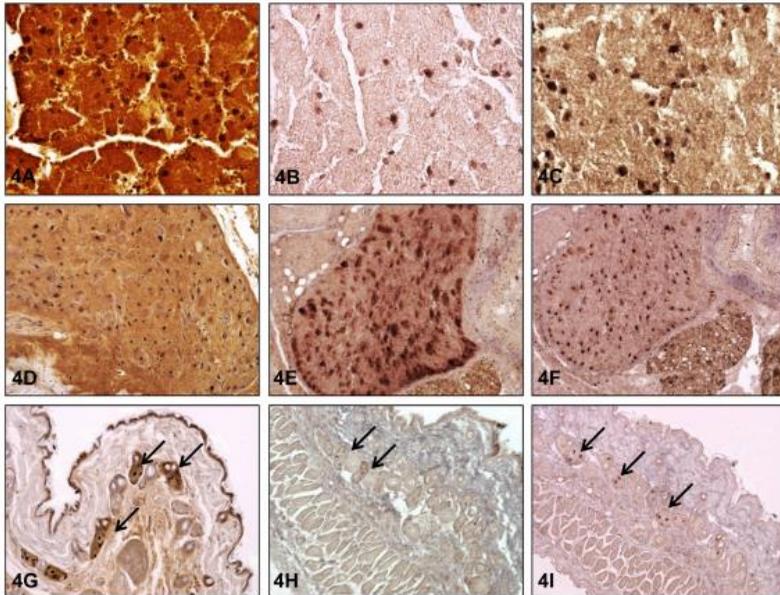


Fig 4. Demonstration of BoDV-1 nucleoprotein, messenger RNA and genomic RNA. (A) Demonstration of BoDV-1 nucleoprotein by immunohistochemistry (IHC) in the brain of *C. leucodon* #5017; (B) Demonstration of BoDV-1 messenger RNA by in-situ hybridization (ISH) in the brain of *C. leucodon* #5017; (C) Demonstration of genomic BoDV-1 RNA by ISH in the brain of *C. leucodon* #5017; (D) Demonstration of BoDV-1 nucleoprotein by IHC in the trigeminal ganglion of *C. leucodon* #2001; (E) Demonstration of BoDV-1 messenger RNA by in-situ hybridization (ISH) in the trigeminal ganglion of *C. leucodon* #2001; (F) Demonstration of genomic BoDV-1 RNA by ISH in the trigeminal ganglion of *C. leucodon* #2001; (G) Demonstration of BoDV-1 nucleoprotein by IHC in the skin, mainly in the sebaceous glands of *C. leucodon* #2001; (H) Demonstration of BoDV-1 messenger RNA by in-situ hybridization (ISH) in the skin, mainly in the sebaceous glands of *C. leucodon* #2001; (I) Demonstration of genomic BoDV-1 RNA by ISH in the skin, mainly in the sebaceous glands of *C. leucodon* #2001.

doi:10.1371/journal.pone.0137018.g004

unknown. However, low ct-values were found in samples taken at time points at least more than 4 to 8 weeks after infection and at time points at least more than 200 days after infection. This indicates a persistent BoDV-1 infection as known from other animals [11, 13] with long lasting and continuous virus release. There was certain variability in the amount of viral RNA, sites of shedding, between individual animals and for the time points of sampling. Some of these variations can be due to variations in sample size, as gathering of samples had to be performed non-invasive on non-anaesthetized animals. However, several shrews exhibited lowest ct-values in saliva and lacrimal fluid regardless of time point of sampling. Whether this might have a role for virus transmission, e.g. combating, needs to be further investigated.

The simultaneous presence of viral antigen, viral mRNA and genomic RNA in CNS and peripheral tissues points to many sites of viral replication thereby enhancing probability of successful virus transmission to other animals [17]. Horizontal transmission of BoDV-1 in shrews might be either achieved via direct contact with secretions or excretions or even via contaminated environment. Since shrews are known to behave territorially, infection by infected saliva during combatting for a habitat might also occur. Vertical transmission of BoDV-1 in shrews cannot be excluded as viral antigen has been detected in the uterus. However, the route of entry in the reservoir still remains unknown. Offspring might already be infected early by their mothers due to the various sites of viral shedding even from the skin. The underlying viral mechanisms of maintenance in the reservoir are still incompletely understood but might include adjusted viral life cycle possibly with attenuated pathogenicity, differences in viral entry and circumvention of the antiviral host immune system [4, 34, 35]. The latter could be achieved best in specific situations of the host immune system. Infection of animals in an immune-incompetent stage can lead to persistent, immune-tolerant virus infections, often associated with shedding of high doses of infectious virus and without any severe clinical signs and notable inflammatory lesions. To date it remains unknown whether disseminated BoDV-1 infection of shrews is only possible when infected in an immune incompetent state as known for rats [19]. However, the clinical inconspicuous course could point to an immune tolerant infection and a highly adapted viral-host interaction. Neonatally BoDV-1 infected rats display no neurological signs but increased motor activity, learning deficits and subtle changes in social behaviour and memory [36, 37]. Moreover, experimental BoDV-1 infection of the prosimian tree shrew (*Tupaia glis*) leads to a persistent infection and transient mild encephalitis, resulting in a disorder characterized primarily by hyperactivity and pronounced disturbances in social and breeding behavior rather than neurological signs [38]. In the neonatally BoDV-1 infected rat the behavioral changes were attributed to lesions in the hippocampus and cerebellum and in the tree shrew to alterations of the limbic system. Whether naturally BoDV-1 infected shrews also display subtle deficits in learning, memory and/or social behavior, especially mating, needs to be addressed in further behavioral and breeding experiments. As known so far, *C. leucodon* did not exhibit any morphological changes in cerebellum, hippocampus or elsewhere in the brain as noted for the neonatally infected rat. However, any behavioral changes might contribute to higher contact frequency or increased aggressive and territorial behavior thereby facilitating viral transmission and maintenance in the reservoir.

Characteristics of the shrew population correspond well to the epidemiologic pattern of Borna disease. The distribution of *C. leucodon* in Bavaria and the prevalence of Borna disease seem to be connected [16]. The yearly varying peaks of Borna disease in accidental hosts and the decline of Borna disease within the last decades could be related to population dynamics of the shrews between the years and the restriction of habitats indirectly caused by modern agriculture [18]. Inbreeding and low dispersal distance of the offspring correlates with the limited distribution of BoDV-1 within endemic territories [18].

Moreover, the continuous secretion and excretion of infectious BoDV-1 and the detection of viral RNA in the lair substantiates the hypothesis that "infectious dust" is responsible for BoDV-1 transmission to accidental hosts through the intranasal route as known for hantavirus infections [39]. In this scenario, the BoDV-1 infection of horses and sheep might rather represent an accidental occasion. To date it still remains to be solved whether and which factors are responsible for successful crossing the species barrier. Amount of infectious virus, virulence, immune status and age of reservoir and accidental host as well as their genetic makeup might function as essential co-factors.

Taken together, shedding of BoDV-1 in the bicolored white-toothed shrew is achieved via various routes which enable successful viral maintenance in the reservoir population and even

fatal transmission to susceptible accidental hosts such as horses and sheep. Moreover, these animals serve as suitable model to investigate host and pathogen factors that enable persistent viral co-existence in apparently healthy carriers.

Supporting Information

S1 Fig. Body mass change infected individuals [g].
(TIF)

S2 Fig. Body mass change non-infected animals [g].
(TIF)

S3 Fig. Organ distribution of BoDV-1 nucleoprotein, mRNA and genomic BoDV-1 RNA of individual shrews.
(PDF)

S4 Fig. No detection of BoDV-1 antigen or RNA in a non infected shrew by immunohistochemistry and in-situ hybridization, shrew was trapped dead by pest control.
(TIF)

S1 Table. Overview of individual shrews of the study.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Franz Schmid (Veterinäramt Günzburg) for his helpful support and cooperation. H. Lange-Herbst is supported by the Margarete Ammon-Stiftung.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DN MB SH HLH JAE ME CH. Performed the experiments: DN MB SH HLH ME. Analyzed the data: DN MB SH HLH JAE ME CH. Contributed reagents/materials/analysis tools: SH JAE ME CH. Wrote the paper: DN MB SH HLH JAE ME CH.

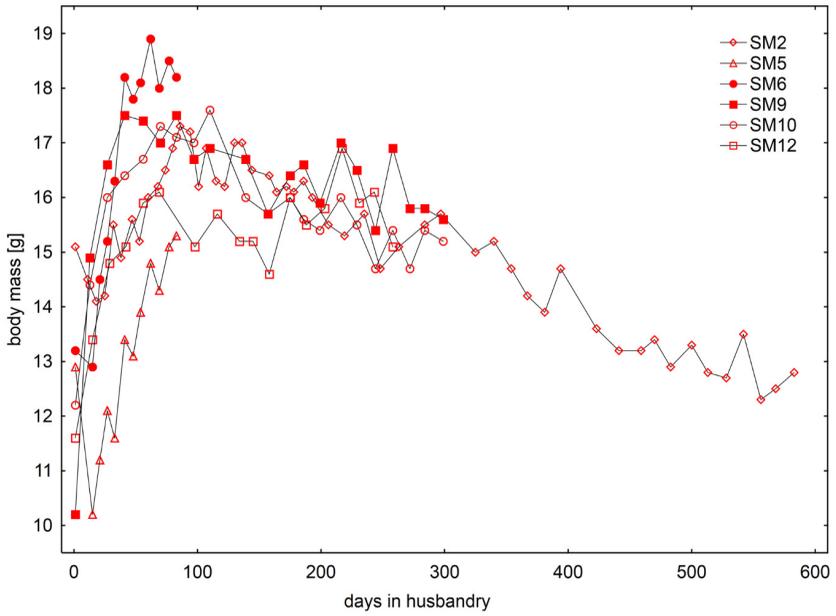
References

- Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH (2010) Public health threat of new, reemerging and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis* 16: 1–7. doi: [10.3201/eid1601.081467](https://doi.org/10.3201/eid1601.081467) PMID: [20031036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20031036/)
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990–993. doi: [10.1038/nature06536](https://doi.org/10.1038/nature06536) PMID: [18288193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18288193/)
- Eickmann M, Becker S, Klenk HD, Doerr HW, Stadler K, Censini S, et al. (2003) Phylogeny of the SARS coronavirus. *Science* 302: 1504–1505.
- Griffin DE (2009) Emergence and re-emergence of viral disease of the central nervous system. *Progress in Neurobiology* doi: [10.1016/j.pneurobio.2009.12.003](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.003)
- Sejvar JJ (2006) The evolving epidemiology of viral encephalitis. *Current Opinion in Neurology* 19: 350–357. PMID: [16914972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16914972/)
- Tyler KL (2009) Emerging viral infections of the central nervous system. *Arch Neurol* 66: Part 1: 939–948, Part 2: 1065–1074.
- Calisher CD, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006) Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19: 531–45. PMID: [16847084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16847084/)
- Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, et al (2012) Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 3: 796 doi: [10.1038/ncomms1796](https://doi.org/10.1038/ncomms1796) PMID: [22531181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22531181/)

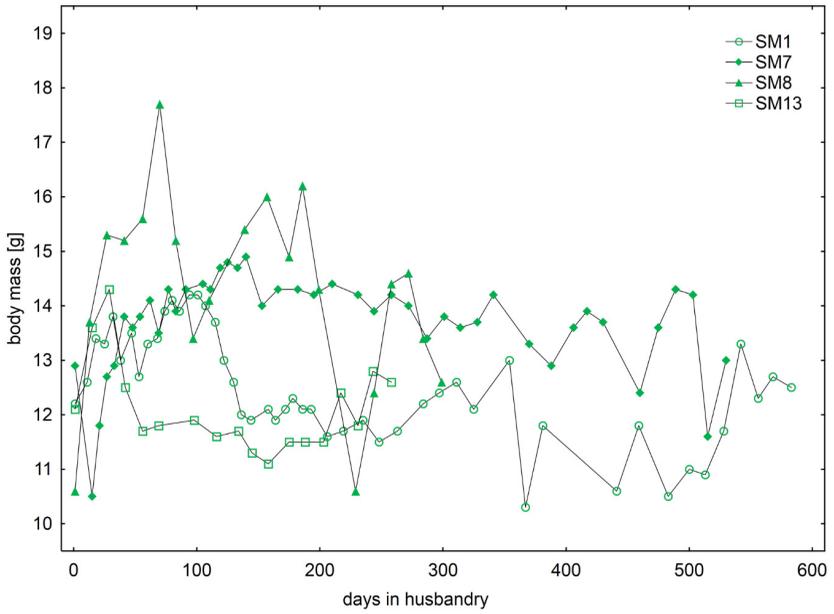
9. Kuhn JH, Dürwald R, Bao Y, Briese T, Carbone K, Clawson AN, et al (2015) Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch Virol* (2015) 160:621–632. doi: [10.1007/s00705-014-2276-z](https://doi.org/10.1007/s00705-014-2276-z) PMID: [25449305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25449305/)
10. Hoffmann B, Tappe D, Höpfer D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, et al (2015) A Variegated Squirrel Borna-virus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med* 2015; 373:154–62. doi: [10.1056/NEJMoa1415667](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1415667) PMID: [26154788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26154788/)
11. Herden C, et al. (2013) Bornaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields of Virology* Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1124–1150.
12. Dürwald R, Kolodziejek J, Muluneh A, Herzog S, Nowotny N (2006) Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease virus point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes Infect* 8: 917–929. PMID: [16469519](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16469519/)
13. Vahlenkamp TW, Kourath A, Weber M, Müller H (2002) Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* 76: 9735–9743. PMID: [12208952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12208952/)
14. Hilbe M, Hersche R, Kolodziejek J, Nowotny N, Ehrensperger F (2006) Shrews as Reservoir Hosts of Borna Disease Virus. *Emerg Infect Dis*; 12(4):675–7. PMID: [16704819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16704819/)
15. Puorger ME, Hilbe M, Müller JP, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinszky K, et al. (2010) 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* 47(2): 236–244. doi: [10.1177/0300985809351849](https://doi.org/10.1177/0300985809351849) PMID: [20133953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133953/)
16. Encarnação JA, Herzog S, Eickmann M, Becker NI, Hermes N, Herden C (2013) Landscape features and reservoir occurrence affecting the risk for equine infection with Borna disease virus. *J Wildl Dis* 49 (4):860–8. doi: [10.7589/2012-10-382](https://doi.org/10.7589/2012-10-382) PMID: [24592713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24592713/)
17. Bourg M, Herzog S, Encarnação JA, Nobach D, Lange-Herbst H, Eickmann M, et al. (2013) Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis* doi: [10.3201/eid1912.131076](https://doi.org/10.3201/eid1912.131076)
18. Dürwald R, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N (2014) The Bicolored white-toothed shrew *Crocidura leucodon* is an indigenous host of Mammalian Borna Disease Virus. *PLoS One*. 2014 Apr. 3; 9 (4):e93659. doi: [10.1371/journal.pone.0093659](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093659) PMID: [24699336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24699336/)
19. Herzog S, Kompler C, Frese K, Rott R (1984) Replication of Borna disease virus in rats: age dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol* 173 (4): 171–7. PMID: [6439886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6439886/)
20. Hallensleben W, Schwemmer M, Hausmann J, Stitz L, Volk B, Pagenstecker A, et al. (1998) Borna Disease Virus-Induced Neurological Disorder in Mice: Infection of Neonates results in Immunopathology. *J Virol* 72(5):4379–86. PMID: [9557729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9557729/)
21. Kramer K, Schaudien D, Eisel UL, Herzog S, Richt JA, Baumgärtner W, et al. (2012) 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](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041476) PMID: [22848506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22848506/)
22. Schindler AR, Vogtlin A, Hilbe M, Puorger M, Zlinszky K, Ackermann M, et al. (2007) Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes* 2007; 21:47–55. PMID: [17014884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17014884/)
23. Herzog S, Rott R (1980) Replication of Borna Disease Virus in Cell Cultures *Med Microbiol Immunol* 168, 153–158. PMID: [6772332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6772332/)
24. Herzog S, Enderlein D, Heffels-Redmann U, Piepenbring A, Neumann D, Kaleta EF, et al. (2010) Indirect Immunofluorescence Assay for Intra Vitam Diagnosis of Avian Bornavirus Infection in Psittacine Birds. *J Clin Microbiol*; 48 (6): 2282–4. doi: [10.1128/JCM.00145-10](https://doi.org/10.1128/JCM.00145-10) PMID: [20392921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20392921/)
25. Kolodziejek J, Dürwald R, Herzog S, Ehrensperger F, Lussy H, Nowotny N (2005) Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol*, 86, 385–398. PMID: [15659758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15659758/)
26. Feisenstein J (2005). PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.6. *Distributed by the author*. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
27. Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221–224. doi: [10.1093/molbev/msp259](https://doi.org/10.1093/molbev/msp259) PMID: [19854763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19854763/)
28. Herden C, Herzog S, Richt JA, Nessler A, Christ M, Failing K, et al. (2000) Distribution of Borna Disease Virus in the Brain of Rats Infected with an Obesity-inducing Virus Strain. *Brain Pathol*; 10:39–48. PMID: [10668894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10668894/)
29. Werner-Keils N, Garten W, Richt JA, Porombka D, Algermissen D, Herzog S, et al. (2008) Restricted expression of Borna Disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 34:590–602. doi: [10.1111/j.1365-2990.2008.00940.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00940.x) PMID: [16262160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16262160/)

30. Animal Care Use Committee (1998) Guidelines for the capture, handling and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *J Mammal* 79:1416–1431
31. Wong S, Lau S, Woo P, Yuen KY (2007) Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol* 17: 67–91 e. PMID: [17342030](#)
32. De la Torre JC (2006) Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease. *Nature Rev Microbiol* 4: 777–83.
33. Duarte LC, Bouteiller C, Fontanillas P, Petit E, Perrin N (2003) Inbreeding in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Evolution* 57:638–645 PMID: [12703953](#)
34. Brandes G, Khayami M, Peck CT, Baumgärtner W, Bugday H, Wewetzer K (2011) Cell surface expression of 27C7 by neonatal rat olfactory ensheathing cells in situ and in vitro is independent of axonal contact. *Histochem Cell Biol* 135: 397–408. doi: [10.1007/s00419-011-0796-0](#) PMID: [21437623](#)
35. Schneider DS, Ayres JS (2008) Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 8: 689–95. doi: [10.1038/nri2432](#) PMID: [18827577](#)
36. Bautista JR, Schwartz GJ, De La Torre JC, Moran TH, Carbone KM (1994) Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull* 34:31–40. PMID: [8193931](#)
37. Rubin SA, Sylves P, Vogel M, Plethnikov M, Moran TH, Schwartz GJ, et al. (1999) Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res Bull* 48: 23–30. PMID: [10210164](#)
38. Sprankel H, Richarz K, Ludwig H, Rott R (1978) Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*) induced by Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol* 165:1–18. PMID: [566371](#)
39. Schwarz AC, Rant U, Piechotowski I, Childs JE, Brockmann SO (2009) Risk factors for human infection with Puumala virus, southwestern Germany. *Emerg Infect Dis* 15(7):1032–9. doi: [10.3201/eid1507.081413](#) PMID: [19624917](#)

S1 Fig. Body mass change infected individuals [g]



S2 Fig. Body mass change non-infected animals [g]



S3 Fig. Organ distribution of BoDV-1 nucleoprotein, mRNA and genomic BoDV-1 RNA of individual shrews.

Overview of detection of BoDV-1 nucleoprotein, mRNA and genomic RNA in BoDV-1 infected bicolor white-toothed shrews.

	#2001			#5017			#5072		
	male			female			female		
	IHC	ISH gen. RNA	ISH mRNA	IHC	ISH gen. RNA	ISH mRNA	IHC	ISH gen. RNA	ISH mRNA
Brain	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Trigeminal ganglion	+++	+++	+++	±	±	±	++	+++	±
Peripheral nerves	+++	+++	+++	±	±	±	+++	+++	±
Salivary gland	(+)	++	++	±	-	-	±	(+)	(+)
Lacrimal gland	++(+)	++	++	not evaluable	not evaluable	not evaluable	++(+)	+++	++
Heart	not evaluable	-	±	-					
Lung, bronchial epithelium	++	±	±	±	±	±	±	++	±
Esophagus	++	±	++	not evaluable	±	±	-	++	++
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	not evaluable								
Intestine, muscular layer	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney, tubulus epithelium	-	not evaluable	not evaluable	±	±	±	-	-	-
Skin, corneal epithelium	-	±	±	±	±	±	-	kA	kA
Sebaceous gland	+++	+++	+++	+++	++(+)	++	not evaluable	-	-
Olfactory epithelium	++	±	±	±	±	±	++	+++	++(+)
Spinal cord	+++	±	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Spinal ganglion	(+)	not evaluable	not evaluable	±	±	±	++	+++	+++
Mamma	not evaluable	-	-	-					
Uterus	not evaluable	++	++	±					
Testis	++(+)	(+)	±	not evaluable					

+++ = high signal; ++ = moderate signal; + = low signal; - = no signal
 IHC = immunohistochemistry; ISH = in-situ hybridization

	#5			#6		
	male			female		
	IHC	ISH gen. RNA	ISH mRNA	IHC	ISH gen. RNA	ISH mRNA
Brain	++	+++	++	+++	+++	±
Trigeminal ganglion	++	++	++	++	++	++
Peripheral nerves	++	±	±	++	++	±
Salivary gland	++	++	±	±	++	++
Lacrimal gland	++	++	-	++	++	±
Heart	-	-	-	-	-	-
Lung, bronchial epithelium	++	++	++	±	(+)	(+)
Esophagus	++	±	-	±	-	-
Liver	-	-	-	-	±	-
Spleen	±	-	-	-	-	-
Intestine, muscular layer	±	++	-	++	++	±
Kidney, tubulus epithelium	-	±	-	±	(+)	(+)
Skin, corneal epithelium	-	±	-	±	++	±
Sebaceous gland	-	++	-	++	++	±
Olfactory epithelium	±	++	-	±	±	-
Spinal cord	+++	±	±	+++	++	+++
Spinal ganglion	+++	±	±	+++	++	+++
Mamma	not evaluable	not evaluable	not evaluable	-	-	-
Uterus	not evaluable					
Testis	not evaluable					

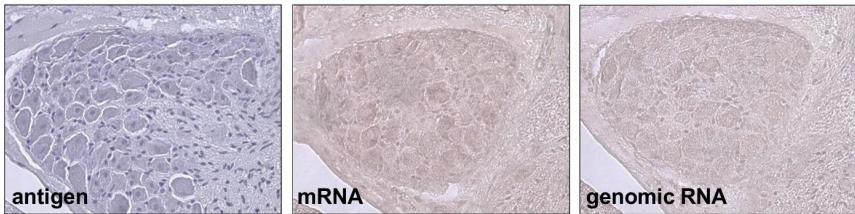
+++ = high signal; ++ = moderate signal; + = low signal; - = no signal
 IHC = immunohistochemistry; ISH = in-situ hybridization

S4 Fig. No detection of BoDV-1 antigen or RNA in a non infected shrew by immunohistochemistry and in-situ hybridization, shrew was trapped dead by pest control.

brain



ganglion



S1 Table. Overview of individual shrews of the study

shrew	sex	time of trapping	trapping site	days in husbandry	BoDV-1 infected	trial group
#1	male	July 2013	site A	> 600	-	
#2	female	July 2013	site A	> 600	+	1*, 2*
#3	female	September 2013	site A	> 500	-	
#5	male	October 2013	site A	70	+	1
#6	female	October 2013	site A	70	+	1
#7	male	October 2013	site A	> 500	-	
#8	female	June 2014	site B	> 300	-	
#9	male	June 2014	site B	> 300	+	2
#10	male	June 2014	site B	> 300	+	2
#12	male	July 2014	site A	> 250	+	2
#13	male	July 2014	site A	> 250	-	

Footnotes Table S1: * trial group 1 = shrews that received intensive initial health monitoring; trial group 2 = shrews sampled for investigation of long lasting virus shedding

4 Artikel 2

Daniel Nobach, Christiane Herden

No evidence for European bats serving as reservoir for Borna disease virus 1 or other known mammalian orthobornaviruses

Virology Journal (2020) 17:11

RESEARCH

Open Access



No evidence for European bats serving as reservoir for Borna disease virus 1 or other known mammalian orthobornaviruses

Daniel Nobach^{1*} and Christiane Herden^{1,2}**Abstract**

Background: The majority of emerging infectious diseases are zoonotic in nature and originate from wildlife reservoirs. Borna disease, caused by Borna disease virus 1 (BoDV-1), is an infectious disease affecting mammals, but recently it has also been shown to cause fatal encephalitis in humans. The endemic character of Borna disease points towards a nature-bound reservoir, with only one shrew species identified as reservoir host to date. Bats have been identified as reservoirs of a variety of zoonotic infectious agents. Endogenous borna-like elements in the genome of certain bat species additionally point towards co-evolution of bats with bornaviruses and therefore raise the question whether bats could serve as a potential reservoir of orthobornaviruses.

Methods: Frozen brain samples ($n = 257$) of bats of seven different genera from Germany were investigated by orthobornaviral RT-PCR. Additionally, tissue slides of formalin-fixed paraffin-embedded material of a subset of these bats ($n = 140$) were investigated for orthobornaviral phosphoprotein by immunohistochemistry.

Results: The brain samples were tested by RT-PCR without any evidence of orthobornavirus specific amplicons. Immunohistochemistry revealed a faint immunoreaction in 3/140 bats but with an untypical staining pattern for viral antigen.

Conclusions: RT-PCR-screening showed no evidence for orthobornaviral RNA in the investigated bats. However, immunohistochemistry results should be investigated further to elucidate whether the reaction might be associated with expressed endogenous bornaviral elements or other so far unknown bornaviruses.

Keywords: Borna disease virus 1, Reservoir, Bats, Bavaria, Germany, Bornaviridae

Background

The increasing incidence of emerging infectious diseases (EID) represents a threat to public health. Interestingly, the majority of these EIDs are zoonotic in nature and originate from wildlife reservoirs. Due to their biological characteristics, particularly bats have been identified as reservoirs for many emerging viruses [1].

Many of these emerging viruses are RNA-viruses of the order *Mononegavirales*. In this order, the virus family *Bornaviridae* has been growing remarkably during recent years due to the discovery of several new species and genera. As of 2019, the taxonomy comprises three genera: *Carbovirus*, *Cultervirus* and *Orthobornavirus* [2].

Of the genus *Orthobornavirus*, two species, *Mammalian 1 orthobornavirus* and *Mammalian 2 orthobornavirus*, are known to affect mammals. Belonging to *Mammalian 1 orthobornavirus*, Borna disease virus 1 (BoDV-1) is still the most prevalent bornavirus in mammals. BoDV-1 is well known to cause severe and fatal neurological Borna disease in a variety of mammals, mainly horses and sheep. Recently BoDV-1 was identified as causal agent in fatal human encephalitis cases [3, 4]. This underlines the need to unravel potential sources of infection in order to prevent further animal and human cases, especially since no curative therapy or vaccination exists [3, 4].

Endemic areas for Borna disease are located in central Europe, such as Bavaria, Saxony-Anhalt and Saxony in Germany, St. Gallen and Canton of Grisons in Switzerland and Vorarlberg and Upper Austria in Austria [5, 6].

* Correspondence: Daniel.nobach@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



© The Author(s). 2020 **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.

Phylogeny of BoDV-1 isolates reflects their geographical origin and respective endemic regions regardless of the host species they have been isolated from [5]. The endemic character, strong conservation of the viral genome and seasonal occurrence of the disease already pointed to a potential wildlife reservoir [7]. As the sequences of BD cases from neighbouring locations are particularly stable even over years, this wildlife reservoir was assumed to be territorially bound [5]. In several of the endemic areas, the bicolored white-toothed shrew (*Crocidura leucodon*), belonging to the order Eulipotyphla, has been identified as natural reservoir of BoDV-1 [6, 8, 9]. However, beside the bicolored white-toothed shrew, no other reservoir, neither Eulipotyphla nor rodent, has been found yet. Bank voles have been experimentally proven to be susceptible to BoDV-1 [10] and serum antibodies against bornaviruses have been detected in free ranging bank voles [11]. Nevertheless, there is no evidence for naturally infected bank voles in endemic areas to date. Serological data have shown that several other free ranging small mammals, mostly belonging to the order of Rodentia, can also exhibit serum antibodies against *Bornaviridae*, but without any other evidence of BoDV-1-infection [9]. Only bicolored white-toothed shrews display a disseminated virus distribution and harbour BoDV-1 in excretory and secretory organs [9, 12] and shed infectious virus which suggests that they can transmit BoDV-1 [13].

Although several rodents and other small mammals are known as important reservoirs for many viruses, bats (order: Chiroptera) represent the vast majority of identified natural reservoirs of several virus families/species to date [1, 14]. For example, bats are known reservoirs for a growing list of RNA viruses, including rabies virus and other lyssaviruses, henipaviruses, coronaviruses and ebola virus [15]. Virus infections in bats follow the typical pattern of reservoirs with a persistent course lacking clinical disease [1, 16]. Several biological characteristics including gregariousness with large colonies, seasonal migrating and long life span make bats suitable to carry and spread viruses [16]. Seasonal migrating and wide hunting territories of bats can lead to wide distribution of harboured viruses [1], however, shedding in pulses and additional local factors can lead to local transmission events [16]. In Europe, 35 bat species from the order Chiroptera can be found [17]. These European bats share the same biological characteristics, but transmission events of zoonotic viruses are rare due to smaller dimensions of populations and colonies [18]. In Germany, 25 bat species can be encountered from the family Rhinolophidae and Vespertilionidae [19]. They include common native species, such as members of the genera *Pipistrellus*, *Myotis* and *Vespertilio*, and some seriously endangered species like *Rhinolophus hipposideros*, *Myotis emarginatus* and *Barbastella barbastellus* [19].

Several bat species, for example *Myotis natterii*, use roosts in barns and stables [20], which facilitates the possibility of virus transmission to livestock [18].

In addition, endogenous bornavirus-like elements (EBL) have been detected in the genome of several bat species [21–24]. These EBL are DNA-sequences in bat genomes displaying considerable sequence identities to present-day bornaviral genes on amino acid level of about 30–50% [25]. In some bat species, transcription of EBL similar to the bornaviral RNA-dependent RNA-polymerase has been reported [22]. Further analysis of these EBL strongly hint at ancestral and repeated contact between bats and bornaviruses during their evolution at least 11,8 million years ago [23, 26]. The function of these EBL is still discussed and an immunological benefit in the interaction with bornaviruses has been suggested in some mammalian species [22, 27]. As the retaining of the expressed EBL in the bat genome despite evolutionary selection requires resources, a benefit of the EBL and regular encounters between bornaviruses and bats during evolution seem plausible [22].

In conclusion, due to the continuous detection of new viruses in bats, the unclear situation regarding additional potential BoDV-1-reservoirs and molecular evidence for co-evolution of bats and bornaviruses, this study was conducted to investigate the potential presence of the most common orthobornaviruses in bats from endemic and non-endemic areas in Germany.

Methods

Two hundred fifty-seven brain samples of bats from Germany (97 from endemic regions in Bavaria) were provided by the Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW), Berlin (79 *Pipistrellus sp.*, 67 *Nyctalus sp.*, 57 *Myotis sp.*, 22 *Eptesicus sp.*, 17 *Vespertilio sp.*, 12 *Plecotus sp.*, 2 *Barbastella sp.*, 1 bat without species identification), and stored frozen at -80°C . Additionally, bat organs from diagnostic necropsies archived as formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material of 101 bats from the German federal state of Bavaria (31 *Pipistrellus sp.*, 14 *Vespertilio sp.*, 12 *Eptesicus sp.*, 12 *Nyctalus sp.*, 10 *Plecotus sp.*, 8 *Myotis sp.*) and 39 bats from the federal state of Hesse (5 *Myotis sp.*, 2 *Pipistrellus sp.*, 2 *Plecotus sp.*, 1 *Nyctalus sp.*, 29 bats without species identification) were provided by the Leibniz-IZW, the State Veterinary Institute of Giessen (Landesbetrieb Hessisches Landeslabor) and the Department of Animal Ecology and Systematics, Giessen. All organ tissues were retrieved from diagnostic necropsy material from carcasses submitted by bat rehabilitation centres and bat researchers in Germany to the respective institution. Samples from the Leibniz-IZW were archived materials from a previous larger

study on disease and causes of death in European bats from Germany [28].

For screening for orthobornaviral RNA (200 bp of X/P-ORF), brain samples were analysed by a two-step RT-PCR detecting a broad spectrum of orthobornaviruses (see below). RNA isolation and RT-reaction was performed with RNEasy Mini kit (Qiagen) and Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions, respectively. PCR was performed with MyTaq HSMix (Bioline) under manufacturer's standard condition with degenerated primers (Additional file 2: Table S1) [29]. These primers were designed to detect viruses of seven species of the genus *Orthobornavirus* (*Mammalian 1 orthobornavirus*, *Mammalian 2 orthobornavirus*, *Passeriform 1 orthobornavirus*, *Passeriform 2 orthobornavirus*, *Psittaciform 1 orthobornavirus*, *Psittaciform 2 orthobornavirus* and *Waterbird 1 orthobornavirus*), but not viruses of the species *Elapid 1 orthobornavirus* of the genus *Orthobornavirus* or viruses of the genera *Carbovirus* or *Culterivirus*. The applied RT-PCR assay has been proven to detect several known pathogenic members of the genus *Orthobornavirus* (BoDV-1, variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1), parrot bornavirus 2 (PaBV-2), parrot bornavirus 4 (PaBV-4)) [29]. As internal control, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase-(GAPDH)-amplification (402 bp) was included. As positive control, isolated RNA from a BoDV-1-positive mouse was used, and a formerly negatively tested bat served as negative control. Lengths of amplicons were visualized with gel electrophoresis (2% agarose gel with 3% Midori Green (Biozym)) according to manufacturer's instructions and commercial Sanger sequencing of orthobornaviral amplicons was performed for positive controls (GATC, Eurofins Genomics). BoDV-1 negatively-tested bat-RNA was spiked with serial dilutions of either BoDV-1-RNA, VSBV-1-RNA, PaBV-2-RNA or PaBV-4-RNA to assess specificity and sensitivity.

To screen for bornaviral antigen, immunohistochemistry was performed using a polyclonal antibody for the detection of bornaviral phosphoprotein (antibody p24). This antibody is known for its cross-reactivity also with the phosphoprotein of PaBV-2 and PaBV-4 of the species *Psittaciform 1 orthobornaviruses* [30] and VSBV-1 [31]. All reactions were compared to a negative control slide incubated with a rabbit serum (Rabbit Immunoglobulin Fraction, Dako). Organs with positive immunostaining were further examined with a panel of antibodies to examine specificity of this reaction. The panel included two antibodies directed against the viral nucleoprotein of BoDV-1 (monoclonal antibody Bo18 [32] and polyclonal antibody anti-BoDV-N [4]) and a mix of polyclonal antibodies detecting VSBV-1-nucleoprotein and phosphoprotein [provided by Dennis

Tappe, Bernhard Nocht Institute Hamburg]. To exclude unspecific reaction of the polyclonal rabbit-antibodies, a polyclonal antibody detecting rabies virus as well as a second control rabbit serum (Theromofisher) were used as additional negative controls (details on immunohistochemistry protocols in Additional file 4: Table S2).

Results

By RT-PCR-screening, in 239/257 samples GAPDH-amplicons could be obtained, the other 19 samples were excluded due to insufficient quality. These 239 samples were tested for orthobornaviral RNA and no specific amplicons regardless of origin from endemic or non-endemic areas were observed. The control consisting of RNA of a BoDV-1 infected mouse was correctly amplified as verified by correct size on the gel and respective sequences (Additional file 1: Figure S1). Spiking of bat RNA with serial dilutions of various orthobornavirus-RNA demonstrated the detection limit of 5000 orthobornavirus copies in 660 ng RNA.

By immunohistochemistry applying the polyclonal antibody p24 specific for the phosphoprotein, a faint reaction was found in 3/140 animals, in particular located in the cytoplasm of smooth muscle cells of the intestine. All respective negative control slides were without any immunoreaction regardless which control antibody was used. No immunoreactivity was found using the monoclonal antibody Bo18 specific for the BoDV-1-nucleoprotein in these samples. Immunoreactivity was found using the polyclonal antibody detecting BoDV-1-nucleoprotein in one sample and using the polyclonal antibodies detecting VSBV-nucleoprotein and phosphoprotein in two samples. However, in 17/140 other animals a comparable immunoreaction was observed in negative control slides using control rabbit serum or polyclonal anti-rabies antibodies (details in Additional file 5: Table S3 and Additional file 3: Figure S2).

Discussion

Recent cases of fatal encephalitis in humans due to BoDV-1 infection strengthen the need to survey potential wildlife reservoirs and identify potential risk factors for infection. Although the bicolored white-toothed shrew has been identified as indigenous reservoir of BoDV-1, other potential reservoirs or animal carriers are still unknown so that further investigations of small mammals including bat species are urgently needed. Bats have already been discovered as reservoir of emerging and highly pathogenic viruses. Many factors, such as their gregarious way of life, can facilitate pathogen transmission to other bats and virus persistence in the population. In European bats, only few zoonotic viruses have been discovered [18, 33, 34] and the overall hazard for humans is comparably low [18]. As some bats take

roosts in barns and stables [20] and bat carcasses are found in close proximity to agriculture [35], a risk of sporadic transmission events to livestock animals can be assumed if viruses can be detected. Animal movement across borders of endemic regions during hunting and migration of bats seems to contradict stable geographical clustering of BoDV-1 isolates and the hypothesis of a territorially bound reservoir [5]. Nonetheless, consistent usage of the same roosts as summer or winter quarter may support observed clustering and could facilitate rare endemic transmission. Additionally, the molecular evidence for co-evolution of bats and bornaviruses [22, 27] could suggest the possibility of infections of other potentially so far unknown bornaviruses beside the tested orthobornaviruses. Therefore, this study aimed to examine the possible role of bats as carrier and reservoir of orthobornaviruses such as BoDV-1 as one of the most common virus.

All samples originated from bats which died because of injuries or disease. They were part of a previous study on diseases and causes of death in European bats, where traumatic injuries and inflammatory lesions, partly due to bacterial infections, were the major cause of deaths in these animals [28]. Since Borna disease in animals is known to be endemic in specific areas of Germany [5], samples were sorted by regional origin corresponding to known endemic regions (Bavaria) and other non-endemic regions in Germany. However, as some bat species tend to have wide hunting territories or migrate during the year and can cross the borders of endemic regions, this sorting might bear a risk of bias. The study includes samples from available bat species and is not limited to bat species suspected to interact with bornaviruses [23, 24] as interspecies virus transmission has already been observed [1, 14].

Interestingly, the screening by RT-PCR for orthobornaviral RNA provided no evidence of orthobornavirus infection in the investigated bats. The detection limit of the applied orthobornavirus RT-PCR was 0.01 ng/ μ l orthobornaviral RNA in 700 ng/ μ l mammalian RNA according to literature [29] and 5000 copies in 660 ng RNA in our own testing. Therefore, already low amounts of viral RNA should have been detected as verified by the correct amplification of all control orthobornavirus species. Spillover host [36] and reservoir species [12] regularly yield high amount of viral RNA, much higher than the detection level of the applied RT-PCR assay. However, the presence of previously undiscovered bornavirus species, such as the ones recently described in reptiles and classified as carboviruses [37] cannot be excluded and could be further investigated by broad and undirected approaches, such as metagenomics.

In contrast to the RT-PCR results, the faint immunohistochemical reaction in smooth muscles of three

animals raises the question whether an antigen with cross-reactivity or a bornaviral phosphoprotein is present. However, in several other animals similar reactions were detected applying unrelated polyclonal antibodies produced in rabbits and unspecific rabbit serum. Moreover, the staining pattern is rather untypical for BoDV-1 but occurs regularly in avian bornavirus infections [30]. The immunohistochemical reaction was not observed using a monoclonal antibody against the nucleoprotein of BoDV-1. It was observed in one animal using a polyclonal antibody against the nucleoprotein of BoDV-1 and in two animals using polyclonal antibodies against proteins of variegated squirrel bornavirus-1. Thus, an infection with another, so far unknown bornavirus could not completely be excluded and has to be investigated in further studies. Scarcity and limited quality of material impeded further immunohistochemical and molecular investigations. As endogenous bornaviral elements similar to bornaviral RNA-dependent RNA-polymerase have been found in bats [22], a translated endogenous element could also have been detected by immunohistochemistry due to cross-reactivity. However, an endogenous bornaviral-phosphoprotein-like protein has not been found yet and some authors have discussed a deleterious effect of endogenization of bornaviral phosphoprotein [38]. On the contrary, an endogenous bornaviral-P-like protein might also help prevent against bornavirus infection as the bornaviral polymerase is inhibited by a disturbed nucleoprotein-phosphoprotein-reaction [39].

Conclusions

To summarize, RT-PCR-screening of tissues from European bats revealed no evidence for orthobornaviral RNA. Further studies could unravel whether the immunohistochemical reactions might be due to expression of endogenous sequences gained during evolution of the bat species or even new bornaviruses.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12985-020-1289-3>.

Additional file 1: Figure S1. Gel electrophoresis of PCR Products. 1–10: Borna-negative samples of sufficient quality with GAPDH-band at 402 bp-amplicon length; 11: Sample of insufficient quality without GAPDH-band; NTRT: No template reverse transcription-reaction control; PC: Positive control (BoDV-1-positive mouse); NC: Negative control (BoDV-1 negative bat); NTC: No template control of PCR; bp: base pairs.

Additional file 2: Table S1. Primer Sequences. Information about primers.

Additional file 3: Figure S2. Immunohistochemistry reactions in the intestine of *Epitaxius nilssonii*. 2A polyclonal antibody p24 specific for orthobornavirus phosphoprotein, staining of smooth muscle cells; 2B polyclonal antibody anti-BoDV-N specific for BoDV-1 nucleoprotein, no immunoreaction; 2C polyclonal antibodies VSBlv-N and VSBlv-P specific for VSBlv-1 nucleoprotein and phosphoprotein, faint staining of smooth

muscle cells; 2D negative control: rabbit immunoglobulin fraction, no immunoreaction; 2E negative control: control rabbit serum, no immunoreaction; 2F negative control: polyclonal antibody specific for rabies virus, no immunoreaction.

Additional file 4: Table S2. Immunohistochemistry details. Information about antibodies used in the immunohistochemistry.

Additional file 5: Table S3. Bats with positive immunoreactivity. Information about all bats with immunoreaction with antibody p24.

Abbreviations

BcOV-1: Borna disease virus 1; EB1: Endogenous bornavirus-like element; BD: Emerging infectious disease; EFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; PaBV-2: Parrot bornavirus 2; PaBV-4: Parrot bornavirus 4; sp: Species; VSBV-1: Variegated squirrel bornavirus 1.

Acknowledgements

The authors want to thank Silke Engel for help with the RT-PCR, Silke Gantz and Diana Waldschmidt for help with the immunohistochemistry and Jana Müller for fruitful discussions during writing and proofreading. The authors are grateful to Manon Bering, Kristin Mühlendorfer and Gudrun Wibbelt, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin; Jorge A. Encarnação, Department of Animal Ecology and Systematics, and Anne Nesselter, State Veterinary Institute of Giessen, for sharing their archival samples.

Authors' contributions

DN contributed to the conception of the work, performed the laboratory work (RT-PCR, IHC) and analysed the data and wrote the manuscript. CH contributed to the conception of the work, the acquiring of samples and the interpretation of data and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The authors declare that they have not received any funding.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Ethics approval and consent to participate

All work was done according to the respective laws of the Federal Republic of Germany. No additional ethical approval was required.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute of Veterinary Pathology, Justus Liebig University, Giessen, Germany. ²Center for Mind, Brain and Behavior, Justus Liebig University, Giessen, Germany.

Received: 5 July 2019 Accepted: 22 January 2020

Published online: 30 January 2020

References

- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:531–45.
- Amarsinghe GK, Aylton MA, Bao Y, Basler CF, Bavani S, Blasdel KR, Brisse T, Brown PA, Bukreyev A, Balkeema-Buschmann A, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch Virol.* 2019;164:1967–80.
- Korn K, Casas R, Börsinger T, Herzog SM, Lücking H, Stöber R, Huttmann HR, Hartmann A, Enser A. Fatal encephalitis associated with Borna disease virus 1. *N Engl J Med.* 2018;379:1375–7.
- Schlottau K, Forth L, Angjstovum K, Haper D, Zecher D, Liesche F, Hoffmann B, Kegel V, Seehofer D, Platzer S, et al. Fatal encephalitic Borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2018;379:1377–9.
- 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.
- Weissenböck H, Bago Z, Kolodziejek J, Hager B, Palmethofer G, Dürwald R, Nowotny N. Infections of horses and shrews with Borna disease virus in Upper Austria: a novel endemic area of Borna disease. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6:e52.
- Dürwald R, Kolodziejek J, Mulneuh 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;8:917–29.
- Hilbe M, Henschel R, Kolodziejek J, Nowotny N, Zinsky K, Ehrensperger F. Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:675–7.
- Bouig M, Herzog S, Encarnação JA, Nobach D, Lange-Herbst H, Eckmann M, Herden C. Bicolored white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:2064–6.
- Kinnunen PM, Ikonen H, Ilander M, Kallio ER, Henkkilä 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:e23622.
- Kinnunen PM, Bällch C, Ek-Kommonen C, Henttonen H, Kallio RK, Niemimäa J, Palva A, Ståheli 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.
- Puorger ME, Hilbe M, Müller JP, Kolodziejek J, Nowotny N, Zinsky K, Ehrensperger F. Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crociada leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol.* 2010;47:236–44.
- Nobach D, Bouig M, Herzog S, Lange-Herbst H, Encarnação JA, Eckmann M, Herden C. Shedding of infectious Borna disease virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. *PLoS One.* 2015;10:e013018.
- Omatsu T, Watanabe S, Akashi H, Yoshikawa Y. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30:375–74.
- Han HJ, Wen H, Zhou CM, Chen FF, Luo LM, Liu JW, Yu XJ. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* 2015;205:1–6.
- Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith LT, Westcott D, Bryden WL, Middleton D, Reid PA, McFarlane RA, Martin G, et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc Biol Sci.* 2015;282:20142734.
- International Union for Conservation of Nature and natural Resources (IUCN): The IUCN Red List of Threatened Species. 2013 Available online: <http://www.iucnredlist.org/>. Accessed 27 June 2019.
- Kohl C, Kurth A. European bats as carriers of viruses with zoonotic potential. *Viruses.* 2014;6:3110–28.
- Haupt H, Ludwig G, Gruttlie H, Binot-Hafke M, Otto C, Pauly A. Rote Liste gefährdeter Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands Band 1: Wirbeltiere. *Naturschutz und Biologische Vielfalt* 70 (1) edn. Bonn - Bad Godesberg: Bundesamt für Naturschutz; 2009.
- Smith PG, Racey PA. The insectivore *Myotis nattereri* (Mammalia: Chiroptera). *J Zool.* 2005;266:171–80.
- Cui J, Wang LF. Genomic mining reveals deep evolutionary relationships between Bornaviruses and bats. *Viruses.* 2015;7:932–800.
- Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Fujino K, Akasaka T, Kishi C, Wibbelt G, Mühlendorfer K, Kurth A, Müller MA, et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. *Sci Rep.* 2016;6:25873.
- Mukai Y, Horie M, Tomonaga K. Systematic estimation of insertion dates of endogenous bornavirus-like elements in vesper bats. *J Vet Med Sci.* 2018; 80(8):1356–63. <https://doi.org/10.1293/jvms.18-0211>.
- Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigou G, Thiberge JM, Vandenboogaert M, Maufras 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:e87194.
- Bely VA, Leveque AJ, Saika AM. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1001030.
- Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jem P, Gajjabori T, Coffin JM, Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature.* 2010;463:84–7.

27. Horie M. The biological significance of bornavirus-derived genes in mammals. *Curr Opin Virol*. 2017;25:1–6.
28. Muhlendorfer K, Speck S, Wilbelt G. Diseases in free-ranging bats from Germany. *BMC Vet Res*. 2011;7:61.
29. Boung M, Nobach D, Herzog S, Lange-Herbst H, Nessler A, Hamann HP, Becker S, Hoper D, Hoffmann B, Eickmann M, Herden C. Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis. *Virology*. 2016;13:151.
30. Plepenbring AK, Enderlein D, Herzog S, Kaleta EF, Heffels-Redmann U, Ressemeyer S, Herden C, Lierz M. Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:234–41.
31. Hoffmann B, Tappe D, Hoper D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, Niederstrasser O, Müller T, Jenckel M, van der Grinten E, et al. A variegated squirrel Bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med*. 2015; 373:154–62.
32. Werner-Kels N, Garten W, Richt JA, Porombka D, Algemisen D, Herzog S, Baumgärtner W, Herden C. Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;34:590–602.
33. Fereldouni S, Kwasnitschka L, Balkebus Buschmann A, Müller T, Freuling C, Schatz J, Pikuła J, Bandouchova H, Hoffmann R, Ohlendorf B, et al. No virological evidence for an influenza A - like virus in European bats. *Zoonoses Public Health*. 2015;62:187–9.
34. VSG C, Jovanovic J, Šiljc M, Paunovic M, Starojvic M. Failure to detect viral RNA in bat samples collected in the Balkan region. *Trop Biomed*. 2016;33:780–5.
35. Kurth A, Kohl C, Brinkmann A, Ebinger A, Harper JA, Wang LF, Muhlendorfer K, Wilbelt G. Novel paramyxoviruses in free-ranging European bats. *PLoS One*. 2012;7:e38688.
36. Schindler AR, Vöglin A, Hilbe M, Puotger 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;21:47–55.
37. Hyndman TH, Shilton CM, Stenglein MD, Wellehan JFX Jr. Divergent bornaviruses from Australian carpet pythons with neurological disease date the origin of extant Bornaviridae prior to the end-cretaceous extinction. *PLoS Pathog*. 2018;14:e1006881.
38. Horie M, Tomonaga K. Paleovirology of bornaviruses: what can be learned from molecular fossils of bornaviruses. *Virus Res*. 2019;262:2–9.
39. Schneider U, Naegele M, Staeheli P, Schwemmler M. Active Borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol*. 2003;77:11781–9.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

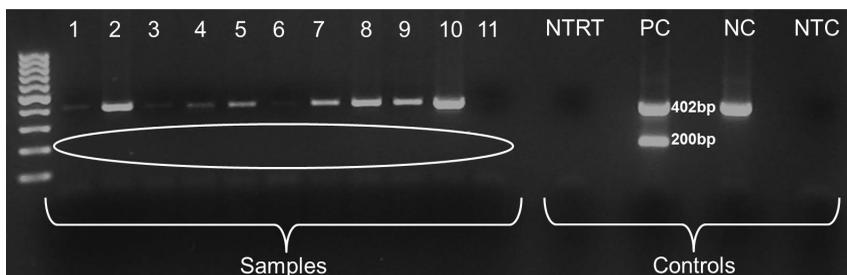
- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Additional file 1: Figure S1. Gel electrophoresis of PCR Products.



1-10: Borna-negative samples of sufficient quality with GAPDH-band at 402 bp-amplicon length

11: Sample of insufficient quality without GAPDH-band

NTRT: No template reverse transcription-reaction control

PC: Positive control (BoDV-1-positive mouse)

NC: Negative control (BoDV-1-negative bat)

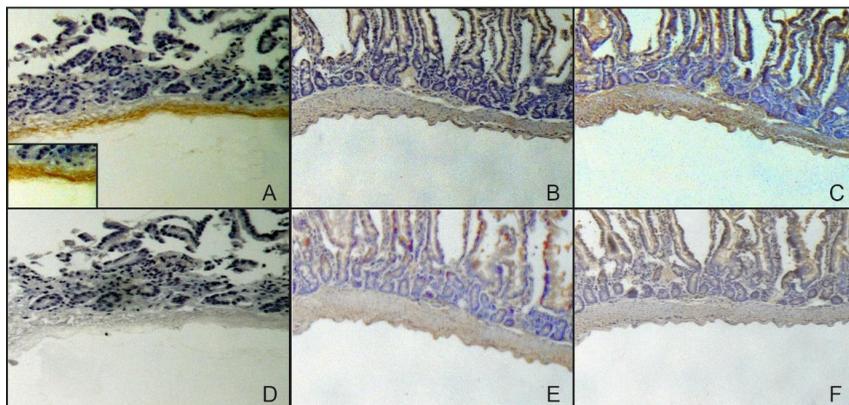
NTC: No template control of PCR

bp: base pairs

Additional file 2: Table S1. Primer Sequences.

Primer	Sequence (5'-3')	Product
OrthoBorna Forward	CGCGACCMTCGAGYCTRGT	200bp
OrthoBorna Reverse	GACARCTGYTCCCTTCCKGT	[KF275184.1]
GAPDH Forward	GGTGATGCTGGTGCTGAGTAT	402bp
GAPDH Reverse	GGATGACCTTGCCACAG	[NM_017008.4]

Additional file 3: Figure S2. Immunohistochemistry reactions in the intestine of *Eptesicus nilssonii*.



2A polyclonal antibody p24 specific for orthobornavirus phosphoprotein, staining of smooth muscle cells

2B polyclonal antibody anti-BoDV-N specific for BoDV-1 nucleoprotein, no immunoreaction

2C polyclonal antibodies VSBV-N and VSBV-P specific for VSBV-1 nucleoprotein and phosphoprotein, faint staining of smooth muscle cells

2D negative control: rabbit immunoglobulin fraction, no immunoreaction

2E negative control: control rabbit serum, no immunoreaction

2F negative control: polyclonal antibody specific for rabies virus, no immunoreaction

Additional File 4: Table S2: Immunohistochemistry details.

Antibody	Dilution	Pretreatment	Detection system	Origin
polyclonal rabbit-anti-p24 (p24)	1:2000	none	biotinylated anti-rabbit IgG+ ABC-method	Prof. Garten, Marburg, Germany
monoclonal mouse-anti-p38 (Bo18)	1:500	none	biotinylated anti-mouse IgG + ABC-method	Dr. Herzog, Giessen, Germany
polyclonal rabbit-anti-BoDV-N	1:2000	none	biotinylated anti-rabbit IgG + ABC-method	Prof. Dennis Tappe, Hamburg, Germany
polyclonal rabbit-anti-VSBV-N + polyclonal rabbit-anti-VSBV-P	1:2000	none	biotinylated anti-rabbit IgG + ABC-method	Prof. Dennis Tappe, Hamburg, Germany
rabbit immunoglobulin fraction	1:2000	none	biotinylated anti-rabbit IgG + ABC-method	Dako, Agilent
control rabbit serum	1:2000	none	biotinylated anti-rabbit IgG + ABC-method	ThermoFisher
polyclonal rabbit-anti-rabies	1:2000	none	biotinylated anti-rabbit IgG + ABC-method	Dako, Agilent

Additional file 5: Table S3. Bats with positive immunoreactivity

Species	Origin	PCR-result (brain)	Immunohistochemistry	Tissues without immunoreaction	Tissues with immunoreaction	polyclonal anti-BoDV-P (p24)	monoclonal anti-BoDV-N (Bo18)	polyclonal anti-BoDV-N	polyclonal anti-VSBV-N/P	rabbit immunoglobulin fraction	control rabbit serum	polyclonal anti-rabies
Animals with no immunoreaction in control slides												
<i>Vesperugo murinus</i>	Bavaria	negative		brain, tongue, trachea, lung, salivary gland, larynx	intestine/smooth muscle	positive	negative	positive	positive	negative	negative	negative
<i>Eptesicus nilssonii</i>	Bavaria	negative		brain, liver, trachea, lymph node, liver	intestine/smooth muscle	positive	negative	negative	positive	negative	negative	negative
without species identification	Hesse	no material available		lung, heart, spleen, liver, lymph node, skeletal muscle, salivary gland	intestine/smooth muscle	positive	negative	negative	n/a	negative	negative	n/a
Animals with immunoreaction in control slides												
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Bavaria	negative		brain, heart, tongue	trachea/paratracheal connective tissue; lung/alveolar cells	positive	negative	positive	positive	negative	positive	negative
<i>Vesperugo murinus</i>	Bavaria	negative		brain, larynx, spleen, salivary gland	lung/alveolar cells	positive	negative	positive	positive	negative	positive	negative
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Bavaria	no material available		brain, testis, intestine, salivary gland, lung, trachea	tongue/superficial epithelial cells	positive	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Bavaria	excluded due to insufficient quality		brain, tongue, pancreas, larynx, salivary gland, intestine	lung/alveolar cells	positive	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Plecotus auritus</i>	Bavaria	negative		brain, testis, lung, intestine	tongue/superficial epithelial cells	positive	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Bavaria	excluded due to insufficient quality		brain, intestine	trachea/paratracheal connective tissue; salivary gland/secret	positive	negative	positive	positive	negative	positive	positive

Species	Origin	PCR-result (brain)	Immunohistochemistry	polyclonal anti-BoDV-P (p24)	monoclonal anti-BoDV-N (Bo18)	polyclonal anti-BoDV-N	polyclonal anti-VSBV-N/P	rabbit immunoglobulin fraction	control rabbit serum	polyclonal anti-rabbits
Animals with immunoreaction in control slides										
<i>Eptesicus serotimus</i>	Bavaria	negativ	brain, tongue, lung, salivary gland, larynx	intestine/smooth muscle	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Bavaria	excluded due to insufficient quality	brain, tongue, salivary gland, larynx	intestine/smooth muscle; lung/alveolar cells	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Myotis mystacinus</i>	Bavaria	excluded due to insufficient quality	brain, lung, salivary gland, trachea, tongue, testis	intestine/smooth muscle	negative	negative	positive	negative	positive	positive
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Bavaria	excluded due to insufficient quality	brain, heart, lung, esophagus, lungs, skeletal muscle	intestine/smooth muscle	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Eptesicus nilssonii</i>	Bavaria	negative	brain, lung	intestine/smooth muscle	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Myotis mystacinus</i>	Bavaria	negative	brain, skeletal muscle,	intestine/smooth muscle lung/alveolar cells; salivary glands/secretion	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Bavaria	excluded due to insufficient quality	brain, heart, salivary gland, skeletal muscle	Intestine/smooth muscle	negative	positive	positive	negative	positive	positive
<i>Eptesicus nilssonii</i>	Bavaria	negative	brain, heart, skeletal muscle	intestine/smooth muscle	negative	n/a	n/a	negative	n/a	n/a
without species identification	Hesse	no material available	brain, skin, heart, lung, trachea, salivary gland	intestine/smooth muscle	negative	positive	n/a	negative	positive	n/a
without species identification	Hesse	no material available	lung, heart, kidney, tongue, liver	intestine/smooth muscle	negative	positive	negative	negative	positive	negative
without species identification	Hesse	no material available	heart, liver, brain	intestine/smooth muscle	negative	negative	positive	negative	positive	negative

5 Zusätzliche Ergebnisse

5.1 Artikel 3 (unveröffentlicht)

Daniel Nobach, Manon Bourg, Guido Schemken, Sibylle Herzog, Jorge A Encarnação, Markus Eickmann, Christiane Herden

Establishing a husbandry of the bicolored white-toothed shrew (*Crocidura leucodon*)

In preparation

Abstract

For most scientific purposes, rodents are used to generate animal models but for certain scientific purposes these animals cannot mimic the needed model character adequately. Therefore we established a breeding colony of bicolored white-toothed shrews (*Crocidura leucodon*) in a laboratory animal facility as a new insectivore model. The founder shrews (n=13) were captured in two locations in Germany and were housed in adapted plastic cages. Their diet, consisting of chicken heart muscle, chicken liver and commercial pellets, was analysed for vital nutrients and thereby proved comparable to their natural diet. The body mass showed individual and temporal variations with a mean body mass of 13.6 g in wild-caught animals and 9.7 g in the offspring. Altogether, the shrews have achieved a median life span of 752 days in the husbandry and have produced an offspring in two generations of 16 animals. Thus, the bicolored white-toothed shrew can be maintained as a promising laboratory animal. After adapting routine methods used in rodent research to the shrews the bicolored white-toothed shrew will be a most welcome insectivore model and alternative to common rodents for selection of the most suitable and reliable animal model for the respective scientific questions.

Keywords

Animal model, Eulipotyphla, husbandry, Insectivore, reservoir

Introduction

For most scientific purposes, rodents (rats, mice) are used to generate animal models for the respective research approach. However, criticism out of the scientific community might occur about the translational value of these inbred mouse models [8,21,28,29,34,38]. Concerns are often related to the distant phylogenetic relationship between mice and humans [34]. Another concern is diverging immunologic reactions between laboratory rodents staying under controlled housing conditions in a clean environment for generations and the wild animals in the “dirty” reality [21]. The same translational problems encountered in the extrapolation of observations from laboratory mice to other animals or humans can be present when addressing the specific context of wildlife reservoir status for

infectious, potentially zoonotic agents. Since the host-pathogen interaction in a free-ranging reservoir might be clearly different from infection of clean laboratory animals, extrapolation of observations can be also limited. On the other hand, wildlife studies contribute data from the natural conditions but are cumbersome and might show limits in the reproducibility due to unalterable circumstances and large variation [28]. By establishing husbandries of new animal models originating from the wild, specific scientific questions regarding wildlife species can be answered under defined circumstances of a laboratory husbandry.

Shrews (Soricidae) belong to the order Eulipotyphla, formerly known as Insectivores, in the superorder Laurasiatheria [2]. In this superorder, already established common animal models comprised ferrets, cats and dogs and large animals like horses and ruminants. There are a number of studies, but only a small number, with live animals of the order Chiroptera, namely bats, since they are considered as important reservoirs for many highly pathogenic and zoonotic viruses. Thus, shrews can serve for the generation of new and promising animal models due to the phylogenetic relation with other Laurasiatheria, its primitive characteristics and its convenient size [27].

Shrews are already known as reservoirs for several pathogens including protozoa like *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* [23], bacteria like *Leptospira sp.* [22] and viruses like hantaviruses [31] and Borna disease virus-1 [3,11,16,41]. Especially the interaction between Borna disease virus-1 and *Crociodura leucodon* (*C. leucodon*) is of interest as the shrew harbours the virus in all organs [30] and continuously sheds virus in secretions and excretions [26] without evidence of clinical symptoms or histologic lesions [26]. Additionally, Borna disease virus-1 is part of the order *Mononegavirales*, which contains highly pathogenic viruses of the virus families *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* and *Pneumoviridae* [1].

In the past, most scientific husbandries of shrews were maintained for a limited amount of time to address a specific scientific question [13,25,37,42]. Hellwing described a large continuous breeding colony of *Crociodura russula monacha* and *C. leucodon* in the 1970s [15]. The animals were kept as breeding pairs outdoors in steel boxes and got a diet of meat, eggs, cereal, fish-meal and milk [15]. Searle established a breeding colony of *Sorex araneus* in 1980 without the attempt to pair shrews reared in captivity [33]. The animals were kept in wooden boxes or enclosures outdoors and got a diet of meat, cereal and eggs [33]. Ohno et al. described a breeding colony of *Crociodura dsinezumi* in 1992 [27]. These shrews were first kept in wooden boxes under natural conditions then they were kept inside a facility in plastic boxes and got a diet of trout pellets and commercial cat food [27]. Besides that, shrews are seldom kept in zoological gardens due to their minimal attractiveness to visitors. At the moment, the breeding colony described in this manuscript is to our knowledge the only scientific breeding colony of *C. leucodon* with steady breeding success.

Crocidura leucodon, the bicolored white-toothed shrew, is widely distributed in central Europe and Asia [19]. In recent years, local shifting of ranges between *C. leucodon* and *Crocidura russula* has occurred in parts of central Europe with local extinction of *C. leucodon* [14,40]. However, in other areas there seem to be rather a growth in populations due to warm and dry summers [19]. The habitats of this shrew are usually dry and temperate woodlands or grasslands with burrow tunnels under rocks or thick brush. Occasionally it can be found in gardens, farmlands and farm buildings [19,24]. It is a solitary living territorial animal [7]. During winter the territorial behaviour is diminished and overlapping home ranges and social nest building occur [5,36]. It is a carnivore with a high metabolic rate and feeds on a variety of invertebrates [24]. During the breeding season, from spring to autumn, female *C. leucodon* produces up to 4 litters with a gestation period of 30 days and a weaning period of about 20 days [7,15]. Especially during breeding season several skin glands, including the flank gland, produce a strong odour, which can also be smelled by humans. Average life span is estimated at 1.5 years with a high mortality in winter. [19,24]

In this manuscript we describe the successful establishment of a breeding colony of *C. leucodon*. Furthermore, we characterize the animal to pave the way for further scientific purposes.

Material and Methods

Capture of shrews

Capture of animals was performed by skilled veterinarians according to accepted guidelines [6,9,20,35]. It was performed at several time points at two locations in Swabia.

Caught animals were identified using a “Guide to identified living animals” [17] and released or put into a transport cage. Empty food boxes (LASvendi, Soest) used as transport cages were about 310mm x 170mm x 230mm and supplied with food, water and wood pellets and paper for enrichment. Transportation to the animal facility lasted at the most 20 hours and every six hours food and water supply were renewed.

Husbandry

Animals were held in single cages sized 590 mm x 380 mm x 200 mm (standard makrolon cage type 4, EHRET, Emmendingen). The cover had to be adapted due to the small size of *C. leucodon* and was made of perforated steel with a hole size of 5 mm. As litter wood shavings (AsBe-wood, Buxtehude) were mixed with autoclaved soil. Furthermore autoclaved straw was added to the litter as enrichment. Additional enrichment was achieved by adding a plank with a hole (“1 Loch Liegebrett”, ABEDD, Vienna) and a transparent red mouse house (tecniplast, Hohenpleißenberg).

Animals were kept under artificial light, humidity and temperature conditions in a laboratory animal facility. The light cycle consisted of 14 hours light and 10 hours darkness to mimic a summer season, humidity was set on 55 % and room temperature on 21°C.

The diet consisted of a mixture of chicken heart muscle, chicken liver and commercial pellets with a high amount of insects (delikat Futtermischung, aleckwa, Altrip). 250 g chicken heart muscle, 250 g chicken liver and 500 g commercial pellets were chopped and mixed together with 950 ml water in a table cutter (robot coupe R2, Enders, Reiskirchen). Aliquots of 20 g were served daily on a dish. The diet was analysed according to the VDLUFA methods [39] for macronutrients by proximate analysis and additional analyses for certain individuals minerals performed by a commercial lab (Food GmbH Jena). Metabolizable energy was estimated using the Atwater formula: $ME \text{ kJ/g} = \text{crude protein} \times 17 + \text{ether extracts} \times 37 + \text{NFE} \times 17$.

Water was supplied in an open dish and was changed daily.

For mating the breeding pair was kept together under similar conditions in a large wooden box (940 mm x 1140 mm x 1000 mm) for 3-4 weeks. Thereafter the cage of female shrew was observed daily for signs of newborns for a period of 30 days.

Veterinary care

All caught shrews were tested after four weeks for shedding of Borna Disease Virus-1 to identify naturally infected animals as described elsewhere [26]. Non-infected animals and infected animals were strictly separated. Cages of non-infected and infected animals were spatially separated by use of distinct shelves. All duties of the animal caretakers were first performed with the non-infected animals and last with the infected animals. After contact with infected animals gloves were changed and all used equipment was disinfected.

To monitor wellbeing of the animals a daily visual examination of general condition and behaviour was performed. Every 14 days the body mass was measured with a standard animal digital scale. To get an idea how the body mass developed after birth, the average body mass of one litter consisting of four animals was measured daily with a standard animal digital scale from day 5 to day 21 after birth.

Further Testing

DNA of the individuals was either gained by swab sampling of mucosal cells of the oral cavity or after death from muscle tissue. Species identification by visual examination was confirmed by cytochrom-b PCR [11]. Due to the abdominal location of the testis and lack of sexual dimorphism, sex determination was done by SRY-PCR [4].

Dead animals were examined by necropsy and histological examination of a panel of tissues (liver, lung, spleen, kidney, intestine, skin, brain and spinal column) including all morphologically altered tissues.

Results

During May 2013 and Oct 2014, 16 *C. leucodon* were caught at two trapping locations in Swabia, Germany (Table 1). 2 *C. leucodon* found with a wet coat in the trap died within 6 hours after being put in the transport box. Beside *C. leucodon*, 22 Soricidae, 4 Muridae and 1 Arvicolinae were accidentally trapped (Table 1) and released. Species identification was done by visual examination and was confirmed for *C. leucodon* by cytochrom-b PCR.

After the transport, 9 male (#1, #5, #7, #9, #10, #12, #13, #14, #15) and 4 female (#2, #3, #6, #8) shrews acclimatized, but 1 female shrew (#11) did not accept the conditions of the husbandry and died within 24h. Sexing was done by SRY-PCR. The median life span was 768 days with a range of 91 days up to 1215 days. The body mass showed individual and temporal variations, but no sexual dimorphism, with a median body mass of 13.6 g and a range of 8.0 g – 18.9 g (Table 2). Causes of death included hepatitis with unknown aetiology (#6), intestinal invagination (#5), pulmonary neoplasia (#8, #2), renal neoplasia (#10), pancreatic neoplasia (#3) and mediastinal round cell tumor (#1).

One breeding pair (#3, #1) mated three times successfully with a litter size of 3, 3 and 4, respectively. Removal of offspring took place on the twenty-first day after birth when the offspring fed on the diet. One breeding pair of the first offspring generation (#21, #22) mated two times successfully with a litter size of 3. Two matings of this breeding pair did not lead to a gestation. After another mating of this breeding pair a litter with only one shrew puppy developed and was found dead on the sixth day after birth. During 15 breeding attempts with 11 different breeding pair combinations female shrews involving both wild-caught animals and offspring animals showed no signs of gestation (overview in supplementary table 1). After one breeding attempt (#21, #25) the female shrew died during gestation with two intrauterine foetuses.

The median life span of the shrews born in the husbandry was 569 days and the median body mass 9.7 g with a range of 5.9 g to 14.9 g (Table 3). During the first weeks the litter grew constantly with a growth depression on days 14 and 15. After the first month the body mass showed variations around an individual constant value (Figure 1). One shrew (#25) born in the husbandry died due to complications during gestation, another shrew (#16) with a lymphoma.

With a proximate analysis the diet were analysed for nutrients (Table 4). Dry matter was 26.8 %, crude protein was 16.1 %, ether extracts 3.6 %, crude ash 4.1 % and crude fibre 1.3 %. Metabolizable energy estimated with the Atwater formula was 7.98 kJ/g. Calcium content was 0.85 %, phosphate content

was 0.30 %, sodium content was 0.27 % and magnesium content was 0.10 %. The daily intake of food was about 1.1x the body mass.

The shrews showed behaviour patterns similar to behaviour patterns in the nature. Foraging and resting in the house, under the plank or in the stray was observed. Defaecation took place in the corners of the cage. Aggressive actions against animal caretakers could not be observed. Eight shrews (n=8: #2, #5, #6, #9, #10, #12, #14, #15) manifested as naturally Borna Disease Virus-1-infected animals but show no distinct behaviour or clinical signs of the infection. Occasionally, an excessive fast circling was observed in four shrews (#21, #23, #27, #28). Clinical signs of disease were rare. Eight shrews (#1, #2, #7, #8, #10, #12, #16, #25) displayed an apparent decrease in food intake one day before death. In this status, also an apparent piloerection of the coat was visible. A high number of the wild-caught shrews (8/13: #2, #7, #9, #10, #12, #13, #14, #15) and to a lesser amount some of the offspring (6/16: #17, #18, #19, #20, #21, #27) developed after 4 to 5 months a persistent alopecia beginning at the hip and spreading over the total back. These alopeptic areas displayed no signs of inflammation, neither clinically nor histologically in postmortal biopsies. A score sheet to guide future evaluation of the well-being of the shrews is given in supplemental data 1.

Discussion and Conclusion

This manuscript describes the establishment of a husbandry and breeding colony of bicolored white-toothed shrews. Up to now, 13 wild-caught *C. leucodon* have achieved a median life span of 752 days in the husbandry and have produced an offspring in two generations of 16 animals.

13 wild-caught *C. leucodon* as founders of a breeding colony is a low number of animals. Furthermore, as the shrews were caught in two locations it is probable that they were related. A breeding colony of this size has a limited gene pool and the chance of a high proportion of inbreeding. However, it should be emphasized that catching shrews has its own peculiarities. According to literature only 1/10 of caught small animals during a trap night are shrews, the majority are mice and voles [20]. In this study the percentage of shrews among all captured animals was very high, probably due to very shrew-rich locations and insect baits which are less attractive to rodents. The high number of trapped *Crociodura russula* in the last trapping month of second year at both sites could be a coincidental event of a territorial change due to short-term population dynamics or could be a sign of expulsion of *C. leucodon* due to climate fluctuations as already described in other regions of Europe [14,40]. Therefore the chance of getting more *C. leucodon* with additional trapping nights is not predictable. However, in free-ranging *Crociodura russula* mating among close relatives occur regularly due to the limited dispersal of weaned shrews, and do not lead to a reduced fitness [10].

13 of 16 trapped *C. leucodon* survived the transportation to the animal facility. Live animal capture means stress for the animals and even with precautions fatalities cannot be absolutely prevented. The supply with food and water and the examination every six hour should prevent death due to inanition and hypothermia [9]. However, at the trapping night with two fatalities there was an overall high density of small animals (29 caught animals) in the trapping area which might lead to a high competition and weakened animals to get in the trap. The shrew that died within 24 hours after transportation did not ingest any of the offered diet but the other 13 shrews acclimatized to the husbandry condition without any complications.

The diet consisting of chicken heart muscle, chicken liver and commercial pellets was easily accepted by the shrews. The daily intake was approximately 1.1x of the body mass due to the high metabolic rate of shrews [7] and the high content of water of the diet. The calculated metabolizable energy of 7.98 kJ/g can lead to a high energy intake compared to the suggested energy requirements of 3.4 kJ/g/day of *Crociodura russula* and 6.7 – 9.7 kJ/g/day of *Sorex araneus* [7]. However, the real metabolizable energy and energy requirements of *C. leucodon* are not yet known and in necropsy there was no evidence for large fat deposits in the shrews. Similar to the diets used in former shrew husbandries [15,27,33] the diet consisted of a meat basis to meet the requirements of insectivore animals. The chicken liver in the diet should provide additionally amino acids, special minerals like iron and zinc and vitamins like vitamin A and B [32]. Further minerals and amino acids were provided by the commercial pellets made for insectivorous birds with a high content of various insect bodies. As the natural diet of shrews consisted of a mixture of insects, other arthropods and worms, any special requirements should be covered by the diet. The proximate analysis showed the similarities of the diet with insects and worms, for example earthworms and adult mealworms (Table 4). The low dry matter and the high protein content of the diet mimicked insect nutrients. Known disadvantages of insect-rich diets are low levels of calcium and low levels of vitamin A, D, E and thiamine and niacin of the B-vitamins [12]. Crude ash and Calcium in our diet were higher than the levels of insects, and the chicken liver should provide additionally vitamin A and B. Any unbalance of the diet should be overcome by the mixture of insect bodies in the commercial pellets. In contrast, former shrew husbandries [15,27,33] used commercial mineral and vitamin supplements made for carnivore animals to prevent deficiencies. Due to the lack of reference data concerning identified special amino acid, protein, mineral or vitamin requirements of *C. leucodon* a deficiency or overdose of any ingredient cannot be excluded.

As the diet required a daily renewal due to the fast decay and the high daily intake of 10 g – 20 g per day the food supply is labour-intensive and expensive. As alternative, a commercial diet fabricated for tupaias (Tupaiaidae) was suggested and tested for *Sorex spp.* [18] to increase the feeding intervals and simplify the maintenance but the suitability to *C. leucodon* has yet not been tested.

The body mass showed high variabilities between individuals and over time. The mean body mass of wild-caught animals (13.6 g) was higher than in the offspring (9.7 g). In general, in the first weeks after catching the body mass of wild-caught animals increased probably due to the easier access to food than in the nature. In spite the ad libitum access to food the body mass stopped increasing after some weeks and varied in the following month around an individual value. Dead animals showed no signs of adiposity like large deposits of body fat or storage of fat in liver or other internal organs. Therefore only the hygiene requirements of the diet to prevent decay and not the high appetite of the animals demanded a daily renewal of the diet.

With the use of a large breeding cage several successful matings were achieved. As shrews are territorial solitary animals [7] and pilot testing showed very aggressive behaviour in a smaller area of about 0.22 m², a larger cage with an area of about 1.07 m² was established as breeding cage. The advantage consisted of the absence of casualties due to fighting. Furthermore, mating of shrews requires space as mating usually involves chasing [7]. The disadvantages of the large cages consisted of the large space requirements and the laborious work to maintain the cage. It could be observed that aggressive or territorial behaviour abated as it is described in resource-rich areas [7]. Therefore the development of a smaller cage more suitable for a laboratory animal facility could be a future option.

The husbandry produced few offspring compared to former breeding colonies [15,27]. This is a major obstacle to overcome for future use of this model. The selection of breeding pairs was limited due to the occurrence of natural infections of Borna disease virus-1 in the colony [26] and the requirement to keep infected and non-infected animals separated. To ensure the breeding pair would undergo several oestrus if the first mating was not successful the breeding pair was kept together for three weeks. As no clear signs of successful mating or gestation could be identified the female were afterward separated for the whole gestation period of 4 weeks. Therefore, it could last for 4 weeks or after a successful mating up to 7 weeks (gestation and weaning period) until the female could be selected for breeding again. Thus, several breeding pairs were already older than one year during mating. Although shrews show a pattern of breeding seasonality [7] they seemed to display under the husbandry conditions a continuous breeding pattern similar to former breeding colonies [15]. Therefore, as more potential breeding pairs have grown up similar output as former colonies could be achieved.

Fatalities occurred due to only few inflammatory diseases but mainly of age-related neoplastic diseases. As the individuals could be closely related to each other a genetic predisposition to certain neoplastic diseases cannot be excluded although the neoplastic diseases showed no common pattern. The aetiology of the sporadic circling could not be determined. A genetic factor is probable due to the familiar background but a stereotypic behaviour might also be possible. It should be noted that the behaviour occurred only rarely. The idiopathic alopecia can result from moulting problems due to the

aseasonal condition in the husbandry, in a lack of certain nutrients or in a genetic disease. Further diagnostics including histopathology will be done to unveil the need of adaptation of the husbandry. The occurrence of naturally Borna Disease Virus-1-infection has to be considered in wild shrews on the one side to prevent spreading of the infection in the colony and on the other side to protect the animal caretakers from a virus with zoonotic potential. The occurrence of behaviour patterns already known of the wild like marking the corners of the territory with faeces [7] or caravanning the pups [24] shows the overall acceptance of the husbandry conditions.

In conclusion the bicolored white-toothed shrew is a promising laboratory animal. The husbandry gives the opportunity to reveal scientific questions like the function of the innate immune systems of Eulipotyphla or the pathogen-host-interaction of viral or other infections in reservoir species. Especially the position in the phylogenetic tree as a very old mammal with a relationship to bats strengthens the interest in this order. Advantages of *C. leucodon* consist of the comfortable small size, the low aggressiveness towards humans and the average long life span. Disadvantages consist of the laborious maintenance and the lack of standardized equipment. One major obstacle to overcome will be the up to now low breeding success.

In the awareness of limited translational value in certain aspects of traditional animal models the establishing of new animal models can be one solution. The process needs adaptation of routine equipment and methods used in rodent research and care but can be achieved in a standard laboratory facility. In the process of selecting the most suitable and reliable animal model for the planned purpose of any animal trial also alternatives to rodent models like the bicolored white-toothed shrew should be considered.

Acknowledgements

The authors want to thank the animal caretakers of the Philipps-University in Marburg for the thorough care of the shrews. Additionally, we want to thank Nicole Hermes, Matthias Otto, Anna Roswag and Sara Ruoss for help with the capture of small animals and Franz Schmid (Veterinäramt Günzburg) for his helpful support and cooperation.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

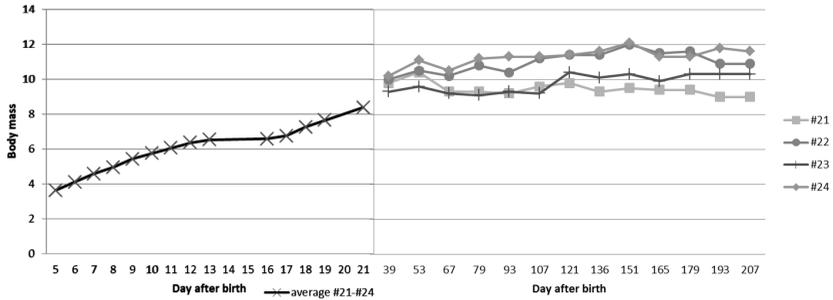
1. Afonso, C. L., Amarasinghe, G. K., Banyai, K., Bao, Y., Basler, C. F., Bavari, S., Bejerman, N., Blasdell, K. R., Briand, F. X., Briese, T., Bukreyev, A., Calisher, C. H., Chandran, K., Cheng, J., Clawson, A. N., Collins, P. L., Dietzgen, R. G., Dolnik, O., Domier, L. L., Durrwald, R., Dye, J. M., Easton, A. J., Ebihara, H., Farkas, S. L., Freitas-Astua, J., Formenty, P., Fouchier, R. A., Fu, Y., Ghedin, E., Goodin, M. M., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T. H., Jiang, D., Kitajima, E. W., Kobinger, G. P., Kondo, H., Kurath, G., Lamb, R. A., Lenardon, S., Leroy, E. M., Li, C. X., Lin, X. D., Liu, L., Longdon, B., Marton, S., Maisner, A., Muhlberger, E., Netesov, S. V., Nowotny, N., Patterson, J. L., Payne, S. L., Paweska, J. T., Randall, R. E., Rima, B. K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmle, M., Shi, M., Smither, S. J., Stenglein, M. D., Stone, D. M., Takada, A., Terregino, C., Tesh, R. B., Tian, J. H., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J. S., Vasilakis, N., Verbeek, M., Volchkov, V. E., Wahl-Jensen, V., Walsh, J. A., Walker, P. J., Wang, D., Wang, L. F., Wetzell, T., Whitfield, A. E., Xie, J. T., Yuen, K. Y., Zhang, Y. Z., and Kuhn, J. H. 2016. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2016. *Arch. Virol.*, 161 2351-2360.
2. Bininda-Emonds, O. R., Cardillo, M., Jones, K. E., MacPhee, R. D., Beck, R. M., Grenyer, R., Price, S. A., Vos, R. A., Gittleman, J. L., and Purvis, A. 2007. The delayed rise of present-day mammals. *Nature*, 446 507-512.
3. Bourg, M., Herzog, S., Encarnacao, J. A., Nobach, D., Lange-Herbst, H., Eickmann, M., and Herden, C. 2013. Bicolored white-toothed shrews as reservoir for borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 19 2064-2066.
4. Brandli, L., Handley, L. J. L., Vogel, P., and Perrin, N. 2005. Evolutionary history of the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) inferred from analysis of mtDNA, Y, and X chromosome markers. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37 832-844.
5. Cantoni, D., and Vogel, P. 1989. Social-Organization and mating system of free-ranging, greater white-toothed shrews, *Crocidura-russula*. *Anim. Behav.*, 38 205-214.
6. Choate, J. R., Baker, R. J., Barrett, G. W., Birney, E. C., Dowler, R. C., Eisenberg, J. F., Johnson, M. L., Kunz, T. L., Linzey, A. V., Shaw, J. H., Taylor, J. M., Wunder, B., Kirkland, G. L., and Animal Care Use, C. 1998. Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *J. Mammal.*, 79 1416-1431.
7. Churchfield, S. (1990). *The Natural History of Shrews* (1 ed.). London: Christopher Helm Ltd.
8. Davis, M. M. 2008. A prescription for human immunology. *Immunity*, 29 835-838.
9. Do, R., Shonfield, J., and McAdam, A. G. 2013. Reducing accidental shrew mortality associated with small-mammal livetrapping II: a field experiment with bait supplementation. *J. Mammal.*, 94 754-760.
10. Duarte, L. C., Bouteiller, C., Fontanillas, I. P., Petit, E., and Perrin, N. 2003. Inbreeding in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Evolution*, 57 638-645.
11. Dürrwald, R., Kolodziejek, J., Weissenbock, H., and Nowotny, N. 2014. The bicolored white-toothed shrew *Crocidura leucodon* (HERMANN 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS One*, 9 e93659.
12. Finke, M. D. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo. Biol.*, 21 269-285.
13. Frank, F. 1953. Zur Biologie, insbesondere Paarungsbiologie der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*). *Bonn. Zool. Bull.*, 4 187-194.

14. Frank, F. 1984. Shifting of ranges between *Crocidura russula* and *Crocidura leucodon* in northwestern Germany with notes on the interspecific behavior of these shrews. Z. Säugetierkd., 49 65-70.
15. Hellwing, S. 1973. Husbandry and breeding of white-toothed shrews (Crocidurinae) in the Research Zoo of the Tel-Aviv University. Int. Zoo. Yearb., 13 127-134.
16. Hilbe, M., Herrsche, R., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K., and Ehrensperger, F. 2006. Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. Emerg. Infect. Dis., 12 675-677.
17. Joachim, J., W, L. P., and Müller, M. F. (2010). Kleinsäuger Körper- und Schädelmerkmale Ökologie (First ed.). Petersberg: Michael Imhof Verlag.
18. Kollars, T. M., and Baumler, W. 1994. An Artificial Diet for Shrews (Soricidae). Anzeiger Fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz, 67 179-179.
19. Kraft, R. (2008). Feldspitzmaus. In R. Kraft (Ed.), Mäuse und Spitzmäuse in Bayern: Verbreitung, Lebensraum, Bestandsituation (1 ed., pp. 111 - 112). Stuttgart: Ulmer Verlag.
20. Little, J., and Gurnell, J. 1989. Shrew Captures and Rodent Field Studies. J. Zool., 218 329-331.
21. Masopust, D., Sivula, C. P., and Jameson, S. C. 2017. Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. J Immunol, 199 383-388.
22. Mayer-Scholl, A., Hammerl, J. A., Schmidt, S., Ulrich, R. G., Pfeffer, M., Woll, D., Scholz, H. C., Thomas, A., and Nockler, K. 2014. *Leptospira spp.* in rodents and shrews in Germany. Int. J. Environ. Res. Public Health, 11 7562-7574.
23. Meerburg, B. G., De Craeye, S., Dierick, K., and Kijlstra, A. 2012. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. Vet. Parasitol., 184 317-320.
24. Nagel, A., and Nagel, R. (2005). Feldspitzmaus. In M. Braun & F. Dieterlen (Eds.), Die Säugetiere Baden Württemberg (1 ed., Vol. 2, pp. 90-96). Stuttgart: Ulmer.
25. Niethammer, G. 1950. Zur Jungenpflege und Orientierung der Hausspitzmaus (*Crocidura russula* Herm.). Bonn. Zool. Bull., 1 117-125.
26. Nobach, D., Bourg, M., Herzog, S., Lange-Herbst, H., Encarnacao, J. A., Eickmann, M., and Herden, C. 2015. Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews. PLOS One, 10 e0137018.
27. Ohno, K., Niwa, Y., Kato, S., Koyasu, K., Oda, S., and Kondo, K. 1992. The domestication of *Crocidura dsinezumi* as a new laboratory animal. Jikken Dobutsu, 41 449-454.
28. Pedersen, A. B., and Babayan, S. A. 2011. Wild immunology. Molecular ecology, 20 872-880.
29. Perrin, S. 2014. Preclinical research: Make mouse studies work. Nature, 507 423-425.
30. Puorger, M. E., Hilbe, M., Muller, J. P., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K., and Ehrensperger, F. 2010. 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., 47 236-244.
31. Radosa, L., Schlegel, M., Gebauer, P., Ansoerge, H., Heroldova, M., Janova, E., Stanko, M., Mosansky, L., Fricova, J., Pejcoch, M., Suchomel, J., Purchart, L., Groschup, M. H., Kruger, D. H., Ulrich, R. G., and

- Klempa, B. 2013. Detection of shrew-borne hantavirus in Eurasian pygmy shrew (*Sorex minutus*) in Central Europe. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 19 403-410.
32. Rimbach, G., Möhring, J., and Erbersdobler, H. F. (2010). Fleisch und Wurstwaren. In G. Rimbach, J. Möhring & H. F. Erbersdobler (Eds.), *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger* (pp. 65-95). Heidelberg: Springer Verlag.
33. Searle, J. B. 1984. Breeding the common shrew (*Sorex araneus*) in captivity. *Lab. Anim.*, 18 359-363.
34. Sellers, R. S. 2017. Translating Mouse Models. *Toxicologic pathology*, 45 134-145.
35. Sikes, R. S., and Anim Care Use Comm Amer Soc, M. 2016. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J. Mammal.*, 97 663-688.
36. Simeonovska-Nikolova, D. M. 2004. Seasonal changes in social behaviour and spatial structure of *Crocidura leucodon* in north-western Bulgaria. *Acta Theriol.*, 49 167-179.
37. Simeonovska-Nikolova, D. M. 2004. Vocal communication in the bicoloured white-toothed shrew *Crocidura leucodon*. *Acta Theriol.*, 49 157-165.
38. t Hart, B. A., Bogers, W. M., Haanstra, K. G., Verreck, F. A., and Kocken, C. H. 2015. The translational value of non-human primates in preclinical research on infection and immunopathology. *Eur. J. Pharmacol.*, 759 69-83.
39. VDLUFA Methodenbuch Band 3: Futtermittel. (2016). Darmstadt: VDLUFA-Verlag.
40. Vogel, P., Jutzeler, S., Rulence, B., and Reutter, B. A. 2002. Range expansion of the greater white-toothed shrew *Crocidura russula* in Switzerland results in local extinction of the bicoloured white-toothed shrew *C. leucodon*. *Acta Theriol.*, 47 15-24.
41. Weissenböck, H., Bago, Z., Kolodziejek, J., Hager, B., Palmethofer, G., Durrwald, R., and Nowotny, N. 2017. Infections of horses and shrews with Bornaviruses in Upper Austria: a novel endemic area of Borna disease. *Emerg Microbes Infect*, 6 e52.
42. Zippelius, H.-M. 1957. Zur Karawanenbildung bei der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*). *Bonn. Zool. Bull.*, 8 81-85.

Figures (Paper 3)

Fig 1. Development of the body mass in the first months



Tables (Paper 3)

Table 1. Capture

trapping site	time of trapping	caught bicoloured white-toothed shrews	other caught animals
site A	May 2013	-	1x <i>Sorex araneus</i> , 1x <i>Microtis arvalis</i>
site A	July 2013	2x <i>Crocidura leucodon</i> (#1, #2)	1x <i>Sorex araneus</i>
site A	September 2013	1x <i>Crocidura leucodon</i> (#3)	1x <i>Neomys fodiens</i>
site A	October 2013	3x <i>Crocidura leucodon</i> (#5, #6, #7)	-
site A	April 2014	-	-
site B	June 2014	3x <i>Crocidura leucodon</i> (#8, #9, #10)	-
site A	July 2014	3x <i>Crocidura leucodon</i> (#11, #12, #13)	1x <i>Apodemus flavicollis</i>
site A	Sept 2014	-	5x <i>Crocidura russula</i> , 1x <i>Apodemus sylvaticus</i>
site B	Oct 2014	4x <i>Crocidura leucodon</i> (#14, #15, 2 died within 6 hours)	9x <i>Apodemus sylvaticus</i> , 14x <i>Crocidura russula</i> , 2x <i>Mus domesticus</i>

Table 2. Wild caught *Crocidura leucodon*

Shrew	Sex	time of trapping	trapping site	days in husbandry	mean body mass in g (range)
#1	male	July 2013	site A	1124	12,8 (10,3 – 14,8)
#2	female	July 2013	site A	1215	13,7 (10,0 – 17,3)
#3	female	September 2013	site A	823	13,3 (9,8 – 16,0)
#5	male	October 2013	site A	92	13,2 (10,2 – 15,3)
#6	female	October 2013	site A	91	16,6 (12,9 – 18,9)
#7	male	October 2013	site A	931	13,7 (10,5 – 14,9)
#8	female	June 2014	site B	599	13,2 (9,1 – 17,7)
#9	male	June 2014	site B	895ff	14,3 (9,0 – 17,5)
#10	male	June 2014	site B	722	13,9 (9,4 – 17,6)
#11	female	July 2014	site A	1	
#12	male	July 2014	site A	863ff	15,1 g (11,6 – 16,9)
#13	male	July 2014	site A	863ff	12,5 (11,0 – 14,3)
#14	male	Oct 2014	site B	784ff	10,1 (8,0 – 12,8)
#15	male	Oct 2014	site B	784ff	12,5 (10,8 – 14,7)

Table 3. *Crocidura leucodon* born in captivity

Shrew	Sex	Birth	breeding pair	days in husbandry	mean body mass in g (range)
#16	male	September 2014	#3/#1	432	11,4 (10,0 – 12,8)
#17	female	September 2014	#3/#1	805ff	10,3 (8,8 – 12,3)
#18	female	September 2014	#3/#1	805ff	11,3 (8,6 – 14,7)
#19	female	November 2014	#3/#1	746ff	12,3 (10,0 – 14,9)
#20	female	November 2014	#3/#1	746ff	11,8 (9,9 – 13,5)
#21	male	November 2014	#3/#1	746ff	10,7 (7,7 – 12,0)
#22	female	January 2015	#3/#1	689ff	9,3 (8,1 – 12,4)
#23	female	January 2015	#3/#1	689ff	9,9 (7,7 – 12,0)
#24	female	January 2015	#3/#1	689ff	9,8 (9,0 – 10,8)
#25	female	January 2015	#3/#1	401	11,3 (10,2 – 14,7)
#26	female	January 2016	#22/#21	329ff	7,4 (6,9 – 7,9)
#27	male	January 2016	#22/#21	329ff	7,9 (7,6 – 8,4)
#28	male	January 2016	#22/#21	329ff	8,8 (7,5 – 10,2)
#29	female	March 2016	#22/#21	251ff	7,5 (7,0 – 8,6)
#30	male	March 2016	#22/#21	251ff	8,4 (6,5 – 9,1)
#31	female	March 2016	#22/#21	251ff	7,7 (5,9 – 8,6)
#32	unknown	October 2016	#22/#21	6	

Table 4. Analysis of the shrew diet

	Shrew diet		Earthworm ^a (<i>Lumbricus terrestris</i>)	Mealworm adult ^a (<i>Tenebrio molitor</i>)
Dry matter	26.8 % OS		16.4 % OS	36.3 % OS
Ash	4.1 % OS	15.2 % DM	3.7% DM	3.3 % DM
Crude protein	16.1 % OS	60.0 % DM	64.0% DM	65.3 % DM
Crude fat	3.6 % OS	13.4 % DM	9.8% DM	14.9 % DM
NFE	1.7 % OS	6.3 % DM	22.0% DM	-3.9 % DM
Crude fibre	1.3 % OS	4.9 % DM	6.0% DM	20.4 % DM
Calcium	0.85 % OS	3.2 % DM	0.27% DM	0.06 % DM
Phosphate	0.30 % OS	1.1 % DM	0.97% DM	0.76 % DM
Sodium	0.27 % OS	1.0 % DM	0.08% DM	0.16 % DM
Magnesium	0.10 % OS	0.3 % DM	0.09% DM	0.17 % DM
ME	7.98 kJ/g		2.99 kJ/g	5.79 kJ/g

a Finke et al, 1997

OS: Original substance; DM: Dry matter; NFE: nitrogen-free extract; ME: metabolizable energy

Supporting Information

S1 Table. Overview of mating

female Shrew/age	male Shrew/age	duration of pairing	outcome	time of successful mating
#3/>11 months	#1/>12 months	22 days	3x offspring	in 2 nd week of pairing
#8/>3 months	#13/>2 months	22 days	-	
#3/>13 months	#1/>14 months	30 days	3x offspring	in 1 st week of pairing
#3/>15 months	#1/>16 months	21 days	4x offspring	in 1 st week of pairing
#8/>6 months	#7/>14 months	21 days	-	
#8/>8 months	#7/>16 months	23 days	-	
#8/>10 months	#1/>20 months	23 days	-	
#3/>21 months	#13/>11 months	22 days	-	
#17/>9 months	#16/>9 months	22 days	-	
#19/>11 months	#16/>13 months	33 days	-	
#17/>13 months	#13/>15 months	33 days	-	
#22/>10 months	#21/>12 months	28 days	3x offspring	in 4th week of pairing
#9/>17 months	#18/>13 months	28 days	-	
#2/>28 months	#10/>18 months	35 days	-	
#25/>12 months	#21/>14 months	28 days	female died due to gestation problems with 2 embryos	probable in 2 nd week of pairing
#22/>13 months	#21/>15 months	28 days	3x offspring	in 1 st week of pairing
#22/>18 months	#21/>20 months	28 days	-	
#24/>16 months	#14/>24 months	28 days	-	
#22/>21 months	#21/>23 months	28 days	1x offspring, offspring died at day 6	in 1 st week of pairing
#24/>19 months	#14/>27 months	28 days	-	
#29/>9 months	#27/>12 months	28 days	-	
#24/>24 months	#14/>30 months	28 days	-	

S2 Table. Evaluation of the well-being of *Crocidura leucodon*

Interpretation	
a) Characteristics of healthy shrews	
b) Signs of mild disease, shrew should be observed carefully	
c) Signs of severe disease, immediate action required	
1. Daily food intake	
a.	>0.8x of body mass
b.	>0.5x and >0.8x of body mass
c.	<0.5x of body mass
2. Physical appearance¹	
a.	Coat smooth and shining, orifices of the body clean
b.	Coat staring, ocular and nasal discharges, anus daubed
c.	Piloerection, open wounds
3. Natural behaviour	
a.	Attentive, curious, swift movements, foraging or hiding
b.	Inattentive, reduced and slow or excessive movement, unexplained behaviour
c.	Unconscious, no movement, weak, trembling, heavy breathing
4. Body Mass Compared to body mass measured less than 14 days before ²	
a.	Identical or increased
b.	Reduction of >10 %
c.	Reduction of >20 %
¹ Some animal develop an idiopathic alopecia on the back that can be differentiated from other lesions by the lack of inflammation of the skin and the normal undisturbed behaviour	
² Variations in body mass occur	

5.2 Untersuchung von Betrieben mit equiner BD auf das Vorkommen von Fledermäusen

Zusätzlich zu dem RT-PCR-Screening [Nobach und Herden 2020] und der immunhistologischen Untersuchung [Nobach und Herden 2020] wurde in einzelnen Pferdebetrieben im Endemiegebiet in Bayern, die in den Jahren zuvor mindestens ein Pferd an die Bornasche Krankheit verloren haben, das Vorkommen von Fledermäusen untersucht. Dazu wurden die Betriebe zur Ausflugszeit von Fledermäusen (1 h vor und nach Sonnenuntergang) besichtigt und mittels Echolot-Detektoren Fledermäuse in der Nähe aufgespürt und mittels Echolot-Aufzeichnungen ihre taxonomische Zuordnung bestimmt (siehe Anhang 10.1 „Bestimmung von Fledermäusen mittels Ultraschalldetektoren“). Diese Untersuchungen fanden im Juli 2013 statt.

Die 5 untersuchten Betriebe lagen in Bayern, Regierungsbezirk Schwaben, und in den Jahren 2012-2013 war mindestens ein an der Bornaschen Krankheit erkranktes Pferd aufgetreten (Betrieb 1, Betrieb 2, Betrieb 3, Betrieb 5, Betrieb 6 aus Bourg [2018]).

Ergebnisse

In der Nähe aller Betriebe kamen Fledermäuse vor. Bei allen Betrieben konnten Jagdgebiete entdeckt werden, in der Nähe von Betrieb 1, 2 und 6 fanden sich Hinweise auf Quartiere verschiedener Fledermausarten (Tabelle 7). Das Spektrum der nachgewiesenen Arten beinhaltete Fledermausarten, die weit in der Gegend verbreitet waren, insbesondere Zwergfledermäuse (*Pipistrellus pipistrellus*) sowie seltener Wasserfledermäuse (*Myotis daubentonii*) in der Nähe von Wäldern und Große Abendsegler (*Nyctalus noctula*) bei offenem Gelände. Verschiedene Arten insbesondere der Gattung *Myotis* konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da die Rufe dieser Arten große Gemeinsamkeiten aufweisen.

Tabelle 6 Vorkommen von Fledermäusen in Betrieben mit equiner BD

Betrieb	Beobachtungen von Quartieren mit ausfliegenden Fledermäusen, Jagdgebieten, Flugkorridoren	nachgewiesene Arten mittels Fledermaus-Detektor beim Rundgang	nachgewiesene Arten Echolot-Aufzeichnung (Details in Anhang 10.2)	zusammenfassende Beurteilung des Gebietes
Betrieb 1	Dach Heulager (Zwergfledermaus), Jagdgebiet, kein Hinweis auf Flugkorridore	Breitflügeliedermaus, 1 weitere <i>Myotis</i> sp. (Bechsteinfledermaus, Fransenfledermaus, Wasserfledermaus)	Zwergfledermaus, Mückenfledermaus, Breitflügeliedermaus, Rauhauffledermaus, 1 weitere <i>Myotis</i> sp. (Wasserfledermaus, Große Bartfledermaus)	Jagdgebiet, Verdacht auf mehrere nahegelegene Quartiere
Betrieb 2	Nistkästen (Zwergfledermaus), Scheunendach (keine Art bestimmbar, Berichte von Anwohnern) Jagdgebiet	Zwergfledermaus, Wasserfledermaus, Verdacht auf Bechsteinfledermaus und Fransenfledermaus	Zwergfledermaus, Mückenfledermaus, Wasserfledermaus	Jagdgebiet und einzelne Quartiere

Betrieb	Beobachtungen von Quartieren mit ausfliegenden Fledermäusen, Jagdgebieten, Flugkorridoren	nachgewiesene Arten mittels Fledermaus-Detektor beim Rundgang	nachgewiesene Arten Echolot-Aufzeichnung	zusammenfassende Beurteilung des Gebietes
Betrieb 3	Jagdgebiet, Flugkorridor, kein Hinweis auf Quartiere	Zwergfledermaus, Wasserfledermaus (Flugkorridor) 1 weitere <i>Myotis</i> sp. (Bechsteinfledermaus, Fransenfledermaus, Wimperfledermaus), Rauhhauffledermaus	Zwergfledermaus, Wasserfledermaus	Jagdgebiet, Flugkorridor
Betrieb 5	Jagdgebiet, kein Hinweis auf Quartiere oder Flugkorridore	Zwergfledermaus, Verdacht auf Breitflügel-fledermaus	Großer Abendsegler, Zwergfledermaus, Mückenfledermaus, Wasserfledermaus	Jagdgebiet
Betrieb 6	Dach Scheune (Große Bartfledermaus), Jagdgebiet, Flugkorridor	Großer Abendsegler, Zwergfledermaus, Große Bartfledermaus, 1 weitere <i>Myotis</i> sp. (Fransenfledermaus, Bechsteinfledermaus, Wasserfledermaus)	Großer Abendsegler, Zwergfledermaus, Mückenfledermaus, 1 weitere <i>Myotis</i> sp. (Große Bartfledermaus, Wasserfledermaus, Bechsteinfledermaus, Fransenfledermaus)	Jagdgebiet mehrerer Arten, Flugstrecken, mehrere Quartiere in der Nähe

5.3 Charakterisierung aller Tiere der Feldspitzmaushaltung auf pathologische Veränderungen sowie die Virusverteilung in infizierten Feldspitzmäusen

2019 wurde im Hinblick auf die BoDV-1-Infektion einzelner Tiere der Haltung sowie dem hohen Alter der lebenden Tiere beschlossen, den Unterhalt der Feldspitzmaushaltung einzustellen und mit neuen Gründertieren die Zucht neu zu beginnen.

In Ergänzung zu den Daten der Spitzmaushaltung des Manuskripts „Establishing a husbandry of the bicolored white-toothed shrew“ wurde die Lebensdauer der Tiere aufgeführt sowie mittels Sektion und histologischer Untersuchung die Todesursache versucht zu ermitteln.

Tabelle 7 Übersicht über gefangene Feldspitzmäuse in der Haltung

Nummer	Geschlecht	Fangzeitpunkt	Todesursache	Tage in Haltung	Körpermasse (Mittelwert, in g)
#1 / S1361/16	männlich	Juli 2013	Rundzellentumor	1124	12,8 (10,3 – 14,8)
#2 / S1768/16	weiblich	Juli 2013	Lungenkarzinom, Leberadenom	1215	13,7 (10,0 – 17,3)
#3 / S1687/15	weiblich	Sep 2013	Pankreaskarzinom und maligne Leberneoplasie mit pyogranulomatöser Entzündung	823	13,3 (9,8 – 16,0)
#5 / S120/14	männlich	Okt 2013	Darminvagination	92	13,2 (10,2 – 15,3)
#6 / S119/14	weiblich	Okt 2013	Hepatitis, Pneumonie	91	16,6 (12,9 – 18,9)
#7 / S813/16	männlich	Okt 2013	HerzKreislaufversagen unbekannter Ursache , Basalzelltumor	931	13,7 (10,5 – 14,9)
#8 / S181/16	weiblich	Jun 2014	Rundzellentumor	599	13,2 (9,1 – 17,7)
#9	männlich	Jun 2014	n.u.	758	14,3 (9,0 – 17,5)
#10 / S892/16	männlich	Jun 2014	Nierentumor	722	13,9 (9,4 – 17,6)
#11 / S972/14	weiblich	Juli 2014	Energiemangel	1	n.u.
#12 / S45/17	männlich	Juli 2014	HerzKreislaufversagen unbekannter Ursache	903	15,1 (11,6 – 16,9)
#13 / S924/18	männlich	Juli 2014	n.u.	978	12,5 (11,0 – 14,3)
#14 / S924/18	männlich	Okt 2014	Lebertumoren mit Nekrosen	1353	10,1 (8,0 – 12,8)
#15 / S702/17	männlich	Okt 2014	HerzKreislaufversagen unbekannter Ursache , Leydigzelltumor	941	12,5 (10,8 – 14,7)

Tabelle 8 Übersicht über in der Haltung geborene Feldspitzmäuse

Nummer	Geschlecht	Geburt	Elterntiere	Todesursache	Tage in Haltung	Körpermasse (Mittelwert, in g)
#16 / S1624/15	männlich	Sept 2014	#3/#1	T-Zell-Lymphom	432	11,4 (10,0 – 12,8)
#17 / S925/18	weiblich	Sept 2014	#3/#1	HerzKreislaufversagen unbekannter Ursache	1194	10,3 (8,8 – 12,3)
#18 / S415/18	weiblich	Sept 2014	#3/#1	maligner Rundzellentumor	1278	11,3 (8,6 – 14,7)
#19 / S1243/17	weiblich	Nov 2014	#3/#1	hepatozelluläres Karzinom	1014	12,3 (10,0 – 14,9)
#20 / S1467/17	weiblich	Nov 2014	#3/#1	Rundzellentumor in der Leber	1068	11,8 (9,9 – 13,5)
#21 / S35/17	männlich	Nov 2014	#3/#1	Rundzellentumor in der Lunge	782	10,7 (7,7 – 12,0)
#22 / S840/18	weiblich	Jan 2015	#3/#1	HerzKreislaufversagen unbekannter Ursache	1237	9,3 (8,1 – 12,4)
#23 / S1388/17	weiblich	Jan 2015	#3/#1	Rundzellentumor in der Lunge	997	9,9 (7,7 – 12,0)
#24 / S326/18	weiblich	Jan 2015	#3/#1	eitrige Hepatitis	1145	9,8 (9,0 – 10,8)
#25 / S218/16	weiblich	Jan 2015	#3/#1	Geburtsschwierigkeiten	401	11,3 (10,2 – 14,7)
#26 / S274/19	weiblich	Jan 2016	#22/#21	getötet zur Organentnahme	1141	7,4 (6,9 – 7,9)
#27 / S385/19	männlich	Jan 2016	#22/#21	getötet zur Organentnahme, Lebertumor	1163	7,9 (7,6 – 8,4)
#28 / S1675/18	männlich	Jan 2016	#22/#21	eitrige Hepatitis, Ektoparasitenbefall	1058	8,8 (7,5 – 10,2)
#29 / S384/19	weiblich	März 2016	#22/#21	getötet zur Organentnahme	1085	7,5 (7,0 – 8,6)
#30 / S386/19	männlich	März 2016	#22/#21	getötet zur Organentnahme, Lebertumor	1085	8,4 (6,5 – 9,1)
#31 / S275/19	weiblich	März 2016	#22/#21	getötet zur Organentnahme	1063	7,7 (5,9 – 8,6)
-	nicht bestimmt	Okt 2016	#22/#21	n.u.	6	n.u.
#32 / S502/19	männlich	April 2017	#31/#28	getötet zur Organentnahme	719	9
#33 / S503/19	männlich	April 2017	#31/#28	getötet zur Organentnahme	719	8
#34 / S504/19	weiblich	April 2017	#31/#28	getötet zur Organentnahme	719	8

5.4 Charakterisierung der Virusverteilung in BoDV-1-infizierten Tieren in der Feldspitzmaushaltung

30/33 Tiere wurden immunhistologisch auf BoDV-1-Antigen untersucht (Tabelle 9, verwendeter Antikörper: monoklonaler Maus-Antikörper Bo18, Protokoll siehe Nobach et al. [2015]). Wenn bei einem Tier Antigen im Gehirn nachgewiesen wurde, wurden weitere Organe des Tieres untersucht (Tabelle 10).

Tabelle 9 Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung der Feldspitzmäuse aus der Haltung

Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung	Feldspitzmaus
Nachweis von BoDV-1-Antigen (19/33)	#1/S1361/16, #2/S1768/16, #5/S120/14, #6/S119/14, #12/S45/17, #14/S924/18, #15/S702/17, #17/S925/18, #18/S415/18, #22/S840/18, #23/S1388/17, #24/S326/18, #26/S274/19, #27/S385/19, #28/S1675/18, #30/S386/19, #31/ 275/19, #32/S502/19, #34/S504/19
Kein Nachweis von BoDV-1-Antigen (11/33)	#3/S1687/15; #7/S813/16, #8/S181/16, #11/S972/14, #16/S1624/15, #19/S1243/17, #20/S1467/17, #21/S35/17, #25/S218/16, #29/S384/19, #33/S503/19
Nicht untersucht (3/33)	#9, #10/S892/16, #13

Spitzmäuse bezeichnet nach Kennzeichnung in der Haltung (# __) und Sektionsnummer (S __/ __/ Jahr der Sektion)

Tabelle 10 Immunhistologische Auswertung der Virusverteilung bei persistent BoDV-1-infizierten Feldspitzmäusen

Gewebe	#1 / S1361/16	#2 / S1768/16	#5 / S120/14	#6 / S119/14	#12 / S45/17
Gehirn	++++	++++	++	+++	+++
Rückenmark	++++	+++	++	++	+++
Nasenepithel	n.u.	++	+	+	++
Speicheldrüse	n.u.	++++	++	+	+++
Herzmuskel	neg	+++	neg	neg	+++
Lunge, Bronchialepithel	neg	+	++	+	+
Leber	neg	+	neg	neg	neg ^a
Milz	neg	neg ^a	+	neg	neg
Darm, Epithel	++	+++	neg	neg	+
Darm, glatte Muskulatur	+	+++	+	++	++
Darm, Ganglien	++	+++	+	+	++
Niere, Tubulusepithel	+	++	neg	+	n.u.
Haut, Epidermis und Talgdrüsen	+	+++	neg	++	+++
Braunes Fettgewebe	+++	n.u.	n.u.	n.u.	+++

a) Antigen in Nerven im Gewebe vorhanden

Gewebe	#14 / S924/18	#15 / S702/17	#17 / S925/18	#18 / S415/18	#22 / S840/18
Gehirn	+++	++++	+++	+++	+++
Rückenmark	+++	+++	+++	++	+++
Nasenepithel	+++	n.u.	n.u.	++	++
Speicheldrüse	n.u.	+	n.u.	n.u.	+
Herzmuskel	++	neg	+		++
Lunge, Bronchialepithel	++	neg	neg	neg ^a	n.u.
Leber	+	neg	neg	n.u.	+
Milz	+	neg	neg	+	neg
Darm, Epithel	neg	+	neg	neg	neg
Darm, glatte Muskulatur	++	++	neg	neg	+++
Darm, Ganglien	+	++	++	neg	++
Niere, Tubulusepithel	++	+	neg	neg	n.u.
Haut, Epidermis und Talgdrüsen	+++	neg ^a	+	n.u.	+++
Braunes Fettgewebe	+++	++	n.u.	n.u.	+++

a) Antigen in Nerven im Gewebe vorhanden

Zusätzliche Ergebnisse

Gewebe	#23 / S1388/17	#24 / S326/18	#26 / S274/19	#27 / S385/19	#28 / S1675/18
Gehirn	++++	++++	++++	+++	+++
Rückenmark	+++	+++	+++	++	++
Nasenepithel	+++	n.u.	+++	n.u.	++
Speicheldrüse	n.u.	n.u.	+	+++	n.u.
Herzmuskel	neg	+	n.u.	neg	neg
Lunge, Bronchialepithel	neg	n.u.	++	+	++
Leber	neg	neg	neg	neg	n.u.
Milz		neg	neg	neg	neg
Darm, Epithel	neg	neg	++	neg	n.u.
Darm, glatte Muskulatur	+++	++	+++	+	n.u.
Darm, Ganglien	+++	++	++	+	n.u.
Niere, Tubulusepithel	neg	+	++	n.u.	[+]
Haut, Epidermis und Talgdrüsen	++	+++	+++	++	+
Braunes Fettgewebe	+++	n.u.	++++	n.u.	n.u.

Gewebe	#30 / S386/19	#31 / S275/19	#32 / S502/19	#34 / S504/19
Gehirn	+++	++++	+++	++++
Rückenmark	n.u.	+++	+++	++
Nasenepithel	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Speicheldrüse	++	++	+	+++
Herzmuskel	neg	++	neg	n.u.
Lunge, Bronchialepithel	++	++	++	+++
Leber	neg	neg ^a	neg	neg
Milz	n.u.	neg	neg	n.u.
Darm, Epithel	neg	neg	neg	++
Darm, glatte Muskulatur	++	++	++	+++
Darm, Ganglien	++	++	n.u.	n.u.
Niere, Tubulusepithel	+	+	[+] ^b	+
Haut, Epidermis und Talgdrüsen	neg ^a	++	+	++
Braunes Fettgewebe	n.u.	+++	+++	+++

a) Antigen in Nerven im Gewebe vorhanden

b) Antigen in glatter Muskulatur der Harnröhre

6 Diskussion

Plötzlich auftretende Infektionskrankheiten, im Englischen als „emerging infectious diseases“ bekannt, sind in der heutigen Zeit eine große Bedrohung für die Gesundheit von Tieren und Menschen. Wie man an der aktuell herrschenden Covid-19-Pandemie sehen kann, kann ein Ausbruch zu Auswirkungen auf alle Aspekte der Gesellschaft führen. Auch Infektionserreger wie BoDV-1, die nicht von Mensch zu Mensch übertragbar sind, können schwerwiegende Krankheitsverläufe in Mensch und Tier zur Folge haben und zur einer Bedrohung der öffentlichen Gesundheit werden. Ein Großteil der auftretenden Infektionskrankheiten besitzt Reservoir in Wildtierpopulationen [Bedford et al. 2019, Jones et al. 2008], daher können grundlegende Untersuchungen zur Überschreitung der Speziesgrenze im Sinne des „One-Health“-Gedankens hilfreiche Erkenntnisse zur Verhinderung zukünftiger Ausbrüche bringen.

Viele Reservoir liegen in verschiedenen wildlebenden Nagern oder Fledermäusen [Luis et al. 2013], aber immer öfter werden auch seltenere Tierarten wie Spitzmäuse oder Hörnchen als Reservoir identifiziert. Gleichzeitig wird in der Forschung deutlich, dass die Übertragung von Erkenntnissen von einem Tiermodell auf den Menschen oder andere Tiere problematisch sein kann [Davis 2008, t Hart et al. 2015]. Dies kann bei der Übertragung von Erkenntnissen aus Mausmodellen auf den Menschen beobachtet werden [Masopust et al. 2017], aber ebenso bei der Übertragung von Erkenntnissen aus Tierversuchen mit Labormauslinien auf Wildtierpopulationen [Pedersen und Babayan 2011]. Im Sinne des „Refinements“, einer der drei Säulen des 3-R-Prinzips im Tierschutz, sollten Tierversuche daher an der jeweils am besten geeigneten Tierart durchgeführt werden [Choate et al. 1998, Tannenbaum und Bennett 2015]. Deswegen war Ziel dieser Arbeit, Feldspitzmäuse als Reservoirspezies von BoDV-1 in die Labortierhaltung zu integrieren, um die Pathogenese der BoDV-1-Infektion am lebenden Reserviertier zu charakterisieren. Durch die Untersuchung von natürlich BoDV-1-infizierten Feldspitzmäusen konnten neue Erkenntnisse zur Ausscheidung und Übertragung von BoDV-1 gewonnen werden. Die parallele Untersuchung von Fledermäusen aus Deutschland auf BoDV-1-Infektionen sollte klären, ob diese Tierspezies auch Reservoir für BoDV-1 darstellen können. Zusammengefasst lieferte diese Arbeit grundlegende Kenntnisse zur Reservoirsituation von BoDV-1.

6.1. Etablierung einer Haltung von Feldspitzmäusen

Fang von Feldspitzmäusen

Allgemeine Daten zum Vorkommen von Feldspitzmäusen in Deutschland sowie in bestimmten Bundesländern sind vorhanden [Kraft 2008, Nagel und Nagel 2005], diese Daten sind aber häufig veraltet (von 1980-1990). Zusätzlich beruhen sie teilweise auf Untersuchungen von Gewölle, die eine Spezieszuordnung liefern, aber durch die größeren Fluggebiete der entsprechenden Raubvögel die Standorte nur sehr grob zuordnen können. Da laut Encarnacao et al. [2013] das Vorkommen von Feldspitzmäusen und das Auftreten von BoDV-1-Infektionen mit den gleichen Standortfaktoren wie hoher mittlerer Jahrestemperatur und geringem Niederschlag korreliert sind, wurden die Fangstandorte wenn möglich danach ausgewählt, dass equine BoDV-1-Infektionen in den letzten Jahren oder Monaten auftraten. Dies erklärt teilweise den hohen Anteil von gefangenen Feldspitzmäusen an den beiden Standorten dieser Arbeit, da beide Standorte in direkter Umgebung eines Stalles lagen, in dem im Jahr zuvor ein Pferd an einer BoDV-1-Infektion verstarb.

Innerhalb von zwei Jahren wurden 16 Feldspitzmäuse an zwei Standorten aus der Natur entnommen und 13 Feldspitzmäuse lebend in die Haltung genommen. Für den Beginn einer Feldspitzmauszucht ist dies eine sehr geringe Anzahl an Tieren, laut Richtlinien benötigt man für die erfolgreiche Etablierung eines rotierenden Zuchtsystems mehrere unabhängige Gruppen von Zuchtpaaren [Choate et al. 1998, Nomura 1996]. An den beiden Standorten, an denen die Feldspitzmäuse gefangen wurden, war sowohl der Anteil an Spitzmäusen (38/52) als auch an Feldspitzmäusen (16/52) an den insgesamt gefangenen Tieren sehr hoch. Dieser liegt gemäß anderen wissenschaftlichen Studien über dem erwarteten Wert von 1/10 Spitzmäuse [Little und Gurnell 1989] und deutet auf sehr spitzmausreiche Standorte sowie einen funktionierenden Köder (Mehlwürmer) hin, der bevorzugt Spitzmäuse anlockt. An anderen Standorten war sowohl die insgesamt Zahl an Tieren als auch an Spitzmäusen deutlich geringer und Feldspitzmäuse wurden an keinem anderen Standort gefangen.

Laut Roter Liste Deutschlands [International Union for Conservation of Nature and Nature Resources (IUCN) 2013] ist die Feldspitzmaus auf der Vorwarnliste, in einigen Gebieten wie beispielsweise Hessen gehört sie zu den stark gefährdeten Arten [Haupt et al. 2009]. Zusätzlich ist in einigen Gebieten zu beobachten, dass die Feldspitzmaus durch die nah verwandte Hausspitzmaus ersetzt wird [Frank 1984, Vogel et al. 2002]. Da die Fänge im Sommer bis Herbst durchgeführt wurden, in der die höchsten Populationsdichten zu erwarten sind [Little und Gurnell 1989, Nagel und Nagel 2005] und aufgrund der geringen Anzahl an Tieren, die pro Zeitpunkt aus der Natur entnommen wurden, war nicht mit einer negativen Beeinflussung der natürlichen Population zu rechnen.

Von 16 lebend gefangenen Feldspitzmäusen konnten 13 erfolgreich in die Haltung genommen werden. 2 Tiere starben innerhalb von 6h nach dem Fang, beide in einer Fangnacht, in der eine große Anzahl

von gefangenen Tieren eine sehr hohe Populationsdichte zeigte, aber aufgrund der Jahreszeit (Oktober/Herbst) schon eine Reduktion des Nahrungsangebots zu erwarten war. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Tiere schon geschwächt zum Fangzeitpunkt waren. Das Nahrungs- und Wasserangebot in den Fallen und eine Überprüfung der Fallen spätestens alle 6 Stunden sollen Todesfälle durch Energiemangel und Hypothermie verhindern, dennoch bedeutet der Fang Stress für die Tiere, so dass es bei geschwächten Tieren zu Todesfällen kommen kann [Do et al. 2013]. Ein Tier (#11) starb innerhalb der ersten 24h in der Haltung. Es zeigte in dieser Zeit keine Futteraufnahme, da es anscheinend das angebotene Futter nicht als Nahrungsquelle akzeptierte, und in der makroskopischen und histologischen Untersuchung fanden sich keine Anzeichen für eine infektiöse Ursache oder ein Trauma als alternative Todesursachen.

Da die Fangstandorte im endemischen Gebiet von BoDV-1 lagen, stellten sich 8/13 Feldspitzmäuse als natürlich mit BoDV-1-infiziert heraus. Sowohl der Transport in einzelnen Transportkäfigen aus Plastik als auch die Einzelkäfige in der Haltung tragen damit sowohl dem Einzelgänger-Charakter der Feldspitzmäuse [Nagel und Nagel 2005] als auch der Verhinderung von Übertragungen durch Kontakt Rechnung. Infizierte Wildfänge stellen zwar zum einen im gewissen Maße eine „Blackbox“ da, da der Zeitpunkt und die Route der Infektion sowie weitere Co-Faktoren wie beispielsweise Alter und Immunstatus der Tiere sowie Co-Infektionen nicht bekannt sind, die die Infektion beeinflussen können [Herden et al. 2013]. Zum anderen stellen sie aber auch ein Modell da, das bis zur Entnahme aus der Natur dem natürlichen System entspricht. Dies ermöglichte die Untersuchung von chronischen BoDV-1-Infektionen bei lebenden Feldspitzmäusen.

Charakteristika der Haltung

Bei der Etablierung der Haltung wurde, wenn möglich, mit Materialien gearbeitet, die für Labortierhaltungen hergestellt wurden, damit die hygienischen und tierschutzrechtlichen Anforderungen an eine zeitgemäße Labortierhaltung eingehalten werden [Choate et al. 1998] und die Zucht mit vertretbarem Aufwand dauerhaft betrieben werden kann.

Die Spitzmäuse wurden im Inneren eines Gebäudes mit definierten Bedingungen bei Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichtregime gehalten. Dies widerspricht dem Ansatz der Tierhaltungen von Hellwing, Searle und Ohno, die ihre wildgefangenen Spitzmäuse dauerhaft außerhalb von Gebäuden unter natürlichen Witterungen gehalten haben [Hellwing 1973, Ohno et al. 1992, Searle 1984]. Käfige außerhalb von Gebäuden können Kontakt mit wildlebenden Nagern, Insektenfressern oder Vögeln beziehungsweise deren Ausscheidungen ermöglichen, im Hinblick auf Hygiene und Biosicherheit empfehlen daher heutige Richtlinien [Choate et al. 1998] die Haltung im Inneren, um die Übertragung von Krankheitserregern sowohl in die Haltung als auch in freilebende Tierpopulationen zu verhindern.

Die beobachteten Alopezien bei den Feldspitzmäusen können ebenso wie die geringe Zuchtleistung einiger Tiere mit mangelndem Sonnenlicht zusammenhängen [Choate et al. 1998].

Ebenso aus Hygienegründen wurde auf die bei Searle und Hellwing verwendeten Holzboxen [Hellwing 1973, Searle 1984] verzichtet und es wurden stattdessen Plastikkäfige verwendet, die aufgrund der standardisierten Maße auch in Racks verwendet werden konnten. Die Deckel der Käfige mussten gesondert hergestellt werden, um der geringen Körpergröße der Feldspitzmäuse Rechnung zu tragen. Da diese Deckel aus Stahl sind, können sie einfach gereinigt und autoklaviert oder sterilisiert werden.

Wie in den früheren Haltungen [Hellwing 1973, Ohno et al. 1992, Searle 1984] wurde als Bodensubstrat eine Mischung von Erde und Sägespänen verwendet, die im Voraus autoklaviert werden kann. Dies verbindet die nötigen Hygienebedingungen mit dem aus Tierschutz nötigen „Enrichment“. Das weiter angebotene „Enrichment“-Material (Stroh, Holzbrett, Haus) wurde in unterschiedlichen Kombinationen auch bei den früheren Haltungen angewandt. Stroh wurde auch bei Hellwing verwendet, wohingegen bei Searle Heu und Zellstoff oder Baumwolle und bei Ohno Papierschnitzel als Nistmaterial verwendet wurden [Hellwing 1973, Ohno et al. 1992, Searle 1984]. Das „Enrichment“ wurde von den Feldspitzmäusen verwendet. Einzelheiten zu favorisiertem „Enrichment“-Material sind noch nicht bekannt und benötigen weitere detaillierte Auswahlstudien, um es gegebenenfalls zu optimieren.

Wasser in Wasserschalen war die Standarddarreichung bei früheren Haltungen [Hellwing 1973, Ohno et al. 1992, Searle 1984] und wurde auch bei der Feldspitzmaushaltung verwendet. Durch die tägliche Erneuerung des Wassers und der Gefahr des Verschüttens durch die Tiere und damit einhergehender Durchnässung der Einstreu führt es zu einem erhöhten Arbeitsaufwand [Choate et al. 1998], benötigt aber keine Gewöhnung der Tiere an alternative Tränksysteme und konnte daher auch von den Wildfängen verwendet werden.

Das angebotene Futter orientierte sich an den Rezepten von Hellwing [1973] und Searle [1984] und verwendete Fleisch als Basis. Die berechnete metabolische Energie des Futters von 7,98kJ/g führt zu einer hohen Energieaufnahme im Vergleich zu einem vermuteten Energiebedarf im Bereich von 3,4 kJ/g/Tag (Hausspitzmaus) bis 6,7-9,7 kJ/g/Tag (Waldspitzmaus). Die Kontrolle des Körpergewichts zeigte eine initiale Gewichtszunahme bei Wildfängen und Nachzucht, die nach einigen Wochen um einen individuellen Wert schwankte. Bei der Sektion von gestorbenen Tieren wurden keine großen Fetteinlagerungen gefunden, allerdings wurden nur Tiere seziiert, die gestorben oder aufgrund von Krankheitssymptomen euthanasiert wurden, so dass zu diesem Zeitpunkt Fetteinlagerungen während des Krankheitsgeschehens möglicherweise wieder abgebaut worden waren. Der Vergleich der Werte aus der Futteranalyse mit Werten von Regenwürmern oder Mehlwürmern zeigte den hohen Rohproteingehalt von 60 % Trockenmasse und den niedrigen Trockenmasseanteil von 26,8 %. Durch

den Anteil an Leber mit im Vergleich zu Muskelfleisch höherem Gehalt an Eisen, Zink sowie Vitamin A und B [Rimbach et al. 2010] sowie der Verwendung von Pellets mit Insektenanteil sollen spezielle Bedürfnisse der „Insektenfresser“ ausgeglichen werden, insbesondere der bekannte Mangel von insektenhaltiger Nahrung an Vitamin A und Thiamin und Niacin (B-Vitamine) [Finke 2002]. Frühere Haltungen verwendeten im Handel erhältliche Mineral- und Vitaminfutter als Zusatz, die aber auf die Bedürfnisse von Fleischfressern angepasst waren [Hellwing 1973, Searle 1984]. Da es keine Referenzdaten zu dem Bedarf an Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen von Feldspitzmäusen gibt, kann eine Überdosierung oder ein Mangel nicht ausgeschlossen werden. Die beobachtete Alopezie kann in diesem Zusammenhang stehen, da beispielsweise ein Überangebot an Vitamin A oder ein Mangel an Riboflavin zu Haarverlust führen kann [Almohanna et al. 2019]. Frank [1953] beobachtete nicht näher beschriebene Haarwechselstörungen bei Feldspitzmäusen bei ausschließlicher Fütterung mit Feldmausfleisch, die durch Zugabe von Insektennahrung behoben wurden.

Zucht von Feldspitzmäusen

Aus den 13 lebenden Feldspitzmäusen, die in die Haltung genommen wurden, wurden innerhalb von 6 Jahren 19 Nachkommen in 3 Generationen gezüchtet. Dies ist auf der einen Seite ein Zeichen, dass die Spitzmäuse die Haltungsbedingungen prinzipiell angenommen haben, ist aber auf der anderen Seite auch deutlich weniger erfolgreich als frühere Zuchten wie Hellwing mit 19 Geburten innerhalb eines Jahres [Hellwing 1973]. Der Hauptunterschied zu Hellwing ist die geringere Anzahl an erfolgreichen Zuchtpaaren, da alle Nachkommen aus 3 Zuchtpaaren kommen. 11 andere Zuchtpaarkombinationen führten nicht zu einer erfolgreichen Paarung. Dies kann zur einer Inzuchtdepression führen, da die Verpaarung von nah verwandten Tieren bei der geringen Anzahl nicht zu vermeiden ist. In der Natur kommt es bei Hausspitzmäusen, einer nah verwandten Art, regelmäßig zu Paarungen von Tieren einer Familie, die nicht zu einer reduzierten Fitness führen [Duarte et al. 2003]. In der Haltung konnte allerdings beobachtet werden, dass die Tiere der ersten, zweiten und dritten Generation geringere Körpergewichte zeigten als die Wildfänge, was möglicherweise schon ein Zeichen für eine Inzuchtdepression darstellen kann.

Durch den Einsatz von zuerst nur einer, später zweier Zuchtboxen war das parallele Zusammensetzen von Zuchtpaaren sehr eingeschränkt. Die große Box ermöglichte Ausweichverhalten, so dass es keine Ausfälle von Tieren durch Bisswunden oder andere Folgen von aggressiven Verhalten gab. Im Gegenteil konnte beobachtet werden, dass das aggressive Verhalten eingestellt wurde, wie es in der Natur aus ressourcenreichen Gebieten bekannt ist [Churchfield 1990]. Gleichzeitig erschwerte die Größe der Box aber auch das Füttern und die Handhabung der Tiere. Da die Box zusätzlich aus Holz und damit schwer

zu reinigen war und sich im Nachhinein ergab, dass ein Kontakt von Tieren zwischen den beiden Zuchtboxen möglich war, sollten in Zukunft andere Systeme verwendet werden.

Beobachtete Krankheiten in der Haltung

Die Beobachtung der Feldspitzmäuse in der Haltung ermöglichte prinzipiell das Erkennen von Krankheitsanzeichen und Verhaltensänderungen. Wildtiere haben allerdings die Tendenz, Krankheitsanzeichen so lange wie möglich zu verbergen, um nicht leichtes Opfer von Jägern zu werden [Sikes 2016]. Daher waren die deutlichsten Hinweise auf Belastungen bei den Feldspitzmäusen eine verringerte Futtermittelaufnahme sowie eine plötzliche Gewichtsabnahme. Da das Körpergewicht alle 2 Wochen gemessen wurde, wurden längerfristige Belastungen bemerkt, kurzfristige Belastungen konnten nur durch Verhaltensänderungen bemerkt werden. Durch den Mangel an Berichten in der wissenschaftlichen Literatur zu sowohl normalem Verhalten als auch zu Krankheitsanzeichen wurden Referenzwerte durch Beobachtung der Feldspitzmäuse in der Haltung gewonnen und nur deutliche Abweichungen davon als krankhaft angesehen. Bei der Beurteilung, ob die BoDV-1-Infektion der Spitzmäuse zu klinischen Anzeichen führt, wurde daher der Vergleich von infizierten und nicht-infizierten Spitzmäuse zur Hilfe herangezogen.

Durch die postmortale Untersuchung konnte ein hoher Anteil an Neoplasien in der Haltung festgestellt werden. Teilweise kann dies auf das hohe Lebensalter der Tiere zurückgehen, insbesondere bei der Häufung von neoplastischen Rundzellen kann eine familiäre Disposition nicht ausgeschlossen werden, da die betroffenen Tiere sehr wahrscheinlich nah verwandt waren. Daneben fanden sich auch mehrere gestorbene Tiere, bei denen keine Ursache für das plötzliche Herzkreislaufversagen gefunden wurde. Diese Tiere mit „Altersschwäche“ zeigten häufig auch einen schlechteren Ernährungszustand, so dass ein finaler Energiemangel auch möglich ist.

6.2. Natürliche BoDV-1-Infektion bei Feldspitzmäusen

Verlauf der BoDV-1-Infektion in lebenden Feldspitzmäusen

Von den ersten 11 lebend gefangenen Feldspitzmäusen stellten sich 6 als natürlich BoDV-1-infiziert heraus [Nobach et al. 2015]. Durch die später gefangenen Feldspitzmäuse erhöhte sich die insgesamt Zahl von BoDV-1-infizierten Feldspitzmäusen auf 8 von 16 Tieren, bei denen gleiche Beobachtungen wie bei den publizierten Ergebnissen gemacht wurden. Alle diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens 4 Wochen in der Haltung und damit in der chronischen, persistenten Phase der Infektion.

BoDV-1-infizierte und nicht-infizierte Tiere unterschieden sich weder im Verhalten noch in der Aktivität oder in der Futteraufnahme. Der statistische Vergleich der Körpermasseentwicklung zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren führte zu keinen signifikanten Unterschieden. Weiterhin konnten bei infizierten Tieren keine Krankheitsanzeichen wie gestäubtes Fell oder neurologische Symptome beobachten werden. Dies deutet darauf hin, dass trotz der Virusreplikation in einer Vielzahl von Organen [Bourg et al. 2013, Dürrwald et al. 2014, Puorger et al. 2010] und hoher Viruslast im Gehirn [Bourg et al. 2013, Dürrwald et al. 2014, Puorger et al. 2010] keine Beeinträchtigung der physiologischen Vorgänge stattfindet. Histologische Untersuchungen zeigten, dass die BoDV-1-Infektion auch zu keinen entzündlichen oder degenerativen Veränderungen bei der Feldspitzmaus führte [Bourg et al. 2013, Dürrwald et al. 2014, Puorger et al. 2010]. BoDV-1 führt zu einer persistenten, nicht-zytolytischen Infektion von empfänglichen Zellen [Carbone et al. 1991, Morales et al. 1988]. Die dafür notwendigen einzigartigen Replikationsstrategien von BoDV-1, die insbesondere die Transkription und Replikation auf einem niedrigen Niveau halten und den Zelltod durch Apoptose oder Lyse verhindern, sind durch zahlreiche Studien, sowohl *in vitro* als auch in verschiedenen Tiermodellen, schon untersucht worden [zusammengefasst in Planz et al. 2009, Tizard et al. 2016, Tomonaga et al. 2002]. Ob in der Feldspitzmaus Unterschiede zu diesen bekannten Mechanismen bestehen, wurde noch nicht untersucht. Für die Persistenz im Wirtsorganismus ist zusätzlich notwendig, die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen, damit diese den Erreger nicht eliminiert [Oldstone 2006, Randall und Griffin 2017]. Bei Fehlwirten, die an der Bornaschen Krankheit erkranken, führt die Infektion zu einer T-Zell medierten Enzephalitis [Herden et al. 2013], die beim Fehlwirt je nach Lokalisation im Gehirn zu unterschiedlichen neurologischen Symptomen führt [Grabner et al. 2002]. Die Gründe, warum die Infektion des Reservoirwirts Feldspitzmaus nicht zu einer Aktivierung des Immunsystems führt, sind noch nicht bekannt. Allerdings ist auch von anderen Virus-Reservoirbeziehungen bekannt, dass die Toleranz des Wirtes gegenüber der Infektion hoch sein kann [Carval und Ferriere 2010, Schneider und Ayres 2008]. So ist beispielsweise auch bei verschiedenen Fledermausarten bekannt, dass das Immunsystem stark auf der unspezifischen Immunantwort beruht

[Schountz 2014] und Unterschiede in den Interferon-induzierten Mechanismen im Vergleich zu anderen Säugetieren bestehen [Brook et al. 2020, Irving et al. 2021]. Besonderheiten zum Immunsystem von Feldspitzmäusen oder von Spitzmäusen allgemein sind bisher noch kaum erforscht und könnten möglicherweise die hohe Toleranz der BoDV-1-Infektion erklären.

Bei bestimmten Rattenstämmen wie beispielsweise „black-hooded“ Farbratten ist bekannt, dass die Infektion zur Replikation von BoDV-1 im Gehirn, aber nicht zur Enzephalitis führt [Herzog et al. 1991]. Die dabei beobachtete Resistenz ist vererbbar, der Mechanismus konnte leider nicht vollständig geklärt werden, ist aber unabhängig von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC-Molekülen) [Herzog et al. 1991]. Bei einem anderen Rattenstamm, den Sprague-Dawley Ratten, konnte der Locus eines Resistenzgens auf einem Chromosom identifiziert werden [Wu et al. 2013].

Die bornaviralen endogenen Elementen, die im Genom von verschiedenen Tierarten entdeckt wurden, könnten über verschiedene Mechanismen mit exogenen Bornaviren interagieren [Horie 2017]. So wurde bei einem EBL von Baumstreifenhörnchen gezeigt, das das kodierte Protein die Infektion mit exogenen Bornaviren beeinflusst und hemmt [Fujino et al. 2014]. EBL wurden im Genom einer Spitzmausart (*Sorex araneus*) entdeckt [Belyi et al. 2010], das Genom von Feldspitzmäusen oder anderen Spitzmäusen der Gattung *Crociodura* wurde bisher nicht untersucht. Dürrwald et al. fanden DNA-Kopien in 3/14 BoDV-1-infizierten Feldspitzmäusen, deren Sequenz mit der RNA der Viren übereinstimmte [Dürrwald et al. 2014]. Die Integration dieser Sequenzen ins Genom wurde in der Studie nicht weiter untersucht und die Bedeutung bleibt unklar. Die Entdeckung endogener bornaviraler Elemente, die während der phylogenetischen Entwicklung der Feldspitzmause ins Genom integriert wurden, wurde daher noch nicht veröffentlicht und über eine mögliche Bedeutung in der Pathogenese der BoDV-1-Infektion oder den Toleranzmechanismen in der Feldspitzmaus kann daher nur spekuliert werden.

Ein ähnlicher Verlauf wie bei der Feldspitzmaus wird bei der BoDV-1-Infektion von neonatalen immuninkompetenten Lewisratten beobachtet. Hier führt die Infektion zu einer Immuntoleranz mit Ausbreitung über das Nervensystem bis in periphere Organe [Herzog et al. 1984, Morales 1988]. In diesen Ratten können im weiteren Verlauf der Infektion erhöhte Bewegung, Defizite im Lernverhalten und Veränderung im Sozialverhalten beobachtet werden [Bautista et al. 1995, Carbone et al. 1991]. Hinweise darauf fanden sich bei den Feldspitzmäusen nicht, sollten aber in zukünftigen Verhaltensstudien überprüft werden. Von anderen Infektionen wie dem Einzeller *Toxoplasma gondii* ist bekannt, dass die Veränderung des Wirtsverhalten zu einer erhöhten Übertragungswahrscheinlichkeit führt [da Silva und Langoni 2009]. Eine solche Übertragungsstrategie ist auch bei BoDV-1 vorstellbar.

Ausscheidung von BoDV-1 durch infizierte Feldspitzmäuse

Diese Arbeit zeigt, dass BoDV-1-infizierte Feldspitzmäuse infektiöse Viren über Speichel, Haut und Urin ausscheiden. BoDV-1-RNA wurde außerdem in Speichel, Tränenflüssigkeit, Hauttupfer mit Hautsekreten und Hautschuppen, Urin und Kot festgestellt. Dies ist der erste Beweis, dass Feldspitzmäuse bei einer BoDV-1-Infektion nicht nur einen Virustropismus in Ausscheidungsorgane aufweisen, sondern auch wie vermutet infektiöses Virus ausscheiden und damit als Überträger fungieren können. Bei Puorger et al. wurde ebenfalls Urin mittels RT-PCR untersucht, allerdings keine BoDV-1-RNA nachgewiesen [Puorger et al. 2010]. In der damaligen Studie wurde der Urin direkt in der Falle mittels Papier aufgenommen, wohingegen in unserer Studie der Urintropfen mit einem Tupfer aufgenommen wurde, möglicherweise ermöglichte das eine schnellere Bearbeitung und damit einen geringeren Abbau der RNA. Auch ist eine intermittierende Ausscheidung bei infizierten Feldspitzmäusen möglich. Bei der Untersuchung über vier aufeinanderfolgende Wochen war bei zwei Tieren in jeweils einer Woche keine BoDV-1-RNA im Urin nachzuweisen. Ebenso war im Kot nur vereinzelt BoDV-1-RNA nachzuweisen, dies könnte allerdings auch durch inhibitorische Substanzen im Kot verursacht sein, die die PCR beeinträchtigen können [Hoffmann et al. 2005].

Die Untersuchung nach 250 Tagen in der Haltung zeigte, dass auch zu diesem späten Zeitpunkt der Infektion (da die Infektion vor dem Fang stattgefunden hat) die Ausscheidung über Speichel, Tränenflüssigkeit, Hautsekreten oder Hautschuppen und Urin stattfand. Im Kot war zu diesem Zeitpunkt bei keinem Tier virale RNA nachzuweisen. Dies kann aber auch ein falsch negativer Befund durch inhibitorische Substanzen im Kot sein [Hoffmann et al. 2005] oder darauf hindeuten, dass die Ausscheidung über den Kot im Verlauf der Infektion eingestellt wird.

Die Kombination von Immunhistochemie und *in-situ* Hybridisierung kann durch den gleichzeitigen Nachweis von viralem Antigen, viraler genomischer RNA und viraler mRNA demonstrieren, in welchen Organen der Feldspitzmaus die Replikation und Transkription des Virus stattfindet [Bourg 2018, Dürrwald et al. 2014, Puorger et al. 2010]. Zusammen mit dem Nachweis von viraler RNA und infektiösem Virus in Exkreten und Sekreten dieser Organe konnten so Ausscheidungsorgane für das Virus identifiziert werden.

In der Speicheldrüse wurde in verschiedenen Untersuchungen [Bourg 2018, Dürrwald et al. 2014, Nobach et al. 2015, Puorger et al. 2010] Virusantigen und genomische RNA und mRNA in Drüsenzellen nachgewiesen. In keiner der Untersuchungen wurde angegeben, welche Speicheldrüsen untersucht wurden, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob es Unterschiede in der Infektion zwischen den Speicheldrüsen gibt. Bei den Arbeiten unserer Arbeitsgruppe [Bourg 2018, Nobach et al. 2015] wurde die Glandula parotidea untersucht. Puorger et al. [2010] wiesen Virusantigen in Nervenfasern der Speicheldrüse sowie in vereinzelt liegenden Drüsenzellen nach, während die

Verteilung bei Dürrwald et al. [2014] und Bourg [2018] sowie in eigenen Untersuchungen in einzelnen Foki von benachbarten Drüsenzellen lag. Da von BoDV-1 bekannt ist, dass es sich zentripetal über Axone ausbreiten kann [Carbone et al. 1987, Morales et al. 1988], sind die Nervenfasern die wahrscheinlichste Eintrittspforte in die Speicheldrüse. Zu Übertragungswegen des Virus von Nervenfasern in Drüsenzellen ist noch nichts bekannt. Beim verwandten Tollwutvirus, erfolgt die Replikation und Ausscheidung ebenfalls in den Speicheldrüsen. Der Eintritt in die Speicheldrüsen passiert dabei über nikotinerge Rezeptoren [Finke und Conzelmann 2005]. Die zellulären Rezeptoren von BoDV-1 sowie die Mechanismen der Übertragung von Nervenfasern in epitheliale oder mesenchymale Zellen in peripheren Organen sind noch nicht bekannt und sollten in weiteren Studien geklärt werden.

In der Tränendrüse war Virusantigen, genomische RNA und mRNA ebenfalls in Drüsenzellen nachzuweisen [Bourg 2018, Nobach et al. 2015]. In anderen Untersuchungen in Spitzmäusen wurde diese Drüse nicht aufgeführt, allerdings wurde in neonatalen Lewisratten auch infektiöses Virus im Tränensekret nachgewiesen [Morales et al. 1988]. Ähnliche Ausbreitungsmechanismen wie bei der Speicheldrüse können daher vermutet werden. Da Tränensekret mittels Tupfer vom Auge aufgenommen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Hautsekrete und Hautschuppen der Haut am Lid sowie der periokulären Haut aufgenommen wurden.

In der Haut wurde Virusantigen sowie genomische RNA und mRNA in Talgdrüsen sowie in Epithelzellen der Epidermis nachgewiesen [Bourg 2018, Dürrwald et al. 2014, Nobach et al. 2015, Puorger et al. 2010]. Aufgrund der Menge an positiven Talgdrüsen kann die Ausscheidung über Talgsekret deutlich zur Virusausscheidung betragen. Daneben ist eine Ausscheidung über abgeschilferte Epithelzellen möglich. Beide Ausscheidungswege sind bei anderen neurotrophen Viren [Calisher et al. 2006, Griffin 2010] bisher nicht beschrieben und damit einzigartig für BoDV-1.

Die Ausscheidung von infektiösem Virus über den Urin kann durch Nierenzellen oder in den harnableitenden Wegen erfolgen. Sowohl Nierentubuli und Nervenfasern in der Niere [Bourg 2018, Dürrwald et al. 2014, Nobach et al. 2015, Puorger et al. 2010] als auch Epithelzellen in den harnableitenden Wegen wie Harnblase [Bourg 2018, Puorger et al. 2010] und Urethra [Puorger et al. 2010] wiesen Antigen auf. In der Niere konnte ebenso genomische RNA und mRNA nachgewiesen werden [Bourg 2018]. Die Virusverteilung zeigte hier ein Bild von einzelnen Herden mehrerer benachbarter infizierter Zellen. Eine Ausbreitung von Nierenzelle zu Nierenzelle findet daher möglicherweise nur im begrenzten Rahmen statt, die genauen Mechanismen sind noch nicht bekannt.

Die Ausscheidung über den Kot kann durch Virusreplikation in mehreren Organsystemen verursacht werden, prinzipiell vorstellbar sind die Drüsen und Epithelien in den verschiedenen Darmabschnitten und im Magen, Leberzellen, die über die Galle Kontakt zum Darm aufweisen sowie Drüsen und

Epithelien im oberen Verdauungstrakt mit Speiseröhre und Mund- und Rachenraum. Daneben kann auch abgeschlucktes Sekret aus der Luftröhre und der Lunge im Kot landen, dies ist aber vor allem dann zu beobachten, wenn ein Exsudat in der Lunge entsteht und war bei BoDV-1-infizierten Spitzmäusen nicht zu beobachten. Obwohl Puorger et al. [2010] in der Leber Virusantigen in Hepatozyten nachweisen konnte, war in den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [Bourg 2018, Nobach et al. 2015] kein Virus in der Leber nachzuweisen. Ob der Unterschied im Infektionsverlauf durch Wirtsfaktoren oder Virusfaktoren verursacht wird, muss in weiteren *in vivo* und *in vitro* Studien getestet werden. Virusantigen war im Darm auf das enterale Nervensystem [Puorger et al. 2010] sowie die Muskelschichten [Nobach et al. 2015] beschränkt, eine direkte Ausscheidung in den Darm war nicht erklärbar. Im Magen war hingegen in einigen Hauptzellen Virusantigen zu finden [Puorger et al. 2010], eine Ausscheidung über die Hauptzellen oder über Abschilferung von Epithelzellen des oberen Verdauungstraktes ist damit wahrscheinlicher. Ob das Virus nach der Darmpassage und der Aussetzung von saurem Magensaft und alkalischen Darminhalt infektiös bleibt, wurde nicht getestet, ist aber unwahrscheinlich, da BoDV-1 im Labor nur pH-Werte von 5 bis 12 übersteht [Danner und Mayr 1979, Rott und Becht 1995].

Die Virusverteilung von BoDV-1 in der Feldspitzmaus unterscheidet sich vom Neurotropismus in Fehlwirten. Eine ähnliche Virusverteilung findet man aber beim verwandten VSBV-1 im dortigen Reservoirwirt, den Hörnchen [Petzold et al. 2019]. Dies deutet darauf hin, dass die zugrundeliegenden Ursachen und Mechanismen von mehreren Orthobornaviren geteilt werden [Petzold et al. 2019].

Übertragungswege innerhalb der Feldspitzmauspopulation

Die Ausscheidung über verschiedene Routen kann die Übertragung von Feldspitzmaus zu Feldspitzmaus ermöglichen. Dies wurde auch erstmalig durch ungezielte Übertragungen innerhalb der Haltung demonstriert. Über die Eintrittspforte in die Feldspitzmaus ist noch nichts bekannt, einzelne Verlaufsformen mit Konzentration des Virus auf Nase, Gehirn und Kopfbereich lassen vermuten, dass die intranasale Route, wie es bei Fehlwirten gezeigt wurde [Kupke et al. 2019], als Eintrittspforte fungieren kann [Bourg 2018]. Durch das infektiöse Virus auf der Hautoberfläche ist weiterhin die direkte Übertragung durch Kontakt möglich. Ob bestimmte Verhaltensweisen, wie das Beschnupern zur olfaktorischen Erkennung von Urin-, Kot- oder Hautsekretmarkierungen, substantiell zur Übertragung beitragen, kann nur vermutet werden. Ebenso ist unklar, ob die Ausscheidung über den Speichel im Zusammenhang mit aggressivem Territorialverhalten eine Übertragung über Bisswunden möglich macht. Bei Versuchen mit Ratten und Infektion von BoDV-1 in den Fuß konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme über freie Nervenendigungen und intraaxonaler Transport zum Rückenmark zur Verbreitung des Virus innerhalb des Wirtes beiträgt [Carbone et al. 1987].

Ob neben der horizontalen Übertragung eine vertikale Übertragung stattfinden kann, muss noch geklärt werden, Virusantigen im Uterus und Hoden [Bourg 2018, Puorger et al. 2010] deutet darauf hin. Durch die kontinuierliche Ausscheidung durch eine infizierte Mutter kann aber auch möglicherweise eine perinatale Infektion von Nachkommen stattfinden.

Komplizierte Infektionsketten mit Beteiligung von beispielsweise Insekten als Zwischenwirt oder Vektor sind prinzipiell vorstellbar. So könnte die Replikation in Hautanhangsgebilden wie Talgdrüsen sowie dem Epithel die Übertragung über Hautparasiten ermöglichen. Ob solche Übertragungswege vorkommen und ob sie neben dem direkten Kontakt eine tragende Rolle beim Erhalt innerhalb der Feldspitzmauspopulation spielen, kann in weiteren Studien geklärt werden.

Bei anderen Viren wie den Spitzmaus-Hepatitis B-Viren wurde gezeigt, dass diese Viren trotz weitflächiger Beprobung nur in sehr begrenzten Standorten vorkommen und daher wahrscheinlich nur ein geringer Austausch von Infektionserregern zwischen räumlich getrennten Spitzmauspopulationen stattfindet [Rasche et al. 2019]. Die Beobachtung hängt möglicherweise mit der geringen räumlichen Ausbreitung von jungen Spitzmäusen nach dem Entwöhnen von der Mutter zusammen [Duarte et al. 2003, Dürrwald et al. 2014]. Dies kann erklären, warum trotz des Verbreitungsgebietes der Feldspitzmaus im südosteuropäischen Raum sowie in Asien die Fälle von BD nur im Zentraleuropa auftreten, wenn die Feldspitzmauspopulationen in diesen Gebieten keine BoDV-1-Infektionen aufweisen.

Übertragungswege zu Fehlwirten

Die phylogenetische Analyse in dieser Studie bestätigt die Ergebnisse von anderen Studien [Bourg et al. 2013, Kolodziejek et al. 2005, Niller et al. 2020]. Bornavirusisolate zeigen deutliche Unterschiede zwischen den endemischen Gebieten, aber nicht zwischen verschiedenen betroffenen Tierarten im gleichen Gebiet. So zeigen auch die zwei sequenzierten Isolate aus Feldspitzmäusen die größte Ähnlichkeit mit Isolaten aus Pferden und Spitzmäusen aus der gleichen Gegend (Regierungsbezirk Schwaben). Dies belegt, dass eine gemeinsame Quelle für Neuinfektionen besteht.

Im Gegensatz zur Übertragung innerhalb der Feldspitzmauspopulation ist der direkte Kontakt von Feldspitzmaus zu Fehlwirten wie Pferd oder Mensch ein seltenes Ereignis. Der Nachweis von BoDV-1-RNA in der Umgebung der Feldspitzmaus demonstriert aber, dass durch die Ausscheidung auch die Umgebung kontaminiert werden kann. BoDV-1 kann bei einer Temperatur von 4°C über drei Monate infektiös bleiben. Allerdings sind sie als behüllte Viren anfällig gegenüber den üblichen Desinfektionsmitteln [Danner und Mayr 1979, Herden et al. 2013]. Durch Kontamination der Umwelt könnte es zu „infektiösen Stäuben“ kommen, die zur intranasalen Infektion führen können. Diese Infektionsquelle ist von Hantaviren und dem Reservoirwirt Rötelmaus bekannt [Schwarz et al. 2009].

Im Zusammenhang mit humanen Infektionen wird über eine Vektorfunktion von Katzen spekuliert [Niller et al. 2020], die durch den Transport von erbeuteten Feldspitzmäusen in die Nähe ihrer menschlichen Katzenhalter auch BoDV-1 transportieren können. Die Untersuchungen von Beutegreifern von Spitzmäusen wie Katzen oder Füchse in Endemiegebieten offenbarte allerdings keine erhöhte Prävalenz in diesen Tieren [Bourg et al. 2016, Kolodziejek et al. 2005, Lempp et al. 2017].

6.3. Untersuchung auf BoDV-1-Infektionen in Fledermäusen

Vorkommen von Fledermäusen in Ställen mit vorherigen Fällen von equiner BD

Die eigene Untersuchung auf Fledermausvorkommen zeigte, dass in den untersuchten Ställen Quartiermöglichkeiten für die Zwergfledermaus, Wasserfledermaus, Große Bartfledermaus sowie nicht näher klassifizierbare *Myotis spp.* vorhanden sind. Daneben fanden sich häufig Jagdgebiete von Zwergfledermäusen sowie vereinzelt Jagdgebiete und Flugstrecken von verschiedenen anderen Arten. Dies spiegelt das Spektrum von Fledermausarten wider, das in dieser Gegend vorkommt [Meschede und Rudolph 2004]. Insbesondere die häufigen Arten wie die Zwergfledermaus findet man regelmäßig in direkter Nähe zu Menschen und landwirtschaftlichen Gehöften. Dies deutet darauf hin, dass eine Übertragung von Pathogenen aus der Fledermauspopulation auf landwirtschaftliche Tiere prinzipiell möglich ist. Über die Häufigkeit solcher Ereignisse kann keine Aussage getroffen werden. In Europa geht man von sehr seltenen Ereignissen aus [Kohl und Kurth 2014].

Die Kombination aus Begehung sowie paralleler Aufzeichnung von akustischen Signalen im Sonogramm ist eine übliche Technik zur Bewertung von Fledermausvorkommen. Die Stunden um den Sonnenuntergang und Sonnenaufgang stellen auch die beste Zeit für diese Untersuchungen da, da hier durch Aus- und Einflug aus Quartieren die höchste Aktivität der Fledermäuse stattfindet [Meschede und Rudolph 2004]. Für eine vollständige Kartierung des Fledermausvorkommens vor Ort ist es allerdings nötig, Begehung und Aufzeichnung an mehreren Tagen zu wiederholen, um Einflüsse des Wetters und sonstiger Variablen auszuschließen. Da hier auf eine Wiederholung verzichtet wurde und nur eine sehr geringe Anzahl an Betrieben untersucht wurde (n=5), kann die Untersuchung nur ein sehr vorläufiges Bild des Fledermausvorkommens geben. Für eine fundierte Bestätigung des Ergebnisses sollte die Untersuchung an diesen und weiteren Gehöften an verschiedenen Zeiten des Jahres wiederholt werden sowie mit anderen Untersuchungen wie Netzfang kombiniert werden, um ein umfassendes Bild der Quartiere und Fledermausvorkommen zu bekommen.

Untersuchung auf BoDV-1-Infektionen in Fledermäusen mittels RT-PCR und immunhistologischer Untersuchung

Die Untersuchung von Gehirnen von Fledermäusen verschiedener Arten aus ganz Deutschland zeigte in 257 Tieren keinen Hinweis auf orthobornvirale RNA. Die Verwendung von Gehirn als Testmaterial führt bei den bekannten Infektionsverläufen von BoDV-1 sowohl bei Endwirten [Grabner et al. 2002, Niller et al. 2020] als auch bei dem Reservoirwirt Feldspitzmaus [Bourg 2018, Bourg et al. 2013, Dürrwald et al. 2014, Hilbe et al. 2006, Nobach et al. 2015, Puorger et al. 2010, Weissenböck et al. 2017] zum Nachweis des Virus mittels RT-PCR. Eine Infektion mit BoDV-1 nach den bekannten Infektionsverläufen wäre damit durch die Untersuchung entdeckt worden. Aufgrund der Entdeckung von anderen Säugetierbornaviren wie VSBV-1 [Hoffmann et al. 2015] wurde eine RT-PCR verwendet,

die neben BoDV-1 auch andere zu dem Zeitpunkt bekannte Orthobornaviren nachweisen sollte. Hinweise auf die detektierbaren 7 Spezies (*Mammalian 1 orthobornavirus*, *Mammalian 2 orthobornavirus*, *Passeriform 1 orthobornavirus*, *Passeriform 2 orthobornavirus*, *Psittaciform 1 orthobornavirus*, *Psittaciform 2 orthobornavirus*, *Waterbird 1 orthobornavirus*) fanden sich mittels der angewendeten RT-PCR nicht. In der immunhistologischen Untersuchung zum Nachweis von BoDV-1-Phosphoprotein gab es bei 3 von 140 Tieren eine Reaktion in der glatten Muskulatur des Darmes. Aufgrund ähnlicher Immunreaktionen in 17 anderen Fledermäusen, die auch mit unspezifischen polyklonalen Antikörpern ausgelöst werden konnten, muss man bei der Interpretation dieser Reaktionen vorsichtig sein. Da die Reaktion mit polyklonalen Antikörpern ausgelöst wurde, bei denen eine Reaktion mit bornaviralem Phosphoprotein von verschiedenen Orthobornaviren (BoDV-1, VSBV-1, PaBV-2, PaBV-4) bekannt ist [Hoffmann et al. 2015, Piepenbring et al. 2012], ist eine Infektion mit bisher unbekanntem Bornaviren dennoch möglich. Das RT-PCR Screening ergab keine Hinweise auf andere Orthobornavirusinfektionen, diese offenkundige Diskrepanz könnte aber durch einen primären Tropismus auf den Darm (und nicht das Nervensystem) dieser Bornaviren oder durch andere Sequenzen im Bereich der Primeransatzstellen zu erklären sein, durch die sie nicht mit der RT-PCR zu detektieren wären. Die zuletzt entdeckten Carboviren weisen eine im Vergleich zu anderen Bornaviren veränderte Genomorganisation auf, da sich bei ihnen eine andere Reihenfolge der 5 offenen Leserahmen zeigen [Hyndman et al. 2018]. Ähnliche grundlegende Unterschiede sind auch bei anderen noch unentdeckten Bornaviren möglich. Um solche Bornaviren zu entdecken, sollten neben der klassischen RT-PCR breitere und ungezieltere Screening-Methoden wie eine Metagenomanalyse verwendet werden. Die Metagenomanalyse hat bei der Entdeckung von VSBV-1 [Hoffmann et al. 2015] sowie dem sharpbelly-Bornavirus [Shi et al. 2018] ihre Nützlichkeit bei der Entdeckung von Bornaviren bewiesen. Bei den bisher veröffentlichten Metagenomanalysen von Fledermäusen wurden erst in einem Fall bornavirusähnliche Sequenzen entdeckt [Dacheux et al. 2014]. Bei dieser Studie wurden bei einer Fransenfledermaus (*Myotis natterii*), fünf Zwergfledermäusen (*Pipistrellus pipistrellus*) und einer Alpenfledermaus (*Hypsugo savii*) Sequenzen entdeckt, die durch eukaryotische Sequenzen im Umfeld als endogene Sequenzen deklariert wurden.

Da neben dieser Studie auch in weiteren Studien Bornavirus-ähnliche endogene Sequenzen entdeckt wurden [Dacheux et al. 2014, Horie et al. 2016, Mukai et al. 2018], besteht auch die Möglichkeit, dass die beobachteten immunhistologischen Reaktionen eine Reaktion mit translatierten endogenen Sequenzen darstellen. Die nachgewiesenen endogenen Sequenzen bei Fledermäusen haben jedoch Ähnlichkeiten mit der viralen Polymerase, ein endogenes Element mit Ähnlichkeiten mit einer Sequenz, die für das Phosphoprotein codiert, wurde bisher noch nicht entdeckt. Einige Autoren vermuten einen schädlichen Effekt eines endogenisierten Phosphoproteins [Horie und Tomonaga 2019], da das Phosphoprotein durch die Interaktion mit Phosphatasen des Wirtes unter anderem die

Neurogenese beeinflusst [Scordel und Couplier 2015]. Gleichzeitig ist auch ein Schutz vor einer Bornavirusinfektion durch ein endogenes Phosphoprotein denkbar, wie es schon bei einem endogenen Nukleoprotein gezeigt wurde [Fujino et al. 2014], da das Phosphoprotein bei einem gestörten Nukleoprotein-Phosphoprotein zu einer Hemmung der Virus-Polymerase führt [Schneider et al. 2003].

6.4. Aktuelle Reservoirsituation von BoDV-1

Die equine BD ist eine sporadisch auftretende Krankheit, die endemisch in Mitteleuropa vorkommt [Dürwald et al. 2006]. Durch die Aufhebung der Meldepflicht 2011 gibt es keine vollständige Auflistung der Inzidenz in den letzten Jahren, die erneute Einführung im März 2020 wird hier in Zukunft genauere Daten liefern. In den Jahren 1990-2009 wurden im Endemiegebiet Bayern 451 Fälle gemeldet [Reichelt 2009], also ca. 23 Fälle pro Jahr. Insbesondere die Entdeckung von mindestens 30 humanen BD-Fällen ab 2017 [Coras et al. 2019, Finck et al. 2020, Korn et al. 2018, Liesche et al. 2019, Niller et al. 2020, Schlottau et al. 2018] hat aber erneut die Bedeutung von BoDV-1-Infektionen demonstriert.

Der endemische Charakter, die Häufung von Krankheitsfällen in bestimmten Jahren sowie in bestimmten Monaten [Dürwald et al. 2006] und Isolate, die sich weniger zwischen verschiedenen Tierarten als zwischen den verschiedenen endemischen Regionen unterscheiden [Kolodziejek et al. 2005], deuteten schon lange auf ein oder mehrere Wildtierreservoir als Quelle der BoDV-1-Infektionen. Damit eine Tierart ein Reservoir für einen Erreger darstellen kann, müssen drei Voraussetzungen erfüllt werden [Ashford 1997, Drexler et al. 2012, Haydon et al. 2002, Webster 2016]. Es müssen 1) natürliche Infektionen mit dem Erreger vorkommen, 2) Routen existieren, durch die der Erreger übertragen werden kann und 3) der Erreger in der Lage sein, Speziesbarrieren zu überwinden. Die Demonstration von Infektionen in wildlebenden Feldspitzmäusen durch verschiedene Studien [Bourg et al. 2013, Dürwald et al. 2014, Hilbe et al. 2006, Puorger et al. 2010, Weissenböck et al. 2017] bestätigten, dass Feldspitzmäuse als Reservoirwirt in Betracht kommen. Die ebenso gezeigte Virusverteilung in den Feldspitzmäusen [Bourg 2018, Dürwald et al. 2014, Puorger et al. 2010] mit BoDV-1 in verschiedenen Ausscheidungsorganen ließ eine Ausscheidung stark vermuten. Die Ähnlichkeit zur Verteilung in neonatal infizierten immuninkompetenten Lewisratten, bei denen eine Ausscheidung von infektiösem Virus bereits gezeigt wurde [Herzog et al. 1984, Morales et al. 1988], waren weitere Hinweise auf die Ausscheidung. Durch diese Arbeit wurde belegt, dass infizierte Feldspitzmäuse wie vermutet infektiöses Virus ausscheiden. Dadurch existieren verschiedene Routen, durch die BoDV-1 von der Feldspitzmaus aus übertragen werden kann. Da BoDV-1 bei verschiedenen Tierarten vorkommt [Kolodziejek et al. 2005], kann es prinzipiell auch die Speziesbarriere überwinden. Da bei der Isolierung der Spitzmausisolate primäre Zellen von Kaninchenembryos verwendet wurden, wurde die Speziesgrenze *in vitro* bereits überwunden. Durch weitere *in vivo* Studien könnte dies in Zukunft bei weiteren Fehlwirten demonstriert werden. Die bis zu 100 % Übereinstimmung in Gensequenzen von Isolaten aus Spitzmäusen und Pferden [Bourg et al. 2013] lässt aber sehr wahrscheinlich erscheinen, dass mit Spitzmausisolaten auch Fehlwirte infiziert werden können. Nach Plowright et al. [2017] kann man versuchen, das Risiko eines Speziesübertritt abzuschätzen. Auf Seiten der Erregerlast („pathogen pressure“) [Plowright et al. 2017] ist noch wenig über die Prävalenz von BoDV-1 in der Spitzmauspopulation bekannt, da die Anzahl an Tieren in den Studien [Bourg et al. 2013,

Dürwald et al. 2014, Hilbe et al. 2006, Puorger et al. 2010, Weissenböck et al. 2017] gering ist und die Zahlen sehr stark schwanken (zwischen 5 % und 100 %). Nach unseren eigenen Untersuchungen scheint die Prävalenz in infizierten Subpopulationen recht hoch zu sein [8/16 Tieren]. Da die persistente BoDV-1-Infektion keine offensichtlichen Krankheitssymptome verursacht und die Toleranz der Infektion [Schneider und Ayres 2008] recht hoch zu sein scheint, gibt es keine Hinweise auf Selektionsnachteile bei infizierten Tieren. Die dauerhafte Ausscheidung bei infizierten Tieren von infektiösem Virus über verschiedene Routen und über einen langen Zeitraum kann zu einer vergleichsweise hohen Erregerlast in der Umwelt führen [Plowright et al. 2017]. Die Aussetzung mit dem Erreger („Exposure“) [Plowright et al. 2017] von anderen Spezies sowie die Schutzbarrieren [Plowright et al. 2017] führen wahrscheinlich dazu, dass BD nur sporadisch auftritt. Dies sieht man auch an dem hohen Anteil an seropositiven Pferden in Ställen mit wenigen manifesten BD-Fällen [Grabner et al. 2002, Herzog et al. 1994]. Weitere Faktoren wie Genetik, Alter und Immunstatus des Fehlwirtes sowie die Infektionsdosis des Virus können eine zusätzliche Rolle spielen [Herden et al. 2013].

Die Feldspitzmaus stellt das einzige bisher bekannte Reservoir von BoDV-1 da. Die experimentelle Infektion von Rötelmäusen [Kinnunen et al. 2011] zeigt einen Verlauf der BoDV-1-Infektion mit Ausscheidung von BoDV-1-RNA, der sie theoretisch als Reservoirspezies qualifizieren würde. In Feldstudien wurden bisher allerdings nur Rötelmäuse mit Serumantikörpern gegen Bornaviren entdeckt und keine akut oder persistent BoDV-1-infizierte Rötelmäuse [Bourg 2018, Bourg et al. 2013, Kinnunen et al. 2007], so dass die Reservoirfunktion in endemischen Gebieten fraglich bleibt. Hingegen konnten in dieser Arbeit keine Hinweise dafür gefunden werden, dass in europäischen Fledermäusen BoDV-1-Infektionen vorkommen. Es gibt daher keine Hinweise, dass sie ein Reservoir von BoDV-1 darstellen. Die phylogenetische Verbindung von Fledermäusen zu Bornaviren sowie das Vorkommen von anderen, bisher unbekanntem Bornaviren bei Fledermäusen sollte allerdings in weiteren Studien untersucht werden.

Ausblick

BoDV-1 wurde Anfang des 21. Jahrhunderts als Virus angesehen, das interessante Eigenschaften besitzt, allerdings aufgrund stetig sinkender Infektionen eine schwindende Bedeutung für die Allgemeinheit besaß. Die Entdeckung von neuen verwandten Bornaviren [Amarasinghe et al. 2018, Hoffmann et al. 2015, Honkavuori et al. 2008, Kistler et al. 2008] sowie die Demonstration des zoonotischen Potentials mit überwiegend tödlichem Ausgang der Human- und Tierinfektion [Korn et al. 2018, Niller et al. 2020, Schlottau et al. 2018] hat die Bedeutung von BoDV-1 gezeigt und das Interesse neu entfacht. Die Zunahme von zoonotischen Infektionen mit Naturreservoir und die dadurch entstehenden Krankheiten und Epidemien bekräftigen zusätzlich die Bedeutung von

Reservoiren für die menschliche Gesundheit im Sinne des „One-Health“-Konzeptes. Das Verständnis, welche Mechanismen und Interaktionen zwischen Virus und Reservoir die besondere Reservoirsituation ermöglichen oder zum Übertritt in andere Tiere und den Menschen führen, kann dazu beitragen, solche spillover-Ereignisse in Zukunft vorherzusagen oder zu verhindern. Studien zu BoDV-1-Infektionen in der Feldspitzmaus und der zugrundeliegenden, weiterhin in weiten Teilen unbekanntem Pathogenese bieten hier eine einzigartige Chance. Die direkte Untersuchung der Reservoirspezies in *in vivo* Studien kann zu entscheidenden Erkenntnissen führen, da die Probleme der fehlenden Übertragbarkeit von Erkenntnissen zwischen Tiermodellen verringert werden.

7 Zusammenfassung

Viele Virusinfektionen und „emerging infectious diseases“ (EID) besitzen ein Reservoir in wildlebenden Tierpopulationen, von der Übertragungen der Infektionserreger auf Haustiere und Menschen stattfinden. Dies stellt eine beträchtliche Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar und Tiermodelle, die die Reservoirsituation widerspiegeln, können durch die Erforschung grundlegender Mechanismen Hinweise für zukünftige Bekämpfungstrategien liefern.

Borna disease virus (BoDV-1) ist seit langer Zeit als Erreger der Bornaschen Krankheit (BD) bekannt, einer neurologischen, tödlichen Erkrankung bei Säugetieren, insbesondere bei Pferden und Schafen. Kürzlich wurde auch der zoonotische Charakter von BoDV-1 gezeigt und bisher wurden mehr als 30 humane Todesfälle auf BoDV-1 zurückgeführt.

Die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) wird als Reservoir von BoDV-1 in verschiedenen endemischen Regionen vermutet, da mehrfach Wildfänge mit natürlichen BoDV-1-Infektionen gefunden wurden und das Verteilungsmuster mit Virustranskription und Replikation in Ausscheideorganen auf eine Virusausscheidung hindeutet.

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war, durch Untersuchungen an lebenden infizierten Feldspitzmäusen die BoDV-1-Infektion im Reserviertier näher zu charakterisieren. Insbesondere eine Aussage über die Ausscheidung von BoDV-1 durch infizierte Feldspitzmäuse sollte getroffen werden. Zur Erreichung dieses Ziels sollte eine Feldspitzmaushaltung und -zucht etabliert werden, um die Infektion unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. In einem zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob Fledermäuse, die aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften häufig als Reservoir für Viren fungieren und bei denen endogene Bornavirus-ähnliche Elemente im Genom verschiedener Arten gefunden wurden, natürliche BoDV-1-Infektionen aufweisen und damit als weiteres Reservoir von BoDV-1 in Frage kommen.

Für den ersten Teil der Arbeit wurden innerhalb von zwei Jahren 16 Feldspitzmäuse an zwei Standorten aus der Natur entnommen und 13 Feldspitzmäuse lebend in die Haltung genommen. Die Bedingungen und Anpassungen der Haltung an die spezifischen Bedürfnisse von Feldspitzmäusen wurden beschrieben und mit den Ansätzen früherer Spitzmaushaltungen verglichen. Innerhalb von 6 Jahren wurden 19 Nachkommen in 3 Generationen gezüchtet. Der Mittelwert der Lebensdauer in der Haltung bei den Wildfängen betrug 810 Tage (91 Tage bis 1353 Tage), der Mittelwert der Lebensdauer der in der Haltung geborenen Spitzmäuse betrug 963 Tage (401 Tage bis 1278 Tage). Die meisten ermittelten Todesursachen beinhalteten Neoplasien, die mit dem hohen Lebensalter in Zusammenhang stehen

können. Die erfolgreiche Etablierung der Haltung ermöglichte die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit an den Spitzmäusen.

Von den 16 gefangenen Feldspitzmäusen waren 8 zum Zeitpunkt des Fanges mit BoDV-1 infiziert und ermöglichten die Charakterisierung der natürlichen persistenten BoDV-1-Infektion an lebenden Feldspitzmäusen. BoDV-1-infizierte und nicht-infizierte Tiere unterschieden sich weder im Verhalten noch in der Aktivität oder in der Futterraufnahme. Der statistische Vergleich der Körpermasseentwicklung zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren führte zu keinen signifikanten Unterschieden. BoDV-1-infizierte Feldspitzmäuse schieden infektiöse Viren über Speichel, Haut und Urin aus, wie mittels Virusanzucht gezeigt wurde. BoDV-1-RNA wurde mittels RT-PCR in Speichel, Tränenflüssigkeit, Hauttupfer mit Hautsekreten und Hautschuppen, Urin und Kot festgestellt, interessanterweise zusätzlich auch in der Einstreu. Bei der Untersuchung über 4 aufeinanderfolgende Wochen war bei 2 Tieren in einzelnen Urinproben keine BoDV-1-RNA nachzuweisen, dies kann auf eine intermittierende Ausscheidung hinweisen. Die Untersuchung nach mehr als 250 Tagen in der Haltung zeigte, dass auch zu diesem späten Zeitpunkt der Infektion die Ausscheidung über Speichel, Tränenflüssigkeit, Hautsekreten oder Hautschuppen und Urin stattfand. Die postmortale Untersuchung der infizierten Tiere zeigte keine entzündlichen oder degenerativen Veränderungen im Zusammenhang mit der Infektion, mittels Immunhistochemie und *in-situ*-Hybridisierung konnte Replikation und Transkription des Virus im Nervensystem und in vielen peripheren Organen gezeigt werden und als Ausscheideorgane die Speicheldrüse, die Tränendrüse, die Niere und Harnblase und die Haut mit Talgdrüsen und Epidermis identifiziert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch in der Umgebung der infizierten Spitzmaus BoDV-1-RNA mit der RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Dies und die Ausscheidung über verschiedene Routen kann die Übertragung von Feldspitzmaus zu Feldspitzmaus ermöglichen und damit den Erhalt des Virus in der Reservoirpopulation, gleichzeitig aber auch die Übertragung auf Fehlwirte.

Für den zweiten Teil der Arbeit wurden 6 Betriebe mit vorherigen Fällen von equiner BD exemplarisch auf das Vorkommen von Fledermäusen mittels Begehung und Aufzeichnungen von Ultraschalldetektoren untersucht. Dabei wurden Quartiere und Jagdgebiete von einem Spektrum von Fledermäusen identifiziert, die eine weite Verbreitung in der Gegend besitzen. Die Untersuchung von Gehirnen von Fledermäusen verschiedener Arten aus ganz Deutschland mittels RT-PCR zeigte in 257 Tieren keinen Hinweis auf orthobornvirale RNA. Dabei wurde eine RT-PCR verwendet, die neben BoDV-1 auch andere zu dem Zeitpunkt bekannte Orthobornviren nachweisen sollte (7 detektierbare Spezies: *Mammalian 1 orthobornavirus*, *Mammalian 2 orthobornavirus*, *Passeriform 1 orthobornavirus*, *Passeriform 2 orthobornavirus*, *Psittaciform 1 orthobornavirus*, *Psittaciform 2 orthobornavirus*, *Waterbird 1 orthobornavirus*). In der immunhistologischen Untersuchung zum Nachweis von BoDV-1-Phosphoprotein gab es bei 3 von 140 Tieren eine Reaktion in der glatten

Muskulatur des Darmes. Eine Reaktion mit bisher unbekanntem Bornaviren oder auf translatierte endogene Bornavirus-ähnliche Elemente konnte nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst hat diese Arbeit neue Erkenntnisse zur Reservoirsituation von BoDV-1 hervorgebracht. Trotz des Vorkommens von endogenen Bornavirus-ähnlichen Elementen im Genom verschiedener Fledermausarten gibt es keinen Hinweis darauf, dass sich Fledermäuse natürlich mit BoDV-1 infizieren oder eine Rolle als Reservoir für BoDV-1 spielen. Hingegen hat diese Arbeit gezeigt, dass infizierte Feldspitzmäuse persistent infiziert sind und dauerhaft BoDV-1-RNA und infektiöses Virus über verschiedene Routen ausscheiden, und hat damit den Reservoircharakter von Feldspitzmäusen als natürliches Reservoir für BoDV-1 bewiesen.

8 Summary

Many virus infections and emerging infectious diseases (EID) have a reservoir in wild animal populations with pathogen transmission to domestic animals and humans. This poses an imminent threat to public health and studies on animal models reflecting the reservoir situation can provide basic mechanisms to improve future control strategies.

For a long time, Borna disease virus (BoDV-1) is known as the aetiologic agent of Borna disease (BD), a fatal neurologic disorder of mammals, that affects especially horses and sheep. Recently, the zoonotic potential of BoDV-1 has been demonstrated and more than 30 human fatalities have been so far traced back to BoDV-1 infections.

Bicoloured white-toothed shrews (*Crocidura leucodon*) are considered reservoirs of BoDV-1 in various endemic regions, as wild caught shrews with natural BoDV-1 infections have been found several times and the distribution pattern with viral transcription and replication in excretion organs have indicated virus transmission.

The aim of the first part of the study was to further characterize BoDV-1 infection in the reservoir species by carrying out studies on living BoDV-1 infected bicoloured white-toothed shrews. The main research focus was set to find evidence on shedding of virus by BoDV-1 infected shrews. To achieve this goal, a husbandry and breeding colony of *C. leucodon* was established to investigate the infection under controlled conditions. A second part of the study investigated whether bats, which due to their biological properties often act as a reservoir for viruses and in which endogenous bornavirus-like elements were found in the genome of different species, have natural BoDV-1 infections, and could be considered as an additional reservoir of BoDV-1.

In the first part of the study, sixteen *C. leucodon* were taken from nature at two sites within two years to found a husbandry with thirteen living bicoloured white-toothed shrews. Conditions and adaptations of the husbandry to the specific needs of *C. leucodon* were described and compared with the approaches of other shrew holdings. Within six years, 19 offspring were bred in 3 new generations. The mean lifespan of the wild catches was 810 days (91 days to 1353 days), the mean lifespan of the shrews born in the husbandry was 963 days (401 days to 1278 days). Most of the causes of death comprised of neoplasms, which may be related to high age. The successful establishment of the husbandry enabled further observations of this study.

Of the sixteen *C. leucodon* caught, eight were infected with BoDV-1 at the time of the catch, allowing the characterization of natural persistent BoDV-1 infection in living bicoloured white-toothed shrews. Activity and behaviour during day and night light regime and food intake did not differ between

infected and non-infected animals. Furthermore, there was no significant difference on relative body mass trend between infected and non-infected animals. As shown by virus cultivation, BoDV-1 infected *C. leucodon* spread the virus through saliva, skin, and urine. BoDV-1 RNA was detected by RT-PCR in saliva, lacrimal fluid, skin swabs with dander and sebum, urine, and faeces, interestingly also in the litter. For over a period of 4 weeks of monitoring for virus shedding, BoDV-1 RNA was undetectable in single urine samples of 2 animals, which may indicate intermittent excretion. Additional testing after more than 250 days in husbandry revealed virus shedding in saliva, lacrimal fluid, dander and sebum, and urine at this late time point after infection.

The post mortem examination of infected animals showed no inflammatory or degenerative lesions that could be related to BoDV-1 infection. By immunohistochemistry and in-situ hybridisation, virus replication and transcription was demonstrated both in the nervous system and in peripheral organs. Therefore, salivary gland, lacrimal gland, kidney, urinary bladder, and skin with sebaceous glands and epidermis could be identified as organs responsible for transmission. Additionally, BoDV-1 RNA was demonstrated by RT-PCR in the environment of infected shrews. The contaminated environment and virus shedding over different routes can enable shrew-to-shrew transmission and therefore the maintenance in the reservoir population, but also transmission to spillover hosts.

In the second part of the study, the environment of six horse farms with previous cases of BD were examined for the presence of bats by means of inspection and recordings of ultrasound detectors. Roosts and hunting areas of a variety of common European bat species were identified. Additionally, brain samples of 257 bats of different species from Germany were tested by RT-PCR without any evidence of orthobornaviral RNA. The applied RT-PCR-assay was designed to detect BoDV-1 and several other known orthobornaviruses (7 detectable species: *Mammalian 1 orthobornavirus*, *Mammalian 2 orthobornavirus*, *Passeriform 1 orthobornavirus*, *Passeriform 2 orthobornavirus*, *Psittaciform 1 orthobornavirus*, *Psittaciform 2 orthobornavirus*, *Waterbird 1 orthobornavirus*). Immunohistological examination for the detection of BoDV-1 phosphoprotein revealed a immunoreaction in 3/140 animals in smooth muscle cells of the intestine. A reaction associated with so far unknown bornaviruses or with translated endogenous bornaviral elements could not be excluded.

In summary, this study enlightened the reservoir situation of BoDV-1. Despite the presence of endogenous bornaviral elements in the genome of different bat species, there is no evidence that bats naturally become infected with BoDV-1 or play a role as a reservoir for BoDV-1. However, this study demonstrated the persistent character of BoDV-1 infection in bicoloured white-toothed shrew with long time shedding of BoDV-1 RNA and infectious virus over different routes, thus proving the reservoir character of *C. leucodon* as a natural reservoir of BoDV-1.

9 Literaturverzeichnis

Afonso CL, Amarasinghe GK, Banyai K, Bao Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand FX, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Chandran K, Cheng J, Clawson AN, Collins PL, Dietzgen RG, Dolnik O, Domier LL, Durrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Farkas SL, Freitas-Astua J, Formenty P, Fouchier RA, Fu Y, Ghedin E, Goodin MM, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiang D, Kitajima EW, Kobinger GP, Kondo H, Kurath G, Lamb RA, Lenardon S, Leroy EM, Li CX, Lin XD, Liu L, Longdon B, Marton S, Maisner A, Muhlberger E, Netesov SV, Nowotny N, Patterson JL, Payne SL, Paweska JT, Randall RE, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Schwemmler M, Shi M, Smither SJ, Stenglein MD, Stone DM, Takada A, Terregino C, Tesh RB, Tian JH, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Vasilakis N, Verbeek M, Volchkov VE, Wahl-Jensen V, Walsh JA, Walker PJ, Wang D, Wang LF, Wetzel T, Whitfield AE, Xie JT, Yuen KY, Zhang YZ, Kuhn JH (2016): Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2016. Arch Virol 161(8): 2351-2360.

Algermissen D (2010): Nachweis von Borna Disease Virus-spezifischen Proteinen und deren subgenomischer RNA bei natürlich infizierten Pferden. Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.

Almohanna HM, Ahmed AA, Tsatalis JP, Tosti A (2019): The Role of Vitamins and Minerals in Hair Loss: A Review. Dermatol Ther (Heidelb) 9(1): 51-70.

Amarasinghe GK, Arechiga Ceballos NG, Banyard AC, Basler CF, Bavari S, Bennett AJ, Blasdel KR, Briese T, Bukreyev A, Cai Y, Calisher CH, Campos Lawson C, Chandran K, Chapman CA, Chiu CY, Choi KS, Collins PL, Dietzgen RG, Dolja VV, Dolnik O, Domier LL, Durrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Echevarria JE, Fooks AR, Formenty PBH, Fouchier RAM, Freuling CM, Ghedin E, Goldberg TL, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiang D, Kityo R, Kobinger GP, Kondo H, Koonin EV, Krupovic M, Kurath G, Lamb RA, Lee B, Leroy EM, Maes P, Maisner A, Marston DA, Mor SK, Muller T, Muhlberger E, Ramirez VMN, Netesov SV, Ng TFF, Nowotny N, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Payne SL, Prieto K, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Schwemmler M, Siddell S, Smither SJ, Song Q, Song T, Stenglein MD, Stone DM, Takada A, Tesh RB, Thomazelli LM, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Vasilakis N, Vazquez-Moron S, Verdugo C, Volchkov VE, Wahl V, Walker PJ, Wang D, Wang LF, Wellehan JFX, Wiley MR, Whitfield AE, Wolf YI, Ye G, Zhang YZ, Kuhn JH (2018): Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2018. Arch Virol.

Amarasinghe GK, Ayllon MA, Bao Y, Basler CF, Bavari S, Blasdel KR, Briese T, Brown PA, Bukreyev A, Balkema-Buschmann A, Buchholz UJ, Chabi-Jesus C, Chandran K, Chiapponi C, Crozier I, de Swart RL, Dietzgen RG, Dolnik O, Drexler JF, Durrwald R, Dundon WG, Duprex WP, Dye JM, Easton AJ, Fooks AR, Formenty PBH, Fouchier RAM, Freitas-Astua J, Griffiths A, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiang D, Kitajima EW, Kobinger GP, Kondo H, Kurath G, Kuzmin IV, Lamb RA, Lavazza A, Lee B, Lelli D, Leroy EM, Li J, Maes P, Marzano SL, Moreno A, Muhlberger E, Netesov SV, Nowotny N, Nylund A, Okland AL, Palacios G, Palyi B, Paweska JT, Payne SL, Prospero A, Ramos-Gonzalez PL, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Shi M, Simmonds P, Smither SJ, Sozzi E, Spann K, Stenglein MD, Stone DM, Takada A, Tesh RB, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, van den Hoogen B, Vasilakis N, Wahl V, Walker PJ, Wang LF, Whitfield AE, Williams JV, Zerbini FM, Zhang T, Zhang YZ, Kuhn JH (2019): Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2019. Arch Virol 164(7): 1967-1980.

Ashford RW (1997): What it takes to be a reservoir host. Belgian Journal of Zoology 127: 85-90.

Ashford RW (2003): When is a reservoir not a reservoir? *Emerg Infect Dis* 9(11): 1495-1496.

Baker ML, Schountz T, Wang LF (2013): Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health* 60(1): 104-116.

Barataud M (2015): Acoustic Ecology of European Bats. Species Identification, Study of their Habitats and Foraging Behaviour. Biotope, Meze.

Bautista JR, Rubin SA, Moran TH, Schwartz GJ, Carbone KM (1995): Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res* 90(1-2): 45-53.

Bedford J, Farrar J, Ihekweazu C, Kang G, Koopmans M, Nkengasong J (2019): A new twenty-first century science for effective epidemic response. *Nature* 575(7781): 130-136.

Begeman L, Suu-Ire R, Banyard AC, Drosten C, Eggerbauer E, Freuling CM, Gibson L, Goharriz H, Horton DL, Jennings D, Marston DA, Ntiamoa-Baidu Y, Riese Sbarbaro S, Selden D, Wise EL, Kuiken T, Fooks AR, Müller T, Wood JLN, Cunningham AA (2020): Experimental Lagos bat virus infection in straw-colored fruit bats: A suitable model for bat rabies in a natural reservoir species. *PLoS Negl Trop Dis* 14(12): e0008898.

Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM (2010): Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog* 6(7): e1001030.

Berg M, Johansson M, Montell H, Berg AL (2001): Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect* 127(1): 173-178.

Bilzer T, Planz O, Lipkin WI, Stitz L (1995): Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol* 5(3): 223-230.

Bjornsdottir S, Agustsdottir E, Blomstrom AL, Ostrom IL, Berndtsson LT, Svansson V, Wensman JJ (2013): Serological markers of Bornavirus infection found in horses in Iceland. *Acta Vet Scand* 55(1): 77.

Bonnaud EM, Szelechowski M, Bétourné A, Foret C, Thouard A, Gonzalez-Dunia D, Malnou CE (2015): Borna disease virus phosphoprotein modulates epigenetic signaling in neurons to control viral replication. *J Virol* 89(11): 5996-6008.

Bourg M (2018): Virusökologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit in Bayern. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Dissertation.

Bourg M, Herzog S, Encarnacao JA, Nobach D, Lange-Herbst H, Eickmann M, Herden C (2013): Bicolored white-toothed shrews as reservoir for borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis* 19(12): 2064-2066.

Bourg M, Nobach D, Herzog S, Lange-Herbst H, Nessler A, Hamann HP, Becker S, Hoper D, Hoffmann B, Eickmann M, Herden C (2016): Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis. *Virology* 13(1): 151.

Bourteele S, Oesterle K, Pleschka S, Unterstab G, Ehrhardt C, Wolff T, Ludwig S, Planz O (2005): Constitutive activation of the transcription factor NF-kappaB results in impaired borna disease virus replication. *J Virol* 79(10): 6043-6051.

Braun M, Dieterlen F (2005): Die Säugetiere Baden-Württemberg. Band 1 Allgemeiner Teil, Fledermäuse. Ulmer, Stuttgart.

Briese T, Hatalski CG, Kliche S, Park YS, Lipkin WI (1995): Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Borna disease virus-specific proteins. *J Clin Microbiol* 33(2): 348-351.

Briese T, Schneemann A, Lewis AJ, Park YS, Kim S, Ludwig H, Lipkin WI (1994): Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4362-4366.

Brinkmann A, Kohl C, Radonić A, Dabrowski PW, Mühldorfer K, Nitsche A, Wibbelt G, Kurth A (2020): First detection of bat-borne Issyk-Kul virus in Europe. *Sci Rep* 10(1): 22384.

Brook CE, Boots M, Chandran K, Dobson AP, Drosten C, Graham AL, Grenfell BT, Müller MA, Ng M, Wang LF, van Leeuwen A (2020): Accelerated viral dynamics in bat cell lines, with implications for zoonotic emergence. *Elife* 9.

Brosset A (1990): The migrations of *Pipistrellus nathusii* in France - possible implication on the spreading of rabies. *Mammalia* 54: 207-212.

Cadar D, Allendorf V, Schulze V, Ulrich RG, Schlottau K, Ebinger A, Hoffmann B, Hoffmann D, Rubbenstroth D, Ismer G, Kibbey C, Marthaler A, Rissland J, Leyboldt F, Stangel M, Schmidt-Chanasit J, Conraths FJ, Beer M, Homeier-Bachmann T, Tappe D (2021): Introduction and spread of variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1) between exotic squirrels and spill-over infections to humans in Germany. *Emerg Microbes Infect* 10(1): 602-611.

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006): Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 19(3): 531-545.

Caplazi P, Waldvogel A, Stitz L, Braun U, Ehrensperger F (1994): Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol* 111(1): 65-72.

Carbone KM, Duchala CS, Griffin JW, Kincaid AL, Narayan O (1987): Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol* 61(11): 3431-3440.

Carbone KM, Moench TR, Lipkin WI (1991): 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* 50(3): 205-214.

Carval D, Ferriere R (2010): A unified model for the coevolution of resistance, tolerance, and virulence. *Evolution* 64(10): 2988-3009.

Cervós-Navarro J, Roggendorf W, Ludwig H, Stitz H (1981): [The encephalitic reaction in Borna disease virus infected rhesus monkeys]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 65: 208-212.

Chase G, Mayer D, Hildebrand A, Frank R, Hayashi Y, Tomonaga K, Schwemmler M (2007): Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol* 81(2): 743-749.

Chen J, Foroozesh M, Qin Z (2019): Transactivation of human endogenous retroviruses by tumor viruses and their functions in virus-associated malignancies. *Oncogenesis* 8(1): 6.

Choate JR, Baker RJ, Barrett GW, Birney EC, Dowler RC, Eisenberg JF, Johnson ML, Kunz TL, Linzey AV, Shaw JH, Taylor JM, Wunder B, Kirkland GL, Animal Care Use C (1998): Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *J Mammal* 79(4): 1416-1431.

Churchfield S (1990): The Natural History of Shrews. Christopher Helm Ltd, London.

Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH (2001): Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1411): 991-999.

Coras R, Korn K, Kuerten S, Huttner HB, Ensser A (2019): Severe bornavirus-encephalitis presenting as Guillain-Barré-syndrome. *Acta Neuropathol* 137(6): 1017-1019.

Cubitt B, de la Torre JC (1994): Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* 68(3): 1371-1381.

Cui J, Wang LF (2015): Genomic Mining Reveals Deep Evolutionary Relationships between Bornaviruses and Bats. *Viruses* 7(11): 5792-5800.

da Silva RC, Langoni H (2009): *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Res* 105(4): 893-898.

Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge JM, Vandenbogaert M, Maufrais C, Caro V, Bourhy H (2014): A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One* 9(1): e87194.

Danner K, Mayr A (1973): Serum Fluorescence Studies on Appearance of Borna Virus Antigen in Cell-Cultures from Brain Explants of Infected Rabbits. Zentralbl Veterinarmed B 20(7): 497-508.

Danner K, Mayr A (1979): In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. Arch Virol 61(4): 261-271.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000): Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. Science 287(5452): 443-449.

Dauphin G, Legay V, Pitel P-H, Zientara S (2002): Borna disease: current knowledge and virus detection in France. Veterinary Research 33(2): 127-138.

Davis MM (2008): A prescription for human immunology. Immunity 29(6): 835-838.

de la Torre JC (2002): Molecular biology of Borna disease virus and persistence. Front Biosci 7: d569-579.

Deschl U, Stitz L, Herzog S, Frese K, Rott R (1990): Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. Acta Neuropathol 81(1): 41-50.

DFG SSftFd (2019): Tierversuche in der Forschung: Das 3R-Prinzip und die Aussagekraft wissenschaftlicher Forschung.

https://www.dfg.de/dfg_profil/gesamtliste_publicationen/senatskommissionen/index.html
(06.03.2021).

Dietz C, Kiefer A (2004): Die Fledermäuse Europas: kennen, bestimmen, schützen. Franckh-Kosmos Verlag, Stuttgart.

Do R, Shonfield J, McAdam AG (2013): Reducing accidental shrew mortality associated with small-mammal livetrapping II: a field experiment with bait supplementation. J Mammal 94(4): 754-760.

Douady CJ, Chatelier PI, Madsen O, de Jong WW, Catzeflis F, Springer MS, Stanhope MJ (2002): Molecular phylogenetic evidence confirming the Eulipotyphla concept and in support of hedgehogs as the sister group to shrews. Mol Phylogenet Evol 25(1): 200-209.

Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Oppong S, Sarkodie YA, Pongombo C, Lukashev AN, Schmidt-Chanasit J, Stöcker A, Carneiro AJB, 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 (2012): Bats host major mammalian paramyxoviruses. Nature Communications 3: 796.

Duarte LC, Bouteiller C, Fontanillas IP, Petit E, Perrin N (2003): Inbreeding in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. Evolution 57(3): 638-645.

Dürwald R, Kolodziejek J, Herzog S, Nowotny N (2007): Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Reviews in Medical Virology* 17(3): 181-203.

Dürwald R, Kolodziejek J, Muluneh A, Herzog S, Nowotny N (2006): Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes Infect* 8(3): 917-929.

Dürwald R, Kolodziejek J, Weissenbock H, Nowotny N (2014): The bicolored white-toothed shrew *Crocodyura leucodon* (HERMANN 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS One* 9(4): e93659.

Dürwald R, Ludwig H (1997): Borna Disease Virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 44: 147-184.

Ebinger A, Dürwald R, Lehnau D, Haring V, Schlottau K, Nobach D, Ruf V, Liesche-Starnecker F, Fürstenau J, Hansmann F, Seuberlich T, Schulze V, Conraths FJ, Hoffmann B, Ulrich RG, Beer M, Höper D, Rubbenstroth D (2021): Identification of potential risk areas for zoonotic Borna disease virus 1 (BoDV-1) infection by large-scale phylogeographic analysis. 30th Annual Meeting of the Society for Virology, Hannover.

Eickmann M, Kiermayer S, Kraus I, Gössl M, Richt JA, Garten W (2005): Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Lett* 579(21): 4751-4756.

Encarnacao JA, Herzog S, Eickmann M, Becker NI, Hermes N, Herden C (2013): Landscape features and reservoir occurrence affecting the risk for equine infection with Borna disease virus. *J Wildl Dis* 49(4): 860-868.

Epstein JH, Anthony SJ, Islam A, Kilpatrick AM, Ali Khan S, Balkey MD, Ross N, Smith I, Zambrana-Torrel C, Tao Y, Islam A, Quan PL, Olival KJ, Khan MSU, Gurley ES, Hossein MJ, Field HE, Fielder MD, Briese T, Rahman M, Broder CC, Cramer G, Wang LF, Luby SP, Lipkin WI, Daszak P (2020): Nipah virus dynamics in bats and implications for spillover to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(46): 29190-29201.

Finke T, Liesche-Starnecker F, Probst M, Bette S, Ruf V, Wendl C, Dorn F, Angstwurm K, Schlegel J, Zimmer C, Wiestler B, Wiesinger I (2020): Bornavirus Encephalitis Shows a Characteristic Magnetic Resonance Phenotype in Humans. *Ann Neurol* 88(4): 723-735.

Finke MD (2002): Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol* 21(3): 269-285.

Finke S, Conzelmann KK (2005): Replication strategies of rabies virus. *Virus Res* 111(2): 120-131.

Frank F (1953): Zur Biologie, insbesondere Paarungsbiologie der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*). Bonn Zool Bull 4(3,4): 187-194.

Frank F (1984): Shifting of ranges between *Crocidura-russula* and *Crocidura-leucodon* in northwestern germany with notes on the interspecific behavior of these shrews. Z Säugetierkd 49(2): 65-70.

Fuchs J, Hölzer M, Schilling M, Patzina C, Schoen A, Hoenen T, Zimmer G, Marz M, Weber F, Müller MA, Kochs G (2017): Evolution and Antiviral Specificities of Interferon-Induced Mx Proteins of Bats against Ebola, Influenza, and Other RNA Viruses. J Virol 91(15).

Fujino K, Horie M, Honda T, Merriman DK, Tomonaga K (2014): Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. Proc Natl Acad Sci U S A 111(36): 13175-13180.

Furrer E, Bilzer T, Stitz L, Planz O (2001): Neutralizing antibodies in persistent borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. J Virol 75(2): 943-951.

Genzel L, Adan R, Berns A, van den Beucken J, Blokland A, Boddeke E, Bogers WM, Bontrop R, Bulthuis R, Bousema T, Clevers H, Coenen T, van Dam AM, Deen PMT, van Dijk KW, Eggen BJL, Elgersma Y, Erdogan I, Englitz B, Fentener van Vlissingen JM, la Fleur S, Fouchier R, Fitzsimons CP, Frieling W, Haagmans B, Heesters BA, Henckens M, Herfst S, Hol E, van den Hove D, de Jonge MI, Jonkers J, Joosten LAB, Kalsbeek A, Kamermans M, Kampinga HH, Kas MJ, Keijer JA, Kersten S, Kiliaan AJ, Kooij TWA, Kooijman S, Koopman WJH, Korosi A, Krugers HJ, Kuiken T, Kushner SA, Langermans JAM, Lesscher HMB, Lucassen PJ, Lutgens E, Netea MG, Noldus L, van der Meer JWM, Meye FJ, Mul JD, van Oers K, Olivier JDA, Pasterkamp RJ, Philippens I, Prickaerts J, Pollux BJA, Rensen PCN, van Rheenen J, van Rij RP, Ritsma L, Rockx BHG, Roozendaal B, van Schothorst EM, Stittelaar K, Stockhofe N, Swaab DF, de Swart RL, Vanderschuren L, de Vries TJ, de Vrij F, van Wezel R, Wierenga CJ, Wiesmann M, Willuhn I, de Zeeuw CI, Homberg JR (2020): How the COVID-19 pandemic highlights the necessity of animal research. Curr Biol 30(18): R1014-R1018.

Gilbert C, Meik JM, Dashevsky D, Card DC, Castoe TA, Schaack S (2014): Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. Proc Biol Sci 281(1791): 20141122.

Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, de la Torre JC (1998): Mechanism of Borna disease virus entry into cells. J Virol 72(1): 783-788.

Gonzalez-Dunia D, Volmer R, Mayer D, Schwemmler M (2005): Borna disease virus interference with neuronal plasticity. Virus Res 111(2): 224-234.

González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R (2014): Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. J Neuroimmunol 274(1-2): 1-13.

Gosztonyi G, Dietzschold B, Kao M, Rupprecht CE, Ludwig H, Koprowski H (1993): Rabies and borna disease. A comparative pathogenetic study of two neurovirulent agents. Lab Invest 68(3): 285-295.

Grabner A, Herzog S, Lange-Herbst H, Frese K (2002): Die Intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden. *Pferdeheilkunde* 18(6): 579-586.

Griffin DE (2010): Emergence and re-emergence of viral diseases of the central nervous system. *Prog Neurobiol* 91(2): 95-101.

Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schümann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Mühlberger E, Mirazimi A, Weber F (2008): Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One* 3(4): e2032.

Hallensleben W, Schwemmle M, Hausmann J, Stitz L, Volk B, Pagenstecher A, Staeheli P (1998): Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol* 72(5): 4379-4386.

Hallmaier-Wacker LK, Munster VJ, Knauf S (2017): Disease reservoirs: from conceptual frameworks to applicable criteria. *Emerg Microbes Infect* 6(9): e79.

Han HJ, Wen HL, Zhou CM, Chen FF, Luo LM, Liu JW, Yu XJ (2015): Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res* 205: 1-6.

Hatalski CG, Hickey WF, Lipkin WI (1998): Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol* 90(2): 137-142.

Haupt H, Ludwig G, Gruttke H, Binot-Hafke M, Otto C, Pauly A (2009): Rote Liste gefährdeter Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands Band 1: Wirbeltiere. Bundesamt für Naturschutz, Bonn - Bad Godesberg.

Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK (2002): Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 8(12): 1468-1473.

Hellwing S (1973): Husbandry and breeding of white-toothed shrews (Crocodyrininae) in the Research Zoo of the Tel-Aviv University. *Int Zoo Yearb* 13(1): 127-134.

Herden C, Briese T, Lipkin WI, Richt J (2013): Chapter 39 Bornaviridae. In: Knipe DM, Howley PM (Hrsg.), *Fields of Virology*. Philadelphia, 1124-1150.

Herden C, Herzog S, Richt JA, Nesseler A, Christ M, Failing K, Frese K (2000): Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol* 10(1): 39-48.

Herden C, Schluesener HJ, Richt JA (2005): Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31(5): 512-521.

Herzog S, Enderlein D, Heffels-Redmann U, Piepenbring A, Neumann D, Kaleta EF, Muller H, Lierz M, Herden C (2010): Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian bornavirus infection in psittacine birds. *J Clin Microbiol* 48(6): 2282-2284.

Herzog S, Frese K, Richt J, Rott R (1994): Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. *Wien Tierärztl Mschr* 81: 374-379.

Herzog S, Frese K, Rott R (1991): Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J Gen Virol* 72 (Pt 3): 535-540.

Herzog S, Kompter C, Frese K, Rott R (1984): Replication of Borna disease virus in rats: age dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol* 173(4): 171-177.

Herzog S, Rott R (1980): Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol* 168(3): 153-158.

Hilbe M, Herrsche R, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinszky K, Ehrensperger F (2006): Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg Infect Dis* 12(4): 675-677.

Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeier H, Depner K (2005): Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 130(1-2): 36-44.

Hoffmann B, Tappe D, Hoper D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, Niederstrasser O, Muller T, Jenckel M, van der Grinten E, Lutter C, Abendroth B, Teifke JP, Cadar D, Schmidt-Chanasit J, Ulrich RG, Beer M (2015): A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N Engl J Med* 373(2): 154-162.

Hölzer M, Schoen A, Wulle J, Müller MA, Drosten C, Marz M, Weber F (2019): Virus- and Interferon Alpha-Induced Transcriptomes of Cells from the Microbat *Myotis daubentonii*. *iScience* 19: 647-661.

Honda T, Tomonaga K (2013): Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses* 5(8): 1978-1990.

Honkavuori KS, Shivaprasad HL, Williams BL, Quan PL, Hornig M, Street C, Palacios G, Hutchison SK, Franca M, Egholm M, Briese T, Lipkin WI (2008): Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 14(12): 1883-1886.

Horie M (2017): The biological significance of bornavirus-derived genes in mammals. *Curr Opin Virol* 25: 1-6.

Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM, Tomonaga K (2010): Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463(7277): 84-87.

Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Fujino K, Akasaka T, Kohl C, Wibbelt G, Muhldorfer K, Kurth A, Muller MA, Corman VM, Gillich N, Suzuki Y, Schwemmle M, Tomonaga K (2016): An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. *Sci Rep* 6: 25873.

Horie M, Kobayashi Y, Suzuki Y, Tomonaga K (2013): Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1626): 20120499.

Horie M, Tomonaga K (2019): Paleovirology of bornaviruses: What can be learned from molecular fossils of bornaviruses. *Virus Res* 262: 2-9.

Hornig M, Briese T, Licinio J, Khabbaz RF, Altshuler LL, Potkin SG, Schwemmle M, Siemietzki U, Mintz J, Honkavuori K, Kraemer HC, Egan MF, Whybrow PC, Bunney WE, Lipkin WI (2012): Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 17(5): 486-493.

Hyndman TH, Shilton CM, Stenglein MD, Wellehan JFX, Jr. (2018): Divergent bornaviruses from Australian carpet pythons with neurological disease date the origin of extant Bornaviridae prior to the end-Cretaceous extinction. *PLoS Pathog* 14(2): e1006881.

International Union for Conservation of Nature and Nature Resources (IUCN) (2013): The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/> (06.03.2021).

Irving AT, Ahn M, Goh G, Anderson DE, Wang LF (2021): Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. *Nature* 589(7842): 363-370.

Jacobsen B, Algermissen D, Schaudien D, Venner M, Herzog S, Wentz E, Hewicker-Trautwein M, Baumgärtner W, Herden C (2010): Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacas*). *J Comp Pathol* 143(2-3): 203-208.

Jenrich J, Löhner PW, Müller F (2010): Kleinsäuger Körper- und Schädelmerkmale Ökologie. Michael Imhof Verlag, Petersberg.

Jern P, Coffin JM (2008): Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet* 42: 709-732.

Jha MK, Lee WH, Suk K (2016): Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem Pharmacol* 103: 1-16.

Joest E, Degen K (1909): Ueber eugentuemliche Kerneinschluesse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rueckenmarksentzündung der Pferde. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten, parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere* 6: 348-356.

Johnson CK, Hitchens PL, Pandit PS, Rushmore J, Evans TS, Young CCW, Doyle MM (2020): Global shifts in mammalian population trends reveal key predictors of virus spillover risk. *Proc Biol Sci* 287(1924): 20192736.

Johnson RI, Smith IL (2017): Virus discovery in bats. *Microbiology Australia* 38(1): 25-27.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P (2008): Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451(7181): 990-993.

Kao M, Ludwig H, Gosztanyi G (1984): Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J Gen Virol* 65(10): 1845-1849.

Katz JB, Alstad D, Jenny AL, Carbone KM, Rubin SA, Waltrip RW, 2nd (1998): Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest* 10(4): 338-343.

Katzourakis A, Gifford RJ (2010): Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet* 6(11): e1001191.

Kehr K (2016): Ausbreitungs- und Persistenzstrategien des Virus der Bornaschen Krankheit in primären corticalen Astrozytenkulturen von Lewis Ratten. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Dissertation.

Kinnunen PM, Billich C, Ek-Kommonen C, Henttonen H, R.K. Kallio E, Niemimaa J, Palva A, Staeheli P, Vaheri A, Vapalahti O (2007): Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *Journal of Clinical Virology* 38(1): 64-69.

Kinnunen PM, Inkeroinen H, Ilander M, Kallio ER, Heikkilä HP, Koskela E, Mappes T, Palva A, Vaheri A, Kipar A, Vapalahti O (2011): Intracerebral Borna Disease Virus Infection of Bank Voles Leading to Peripheral Spread and Reverse Transcription of Viral RNA. *PLoS ONE* 6(8): e23622.

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 (2008): Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology* 381(1): 88.

Kobayashi T, Kamitani W, Zhang G, Watanabe M, Tomonaga K, Ikuta K (2001): Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J Virol* 75(7): 3404-3412.

Kobayashi T, Shoya Y, Koda T, Takashima I, Lai PK, Ikuta K, Kakinuma M, Kishi M (1998): Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 243(1): 188-197.

Kohl C, Brinkmann A, Radonić A, Dabrowski PW, Mühldorfer K, Nitsche A, Wibbelt G, Kurth A (2021): The virome of German bats: comparing virus discovery approaches. *Sci Rep* 11(1): 7430.

Kohl C, Kurth A (2014): European bats as carriers of viruses with zoonotic potential. *Viruses* 6(8): 3110-3128.

Kohno T, Goto T, Takasaki T, Morita C, Nakaya T, Ikuta K, Kurane I, Sano K, Nakai M (1999): Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 73(1): 760-766.

Kojima S, Sato R, Yanai M, Komatsu Y, Horie M, Igarashi M, Tomonaga K (2019): Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms. *J Virol* 93(5).

Kollars TM, Baumler W (1994): An Artificial Diet for Shrews (Soricidae). *Anzeiger Fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 67(8): 179-179.

Kolodziejek J, Dürrwald R, Herzog S, Ehrensperger F, Lussy H, Nowotny N (2005): Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol* 86(2): 385-398.

Komorizono R, Sassa Y, Horie M, Makino A, Tomonaga K (2020): Evolutionary Selection of the Nuclear Localization Signal in the Viral Nucleoprotein Leads to Host Adaptation of the Genus Orthobornavirus. *Viruses* 12(11).

Korn K, Coras R, Bobinger T, Herzog SM, Lucking H, Stohr R, Huttner HB, Hartmann A, Ensser A (2018): Fatal Encephalitis Associated with Borna Disease Virus 1. *N Engl J Med* 379(14): 1375-1377.

Kraft R (2008): Feldspitzmaus. In: Kraft R (Hrsg.), *Mäuse und Spitzmäuse in Bayern: Verbreitung, Lebensraum, Bestandsituation*. 1. Ausgabe, Ulmer Verlag, Stuttgart, 111 - 112.

Kramer K, Schaudien D, Eisel UL, Herzog S, Richt JA, Baumgartner W, Herden C (2012): TNF-overexpression in Borna disease virus-infected mouse brains triggers inflammatory reaction and epileptic seizures. *PLoS One* 7(7): e41476.

Kraus I, Bogner E, Lilie H, Eickmann M, Garten W (2005): Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 579(12): 2686-2692.

Kraus I, Eickmann M, Kiermayer S, Scheffczik H, Fluss M, Richt JA, Garten W (2001): Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol* 75(24): 12098-12104.

Kreuder Johnson C, Hitchens PL, Smiley Evans T, Goldstein T, Thomas K, Clements A, Joly DO, Wolfe ND, Daszak P, Karesh WB, Mazet JK (2015): Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Sci Rep* 5: 14830.

Kuhn JH, Adkins S, Alioto D, Alkhovsky SV, Amarasinghe GK, Anthony SJ, Avšič-Županc T, Ayllón MA, Bahl J, Balkema-Buschmann A, Ballinger MJ, Bartonička T, Basler C, Bavari S, Beer M, Bente DA, Bergeron É, Bird BH, Blair C, Blasdel KR, Bradfute SB, Breyta R, Briese T, Brown PA, Buchholz UJ, Buchmeier MJ, Bukreyev A, Burt F, Buzkan N, Calisher CH, Cao M, Casas I, Chamberlain J,

Chandran K, Charrel RN, Chen B, Chiumenti M, Choi IR, Clegg JCS, Crozier I, da Graça JV, Dal Bó E, Dávila AMR, de la Torre JC, de Lamballerie X, de Swart RL, Di Bello PL, Di Paola N, Di Serio F, Dietzgen RG, Digiario M, Dolja VV, Dolnik O, Drebot MA, Drexler JF, Dürrwald R, Dufkova L, Dundon WG, Duprex WP, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Elbeaino T, Ergünay K, Fernandes J, Fooks AR, Formenty PBH, Forth LF, Fouchier RAM, Freitas-Astúa J, Gago-Zachert S, Gao GF, García ML, García-Sastre A, Garrison AR, Gbakima A, Goldstein T, Gonzalez JJ, Griffiths A, Groschup MH, Günther S, Guterres A, Hall RA, Hammond J, Hassan M, Hepojoki J, Hepojoki S, Hetzel U, Hewson R, Hoffmann B, Hongo S, Höper D, Horie M, Hughes HR, Hyndman TH, Jambai A, Jardim R, Jiāng D, Jin Q, Jonson GB, Junglen S, Karadağ S, Keller KE, Klempa B, Klingström J, Kobinger G, Kondō H, Koonin EV, Krupovic M, Kurath G, Kuzmin IV, Laenen L, Lamb RA, Lambert AJ, Langevin SL, Lee B, Lemos ERS, Leroy EM, Li D, Li J, Liang M, Liú W, Liú Y, Lukashevich IS, Maes P, Marciel de Souza W, Marklewitz M, Marshall SH, Martelli GP, Martin RR, Marzano SL, Massart S, McCauley JW, Mielke-Ehret N, Minafra A, Minutolo M, Mirazimi A, Mühlbach HP, Mühlberger E, Naidu R, Natsuaki T, Navarro B, Navarro JA, Netesov SV, Neumann G, Nowotny N, Nunes MRT, Nylund A, Økland AL, Oliveira RC, Palacios G, Pallas V, Pályi B, Papa A, Parrish CR, Pauvolid-Corrêa A, Pawęska JT, Payne S, Pérez DR, Pfaff F, Radoshitzky SR, Rahman AU, Ramos-González PL, Resende RO, Reyes CA, Rima BK, Romanowski V, Robles Luna G, Rota P, Rubbenstroth D, Runstadler JA, Ruzek D, Sabanadzovic S, Salát J, Sall AA, Salvato MS, Sarpkaya K, Sasaya T, Schwemmler M, Shabbir MZ, Shi X, Shi Z, Shirako Y, Simmonds P, Širmarová J, Sironi M, Smither S, Smura T, Song JW, Spann KM, Spengler JR, Stenglein MD, Stone DM, Straková P, Takada A, Tesh RB, Thornburg NJ, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Turina M, Tzanetakis I, Ulrich RG, Vaira AM, van den Hoogen B, Varsani A, Vasilakis N, Verbeek M, Wahl V, Walker PJ, Wang H, Wang J, Wang X, Wang LF, Wèi T, Wells H, Whitfield AE, Williams JV, Wolf YI, Wú Z, Yang X, Yáng X, Yu X, Yutin N, Zerbini FM, Zhang T, Zhang YZ, Zhou G, Zhou X (2020): 2020 taxonomic update for phylum *Negarnaviricota* (*Riboviria*: *Orthornavirae*), including the large orders *Bunyavirales* and *Mononegavirales*. Arch Virol.

Kuhn JH, Durrwald R, Bao Y, Briese T, Carbone K, Clawson AN, deRisi JL, Garten W, Jahrling PB, Kolodziejek J, Rubbenstroth D, Schwemmler M, Stenglein M, Tomonaga K, Weissenböck H, Nowotny N (2015): Taxonomic reorganization of the family *Bornaviridae*. Arch Virol 160(2): 621-632.

Kupke A, Becker S, Wewetzer K, Ahlemeyer B, Eickmann M, Herden C (2019): Intranasal Borna Disease Virus (BoDV-1) Infection: Insights into Initial Steps and Potential Contagiosity. Int J Mol Sci 20(6).

Kurth A, Kohl C, Brinkmann A, Ebinger A, Harper JA, Wang LF, Muhldorfer K, Wibbelt G (2012): Novel paramyxoviruses in free-ranging European bats. PLoS One 7(6): e38688.

Latif AA, Mukaratirwa S (2020): Zoonotic origins and animal hosts of coronaviruses causing human disease pandemics: A review. Onderstepoort J Vet Res 87(1): e1-e9.

Lempp C, Jungwirth N, Grilo ML, Reckendorf A, Ulrich A, van Neer A, Bodewes R, Pfankuche VM, Bauer C, Osterhaus AD, Baumgärtner W, Siebert U (2017): 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 12(4): e0175469.

Lennartz F, Bayer K, Czerwonka N, Lu Y, Kehr K, Hirz M, Steinmetzer T, Garten W, Herden C (2016): Surface glycoprotein of Borna disease virus mediates virus spread from cell to cell. Cell Microbiol 18(3): 340-354.

Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Délicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R (2005): Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438(7068): 575-576.

Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD (2006): Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog* 2(6): e60.

Liesche F, Ruf V, Zoubaa S, Kaletka G, Rosati M, Rubbenstroth D, Herden C, Goehring L, Wunderlich S, Wachter MF, Rieder G, Lichtmannegger I, Permanetter W, Heckmann JG, Angstswurm K, Neumann B, Markl B, Haschka S, Niller HH, Schmidt B, Jantsch J, Brochhausen C, Schlottau K, Ebinger A, Hemmer B, Riemenschneider MJ, Herms J, Beer M, Matiasek K, Schlegel J (2019): The neuropathology of fatal encephalomyelitis in human Borna disease virus infection. *Acta Neuropathol* 138(4): 653-665.

Lipkin WI, Briese T, Hornig M (2011): Borna disease virus - fact and fantasy. *Virus Res* 162(1-2): 162-172.

Little J, Gurnell J (1989): Shrew Captures and Rodent Field Studies. *J Zool* 218: 329-331.

Liu X, Zhao L, Yang Y, Bode L, Huang H, Liu C, Huang R, Zhang L, Wang X, Zhang L, Liu S, Zhou J, Li X, He T, Cheng Z, Xie P (2014): Human borna disease virus infection impacts host proteome and histone lysine acetylation in human oligodendroglia cells. *Virology* 464-465: 196-205.

Luis AD, Hayman DT, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, Mills JN, Timonin ME, Willis CK, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JL, Webb CT (2013): A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci* 280(1756): 20122753.

Lundgren AL, Zimmermann W, Bode L, Czech G, Gosztonyi G, Lindberg R, Ludwig H (1995): Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 9): 2215-2222.

Machalaba CM, Karesh WB (2017): Emerging infectious disease risk: shared drivers with environmental change. *Rev Sci Tech* 36(2): 435-444.

Malbon AJ, Dürrwald R, Kolodziejek J, Nowotny N, Kobera R, Pöhle D, Muluneh A, Dervas E, Cebra C, Steffen F, Paternoster G, Gerspach C, Hilbe M (2021): New World camelids are sentinels for the presence of Borna disease virus. *Transbound Emerg Dis*.

Mandl JN, Ahmed R, Barreiro LB, Daszak P, Epstein JH, Virgin HW, Feinberg MB (2015): Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell* 160(1-2): 20-35.

Masopust D, Sivula CP, Jameson SC (2017): Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *J Immunol* 199(2): 383-388.

Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H, Honda T, Daito T, Horie M, Ikuta K, Fujino K, Nakamura S, Schneider U, Chase G, Yoshimori T, Schwemmle M, Tomonaga K (2012): Bornavirus closely

associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. Cell Host Microbe 11(5): 492-503.

Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, Scholz HC, Thomas A, Nockler K (2014): *Leptospira spp.* in rodents and shrews in Germany. Int J Environ Res Public Health 11(8): 7562-7574.

Mayer D, Fischer H, Schneider U, Heimrich B, Schwemmler M (2005): Borna Disease Virus Replication in Organotypic Hippocampal Slice Cultures from Rats Results in Selective Damage of Dentate Granule Cells. J Virol 79(18): 11716-11723.

Meerburg BG, De Craeye S, Dierick K, Kijlstra A (2012): *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. Vet Parasitol 184(2-4): 317-320.

Meschede A, Rudolph B-U (2004): Fledermäuse in Bayern. Ulmer, Stuttgart.

Metzler A, Ehrensperger F, Wyler R (1978): [Natural borna virus infection in rabbits]. Zentralbl Veterinarmed B 25(2): 161-164.

Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC, Jr., McCoy JM (2000): Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature 403(6771): 785-789.

Morales JA (1988): Immunhistologische Verlaufsuntersuchungen über die Ausbreitung des Virus der Bornaschen Krankheit bei der Lewis-Ratte nach perinataler intrazerebraler Infektion. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Dissertation.

Morales JA, Herzog S, Kompter C, Frese K, Rott R (1988): Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. Med Microbiol Immunol 177(2): 51-68.

Muhldorfer K, Speck S, Wibbelt G (2011): Diseases in free-ranging bats from Germany. BMC Vet Res 7: 61.

Mukai Y, Horie M, Tomonaga K (2018): Systematic estimation of insertion dates of endogenous bornavirus-like elements in vesper bats. J Vet Med Sci.

Myers KN, Barone G, Ganesh A, Staples CJ, Howard AE, Beveridge RD, Maslen S, Skehel JM, Collis SJ (2016): The bornavirus-derived human protein EBLN1 promotes efficient cell cycle transit, microtubule organisation and genome stability. Sci Rep 6: 35548.

Nabi G, Wang Y, Lü L, Jiang C, Ahmad S, Wu Y, Li D (2021): Bats and birds as viral reservoirs: A physiological and ecological perspective. Sci Total Environ 754: 142372.

Nagel A, Nagel R (2005): Feldspitzmaus. In: Braun M, Dieterlen F (Hrsg.), Die Säugetiere Baden Württemberg. 1. Ausgabe, Ulmer, Stuttgart, 90-96.

Nakamura Y, Nakaya T, Hagiwara K, Momiyama N, Kagawa Y, Taniyama H, Ishihara C, Sata T, Kurata T, Ikuta K (1999): High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 17(5): 480-489.

Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R (1983): Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science* 220(4604): 1401-1403.

Negredo A, Palacios G, Vázquez-Morón S, González F, Dopazo H, Molero F, Juste J, Quetglas J, Savji N, de la Cruz Martínez M, Herrera JE, Pizarro M, Hutchison SK, Echevarría JE, Lipkin WI, Tenorio A (2011): Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. *PLoS Pathog* 7(10): e1002304.

Niethammer G (1950): Zur Jungenpflege und Orientierung der Hausspitzmaus (*Crocidura russula* Herm.). *Bonn Zool Bull* 1(2-4): 117-125.

Niller HH, Angstwurm K, Rubbenstroth D, Schlottau K, Ebinger A, Giese S, Wunderlich S, Banas B, Forth LF, Hoffmann D, Höper D, Schwemmle M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Nobach D, Herden C, Brochhausen C, Velez-Char N, Mamilos A, Utpatel K, Evert M, Zoubaa S, Riemenschneider MJ, Ruf V, Herms J, Rieder G, Errath M, Matiasek K, Schlegel J, Liesche-Starnecker F, Neumann B, Fuchs K, Linker RA, Salzberger B, Freilinger T, Gartner L, Wenzel JJ, Reischl U, Jilg W, Gessner A, Jantsch J, Beer M, Schmidt B (2020): Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999-2019: an epidemiological investigation. *Lancet Infect Dis* 20(4): 467-477.

Nobach D, Bourg M, Herzog S, Lange-Herbst H, Encarnacao JA, Eickmann M, Herden C (2015): Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews. *PLoS One* 10(8): e0137018.

Nobach D, Herden C (2020): No evidence for European bats serving as reservoir for Borna disease virus 1 or other known mammalian orthobornaviruses. *Virology* 537(1): 11.

Nobach D, Müller J, Tappe D, Herden C (2020): Update on immunopathology of bornavirus infections in humans and animals. *Adv Virus Res* 107: 159-222.

Nomura T (1996): Effective size of selected populations with overlapping generations. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 113(1-6): 1-16.

Nowotny N, Kolodziejek J, Jehle CO, Suchy A, Staeheli P, Schwemmle M (2000): Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol* 74(12): 5655-5658.

Ochocinska D, Taylor JRE (2005): Living at the physiological limits: Field and maximum metabolic rates of the common shrew (*Sorex araneus*). *Physiological and Biochemical Zoology* 78(5): 808-818.

Ohno K, Niwa Y, Kato S, Koyasu K, Oda S, Kondo K (1992): The domestication of *Crocidura dsinezumi* as a new laboratory animal. *Jikken Dobutsu* 41(4): 449-454.

Oldstone MB (2006): Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* 344(1): 111-118.

Otta J, Jentsch KD (1960): Spontane Infektion mit dem Virus der Bornaschen Krankheit beim Kaninchen. *Mh Vet Med* 15.

Ovanesov MV, Vogel MW, Moran TH, Pletnikov MV (2007): Neonatal Borna disease virus infection in rats is associated with increased extracellular levels of glutamate and neurodegeneration in the striatum. *J Neurovirol* 13(3): 185-194.

Page RA, von Merten S, Siemers BM (2012): Associative memory or algorithmic search: a comparative study on learning strategies of bats and shrews. *Anim Cogn* 15(4): 495-504.

Parrish NF, Fujino K, Shiromoto Y, Iwasaki YW, Ha H, Xing J, Makino A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Siomi H, Honda T, Tomonaga K (2015): piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* 21(10): 1691-1703.

Parrish NF, Tomonaga K (2016): Endogenized viral sequences in mammals. *Curr Opin Microbiol* 31: 176-183.

Pedersen AB, Babayan SA (2011): Wild immunology. *Molecular ecology* 20(5): 872-880.

Perez M, Sanchez A, Cubitt B, Rosario D, de la Torre JC (2003): A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* 84(Pt 11): 3099-3104.

Perrin S (2014): Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature* 507(7493): 423-425.

Petzold J, van den Brand JMA, Nobach D, Hoffmann B, Hoffmann D, Fast C, Reusken C, van Run P, Schlottau K, Beer M, Herden C (2019): Distribution of zoonotic variegated squirrel bornavirus 1 in naturally infected variegated and Prevost's squirrels. *Sci Rep* 9(1): 11402.

Piepenbring AK, Enderlein D, Herzog S, Al-Ibadi B, Heffels-Redmann U, Heckmann J, Lange-Herbst H, Herden C, Lierz M (2016): Parrot Bornavirus (PaBV)-2 isolate causes different disease patterns in cockatiels than PaBV-4. *Avian Pathol* 45(2): 156-168.

Piepenbring AK, Enderlein D, Herzog S, Kaleta EF, Heffels-Redmann U, Ressmeyer S, Herden C, Lierz M (2012): Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerg Infect Dis* 18(2): 234-241.

Planz O, Pleschka S, Wolff T (2009): Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways. *Cell Microbiol* 11(6): 872-879.

- Pletnikov MV, Rubin SA, Vasudevan K, Moran TH, Carbone KM (1999):** Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 100(1-2): 43-50.
- Plowright RK, Parrish CR, McCallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham AL, Lloyd-Smith JO (2017):** Pathways to zoonotic spillover. *Nat Rev Microbiol* 15(8): 502-510.
- Poenisch M, Burger N, Staeheli P, Bauer G, Schneider U (2009):** Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *J Virol* 83(9): 4297-4307.
- Porombka D (2006):** Untersuchungen zur Transkription, Replikation und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit im Gehirn. Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- Porombka D, Baumgärtner W, Eickmann M, Herden C (2008):** Implications for a regulated replication of Borna disease virus in brains of experimentally infected Lewis rats. *Virus Genes* 36(2): 415-420.
- Priestnall SL, Schoniger S, Ivens PAS, Eickmann M, Brachthäuser L, Kehr K, Tupper C, Piercy RJ, Menzies-Gow NJ, Herden C (2011):** Borna disease virus infection of a horse in Great Britain. *Veterinary Record* 168(14): 380-380.
- Puorger ME, Hilbe M, Müller JP, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinszky K, Ehrensperger F (2010):** Distribution of Borna Disease Virus Antigen and RNA in Tissues of Naturally Infected Bicolored White-Toothed Shrews, *Crocidura leucodon*, Supporting Their Role as Reservoir Host Species. *Vet Pathol* 47(2): 236-244.
- Pyper JM, Clements JE (1994):** Partial purification and characterization of Borna disease virions released from infected neuroblastoma cells. *Virology* 201(2): 380-382.
- Radosa L, Schlegel M, Gebauer P, Ansorge H, Heroldova M, Janova E, Stanko M, Mosansky L, Fricova J, Pejcoch M, Suchovej J, Purchart L, Groschup MH, Kruger DH, Ulrich RG, Klempa B (2013):** Detection of shrew-borne hantavirus in Eurasian pygmy shrew (*Sorex minutus*) in Central Europe. *Infect Genet Evol* 19: 403-410.
- Randall RE, Griffin DE (2017):** Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. *Curr Opin Virol* 23: 35-42.
- Rasche A, Lehmann F, König A, Goldmann N, Corman VM, Moreira-Soto A, Geipel A, van Riel D, Vakulenko YA, Sander AL, Niekamp H, Kepper R, Schlegel M, Akoua-Koffi C, Souza B, Sahr F, Olayemi A, Schulze V, Petraityte-Burneikiene R, Kazaks A, Lowjaga K, Geyer J, Kuiken T, Drosten C, Lukashov AN, Fichet-Calvet E, Ulrich RG, Glebe D, Drexler JF (2019):** Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(34): 17007-17012.

Recht J, Schuenemann VJ, Sánchez-Villagra MR (2020): Host Diversity and Origin of Zoonoses: The Ancient and the New. *Animals (Basel)* 10(9).

Reichelt U (2009): Epizootiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit bei Pferden in Bayern und Darstellung des monoklonalen Antikörpers 38/15H7. Berlin, Freie Universität Berlin, Dissertation.

Reuter A, Ackermann A, Kothlow S, Rinder M, Kaspers B, Staeheli P (2010): Avian bornaviruses escape recognition by the innate immune system. *Viruses* 2(4): 927-938.

Richt J, Grabner A, Herzog S, Garten W, Herden C, Sellon DC (2007): Borna disease. In: Long MT (Hrsg.), *Equine Infectious Diseases*. Saint Louis, 207-213.

Richt JA, Fürbringer T, Koch A, Pfeuffer I, Herden C, Bause-Niedrig I, Garten W (1998): Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* 72(5): 4528-4533.

Richt JA, Herzog S, Habertzettl K, Rott R (1993): Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol* 182(6): 293-304.

Richt JA, Schmeel A, Frese K, Carbone KM, Narayan O, Rott R (1994): Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med* 179(5): 1467-1473.

Rimbach G, Möhring J, Erbersdobler HF (2010): Fleisch und Wurstwaren. In: Rimbach G, Möhring J, Erbersdobler HF (Hrsg.), *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Springer Verlag, Heidelberg, 65-95.

Rota PA, Moss WJ, Takeda M, de Swart RL, Thompson KM, Goodson JL (2016): Measles. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16049.

Rott R, Becht H (1995): Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 17-30.

Rott R, Herzog S, Fleischer B, Winokur A, Amsterdam J, Dyson W, Koprowski H (1985): Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228(4700): 755-756.

Rubbenstroth D, Schlottau K, Schwemmle M, Rissland J, Beer M (2019): Human bornavirus research: Back on track! *PLoS Pathog* 15(8): e1007873.

Rubin SA, Sylves P, Vogel M, Pletnikov M, Moran TH, Schwartz GJ, Carbone KM (1999): Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res Bull* 48(1): 23-30.

Rubin SA, Waltrip RW, 2nd, Bautista JR, Carbone KM (1993): Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J Virol* 67(1): 548-552.

Sauder C, Staeheli P (2003): Rat Model of Borna Disease Virus Transmission: Epidemiological Implications. *J Virol* 77(23): 12886-12890.

Schindler AR (2004): Real time RT-PCR for tracing and quantification of Borna Disease Virus RNA in diseased hosts compared to experimentally inoculated ticks. Zürich, University of Zuerich, Vetsuisse Faculty, Dissertation.

Schindler AR, Vöggtlin A, Hilbe M, Puorger M, Zlinszky K, Ackermann M, Ehrensperger F (2007): Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Molecular and Cellular Probes* 21(1): 47-55.

Schlegel M, Radosa L, Rosenfeld UM, Schmidt S, Triebenbacher C, Lohr PW, Fuchs D, Heroldova M, Janova E, Stanko M, Mosansky L, Fricova J, Pejcoch M, Suchomel J, Purchart L, Groschup MH, Kruger DH, Klempa B, Ulrich RG (2012): Broad geographical distribution and high genetic diversity of shrew-borne Seewis hantavirus in Central Europe. *Virus Genes* 45(1): 48-55.

Schlottau K, Feldmann F, Hanley P, Lovaglio J, Meade-White K, Callison J, Williamson B, Tang TL, Rosenke R, Long D, Herden C, Saturday G, Scott DR, Hoffmann D, Beer M, Feldmann H (2021): Development of a non-human primate model for bornavirus infection. 30th Annual Meeting of the Society for Virology, Hannover.

Schlottau K, Forth L, Angstwurm K, Hoper D, Zecher D, Liesche F, Hoffmann B, Kegel V, Seehofer D, Platen S, Salzberger B, Liebert UG, Niller HH, Schmidt B, Matiassek K, Riemenschneider MJ, Brochhausen C, Banas B, Renders L, Moog P, Wunderlich S, Seifert CL, Barreiros A, Rahmel A, Weiss J, Tappe D, Herden C, Schmidt-Chanasit J, Schwemmler M, Rubbenstroth D, Schlegel J, Pietsch C, Hoffmann D, Jantsch J, Beer M (2018): Fatal Encephalitic Borna Disease Virus 1 in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med* 379(14): 1377-1379.

Schlottau K, Hoffmann B, Homeier-Bachmann T, Fast C, Ulrich RG, Beer M, Hoffmann D (2017a): Multiple detection of zoonotic variegated squirrel bornavirus 1 RNA in different squirrel species suggests a possible unknown origin for the virus. *Arch Virol* 162(9): 2747-2754.

Schlottau K, Jenckel M, van den Brand J, Fast C, Herden C, Hoper D, Homeier-Bachmann T, Thielebein J, Mensing N, Diender B, Hoffmann D, Ulrich RG, Mettenleiter TC, Koopmans M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Reusken CB, Beer M, Hoffmann B (2017b): Variegated Squirrel Bornavirus 1 in Squirrels, Germany and the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 23(3): 477-481.

Schlottau K, Rissmann M, Graaf A, Schön J, Sehl J, Wylezich C, Höper D, Mettenleiter TC, Balkema-Buschmann A, Harder T, Grund C, Hoffmann D, Breithaupt A, Beer M (2020): SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *Lancet Microbe* 1(5): e218-e225.

Schneider DS, Ayres JS (2008): Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 8(11): 889-895.

Schneider U, Naegele M, Staeheli P (2004): Regulation of the Borna disease virus polymerase complex by the viral nucleoprotein p38 isoform. *Brief Report. Arch Virol* 149(7): 1409-1414.

Schneider U, Naegele M, Staeheli P, Schwemmler M (2003): Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* 77(21): 11781-11789.

Schountz T (2014): Immunology of bats and their viruses: challenges and opportunities. *Viruses* 6(12): 4880-4901.

Schulze V, Lurz PWW, Ferrari N, Romeo C, Steele MA, Marino S, Mazzamuto MV, Calvignac-Spencer S, Schlottau K, Beer M, Ulrich RG, Ehlers B (2020): Search for polyoma-, herpes-, and bornaviruses in squirrels of the family Sciuridae. *Virol J* 17(1): 42.

Schwarz AC, Ranft U, Piechotowski I, Childs JE, Brockmann SO (2009): Risk factors for human infection with Puumala virus, southwestern Germany. *Emerg Infect Dis* 15(7): 1032-1039.

Schwemmler M, De B, Shi L, Banerjee A, Lipkin WI (1997): Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *J Biol Chem* 272(35): 21818-21823.

Schwemmler M, Jehle C, Formella S, Staeheli P (1999): Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* 354(9194): 1973-1974.

Schwemmler M, Salvatore M, Shi L, Richt J, Lee CH, Lipkin WI (1998): Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem* 273(15): 9007-9012.

Scordel C, Culpier M (2015): [The Borna disease virus phosphoprotein alters the development of human GABAergic neurons]. *Med Sci (Paris)* 31(12): 1060-1063.

Searle JB (1984): Breeding the common shrew (*Sorex araneus*) in captivity. *Lab Anim* 18(4): 359-363.

Sellers RS (2017): Translating Mouse Models. *Toxicol pathol* 45(1): 134-145.

Shankar V, Kao M, Hamir AN, Sheng H, Koprowski H, Dietzschold B (1992): Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *J Virol* 66(2): 992-998.

Shi M, Lin XD, Chen X, Tian JH, Chen LJ, Li K, Wang W, Eden JS, Shen JJ, Liu L, Holmes EC, Zhang YZ (2018): The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* 556(7700): 197-202.

Siemers BM, Schauermaier G, Turni H, von Merten S (2009): Why do shrews twitter? Communication or simple echo-based orientation. *Biol Lett* 5(5): 593-596.

Sikes RS (2016): 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J Mammal* 97(3): 663-688.

Simeonovska-Nikolova DM (2004a): Seasonal changes in social behaviour and spatial structure of *Crocidura leucodon* in north-western Bulgaria. *Acta Theriol* 49(2): 167-179.

Simeonovska-Nikolova DM (2004b): Vocal communication in the bicoloured white-toothed shrew *Crocidura leucodon*. *Acta Theriol* 49(2): 157-165.

Sjoberg EA (2017): Logical fallacies in animal model research. *Behav Brain Funct* 13(1): 3.

Smith PG, Racey PA (2005): The itinerant Natterer: physical and thermal characteristics of summer roosts *Myotis nattereri* (Mammalia: Chiroptera). *J Zool* 266: 171-180.

Sofuku K, Parrish NF, Honda T, Tomonaga K (2015): Transcription Profiling Demonstrates Epigenetic Control of Non-retroviral RNA Virus-Derived Elements in the Human Genome. *Cell Rep* 12(10): 1548-1554.

Sprankel H, Richarz K, Ludwig H, Rott R (1978): Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol* 165(1): 1-18.

Steck C, Brinkmann R (2015): Wimperfledermaus, Bechsteinfledermaus und Mopsfledermaus. Haupt Verlag, Bern.

Stenglein MD, Leavitt EB, Abramovitch MA, McGuire JA, DeRisi JL (2014): Genome Sequence of a Bornavirus Recovered from an African Garter Snake (*Elapsoidea loveridgei*). *Genome Announc* 2(5).

Stitz L, Bilzer T, Planz O (2002): The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci* 7: d541-555.

Stitz L, Krey H, Ludwig H (1981): Borna disease in rhesus monkeys as a models for uveo-cerebral symptoms. *J Med Virol* 6(4): 333-340.

Stitz L, Noske K, Planz O, Furrer E, Lipkin WI, Bilzer T (1998): A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* 72(11): 8884-8892.

Streicker DG, Lemey P, Velasco-Villa A, Rupprecht CE (2012): Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. *PLoS Pathog* 8(5): e1002720.

t Hart BA, Bogers WM, Haanstra KG, Verreck FA, Kocken CH (2015): The translational value of non-human primates in preclinical research on infection and immunopathology. *Eur J Pharmacol* 759: 69-83.

- Tannenbaum J, Bennett BT (2015):** Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 54(2): 120-132.
- Tappe D, Frank C, Offergeld R, Wagner-Wiening C, Stark K, Rubbenstroth D, Giese S, Lattwein E, Schwemmle M, Beer M, Schmidt-Chanasit J, Wilking H (2019a):** Low prevalence of Borna disease virus 1 (BoDV-1) IgG antibodies in humans from areas endemic for animal Borna disease of Southern Germany. *Sci Rep* 9(1): 20154.
- Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Rauch J, Allartz P, Herden C (2019b):** Immunopathology of Fatal Human Variegated Squirrel Bornavirus 1 Encephalitis, Germany, 2011-2013. *Emerg Infect Dis* 25(6): 1058-1065.
- Tatu AL, Nadasdy T, Nwabudike LC (2021):** Chitin-lipid interactions and the potential relationship between *Demodex* and SARS-CoV-2. *Dermatol Ther* 34(3): e14935.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME (2001):** Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1411): 983-989.
- Tizard I, Ball J, Stoica G, Payne S (2016):** The pathogenesis of bornaviral diseases in mammals. *Anim Health Res Rev* 17(2): 92-109.
- Tomonaga K, Kobayashi T, Ikuta K (2002):** Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* 4(4): 491-500.
- Ulrich RG, Imholt C, Krüger DH, Krautkrämer E, Scheibe T, Essbauer SS, Pfeffer M (2013):** [Hantaviruses in Germany: threat for zoo, pet, companion and farm animals?]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 126(11-12): 514-526.
- Unterstab G, Ludwig S, Anton A, Planz O, Dauber B, Krappmann D, Heins G, Ehrhardt C, Wolff T (2005):** Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38): 13640-13645.
- Vahlenkamp TW, Konrath A, Weber M, Müller H (2002):** Persistence of Borna Disease Virus in Naturally Infected Sheep. *J Virol* 76(19): 9735-9743.
- Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, Haydon DT (2014):** Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends Ecol Evol* 29(5): 270-279.
- Vogel P, Jutzeler S, Rulence B, Reutter BA (2002):** Range expansion of the greater white-toothed shrew *Crocidura russula* in Switzerland results in local extinction of the bicoloured white-toothed shrew *C-leucodon*. *Acta Theriol* 47(1): 15-24.
- Von Merten S, Siemers BM (2012):** Exploratory behaviour in shrews: fast lived *Sorex* versus slow-lived *Crocidura*. *Anim Behav* 84: 29-38.

Watanabe M, Lee BJ, Kamitani W, Kobayashi T, Taniyama H, Tomonaga K, Ikuta K (2001): Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally born disease virus-infected gerbils. *Virology* 282(1): 65-76.

Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ (1999): Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *J Virol* 73(5): 4316-4326.

Webster M (2016): Merriam-Webster's Medical Dictionary. Merriam-Webster, Inc., Springfield.

Weissenböck H, Bago Z, Kolodziejek J, Hager B, Palmethofer G, Dürwald R, Nowotny N (2017): Infections of horses and shrews with Bornaviruses in Upper Austria: a novel endemic area of Borna disease. *Emerg Microbes Infect* 6(6): e52.

Weissenböck H, Bakonyi T, Sekulin K, Ehrensperger F, Doneley RJ, Dürwald R, Hoop R, Erdélyi K, Gál J, Kolodziejek J, Nowotny N (2009): Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 15(9): 1453-1459.

Weissenböck H, Hornig M, Hickey WF, Lipkin WI (2000): Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathol* 10(2): 260-272.

Wensman JJ, Jäderlund KH, Holst BS, Berg M (2014): Borna disease virus infection in cats. *Vet J* 201(2): 142-149.

Werner-Keiß N, Garten W, Richt JA, Porombka D, Algermissen D, Herzog S, Baumgärtner W, Herden C (2008): Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34(6): 590-602.

Wilder-Smith A (2021): COVID-19 in comparison with other emerging viral diseases: risk of geographic spread via travel. *Trop Dis Travel Med Vaccines* 7(1): 3.

Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S (2005): Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis* 11(12): 1842-1847.

Woon AP, Boyd V, Todd S, Smith I, Klein R, Woodhouse IB, Riddell S, Cramer G, Bingham J, Wang LF, Purcell AW, Middleton D, Baker ML (2020): Acute experimental infection of bats and ferrets with Hendra virus: Insights into the early host response of the reservoir host and susceptible model species. *PLoS Pathog* 16(3): e1008412.

Wu YJ, Schulz H, Lin CC, Saar K, Patone G, Fischer H, Hubner N, Heimrich B, Schwemmler M (2013): Borna disease virus-induced neuronal degeneration dependent on host genetic background and prevented by soluble factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(5): 1899-1904.

Xue B, Sechi LA, Kelvin DJ (2020): Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) in Health and Disease. *Front Microbiol* 11: 1690.

Yanai M, Kojima S, Sakai M, Komorizono R, Tomonaga K, Makino A (2020): ADAR2 Is Involved in Self and Nonsel Self Recognition of Borna Disease Virus Genomic RNA in the Nucleus. *J Virol* 94(6).

Yanai M, Sakai M, Makino A, Tomonaga K (2017): Dual function of the nuclear export signal of the Borna disease virus nucleoprotein in nuclear export activity and binding to viral phosphoprotein. *Virology* 14(1): 126.

Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579(7798): 270-273.

Zhu P, Garber PA, Wang L, Li M, Belov K, Gillespie TR, Zhou X (2020): Comprehensive Knowledge of Reservoir Hosts is Key to Mitigating Future Pandemics. *Innovation (N Y)* 1(3): 100065.

Zippelius H-M (1957): Zur Karawanenbildung bei der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*). *Bonn Zool Bull* 8(2): 81-85.

Zong J, Yao X, Yin J, Zhang D, Ma H (2009): Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* 447(1): 29-39.

Zwick W, Seifried O (1924): Untersuchungen ueber die in Hessen gehaeuft auftretende seuchenhafte Gehirn- und Rueckenmarksentzuendung (Bornasche Krankheit) bei Pferden. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 40: 465-471.

Zwick W, Seifried O (1925): Uebertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rueckenmarksentzuendung des Pferdes (Bornaschen Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 41: 129-132.

Zwick W, Seifried O, Witte J (1927): Weitere Untersuchungen ueber die seuchenhafte Gehirn- und Rueckenmarksentzuendung der Pferde. *Z Infkrankh Haustiere* 32: 150-179.

Zwick W, Witte J (1931): Zur Frage der Schutzimpfung und der Inkubationsfrist bei der Bornaschen Krankheit. *Arch Wiss Prakt Tierheilkd* 64: 116-124.

10 Anhang

10.1. Zusätzliche Methoden: Bestimmung von Fledermäusen mittels Ultraschalldetektoren

Die aufgenommenen Signale der Fledermäuse werden mit einer vom Signal erzeugten Schwingung überlagert, diese Technik wird Heterodynsystem genannt. Die Differenz der Frequenz dieser beiden Schwingungen liegt innerhalb des Hörspektrums der Menschen. Verschiedene Frequenzverläufe der Rufe verursachen dabei charakteristische Laute. „Nasse“ Laute erinnern an fallende Wassertropfen und werden bei Rufen mit längerer konstanter Frequenz verursacht. Ein Beispiel hierfür sind die Rufe der weit verbreiteten Zwergfledermaus. „Trockenes“ Knattern wird hingegen durch Rufe mit starker Frequenzmodulation verursacht, die dadurch kürzere Zeit im Hörbereich des Menschen liegen. Beispiele bei europäischen Fledermäusen sind dafür die Wasserfledermaus (*Myotis daubentonii*) und die Fransenfledermaus (*Myotis nattereri*).

Der Ultraschalldetektor (Ultraschalldetektor Pettersson D 200) war bei den Begehungen auf eine Zielfrequenz von 45 kHz eingestellt und wurde bei Verdacht auf Rufe um bis zu 5 kHz variiert, um diese Rufe lauter zu hören. Der Großteil der im Untersuchungsgebiet möglicherweise vorkommender Arten sollte damit bemerkt werden.

Rufe wurden dann anhand des Klangbildes den Gattungen oder Arten zugeordnet [Barataud 2015, Dietz und Kiefer 2004].

Parallel wurde ein Aufzeichnungsgerät [SongMeter 3, Wildlife Acoustics] auf den Besichtigungen mitgeführt, um die Rufe im Nachhinein mittels Sonogramm auszuwerten. Die Aufzeichnungen wurden mit der Software Song Scope [Wildlife Acoustics] ausgewertet (Abbildung 5), dabei wurden die in Tabelle 11 abgebildeten Einstellungen verwendet. In diesem Programm werden im zeitlichen Verlauf die Frequenzen und Lautstärken graphisch angezeigt. Parallel wird in einem Oszillogramm die Amplitude im Zeitverlauf angezeigt. Durch Auswahl von Mustern, die die Eigenschaften von Fledermausrufen ausweisen, können zusätzliche Informationen wie Länge, Frequenzbereich und mittlere Frequenz angezeigt werden.

Die Eigenschaften von Fledermausrufen beinhalten eine Rufdauer von mehr als 2 Millisekunden und eine Bandbreite an Frequenzen, die während dem Ruf verwendet werden. Einige Arten (in Europa die Hufeisennasen) verwenden Rufe mit langer konstanter Frequenz und kurzen Frequenzmodulationen am Anfang und am Ende des Rufes, die meisten Arten zeigen aber Frequenzmodulationen über die gesamte Dauer des Rufes. Die mittlere Frequenz kann im Zusammenhang mit dem Muster der

Frequenzmodulationen zur Artbestimmung genutzt werden [Einzelheiten in Barataud 2015]. Allerdings kann sie in verschiedenen Habitaten und im begrenzten Maße zwischen Individuen variieren. Ortungsrufe sind artspezifischer und konstanter, wohingegen Sozialrufe häufig komplexere Variationen beinhalten [Barataud 2015].

Abbildung 5 – Rufanalyse mit dem Auswertungsfenster des Programmes Song Scope

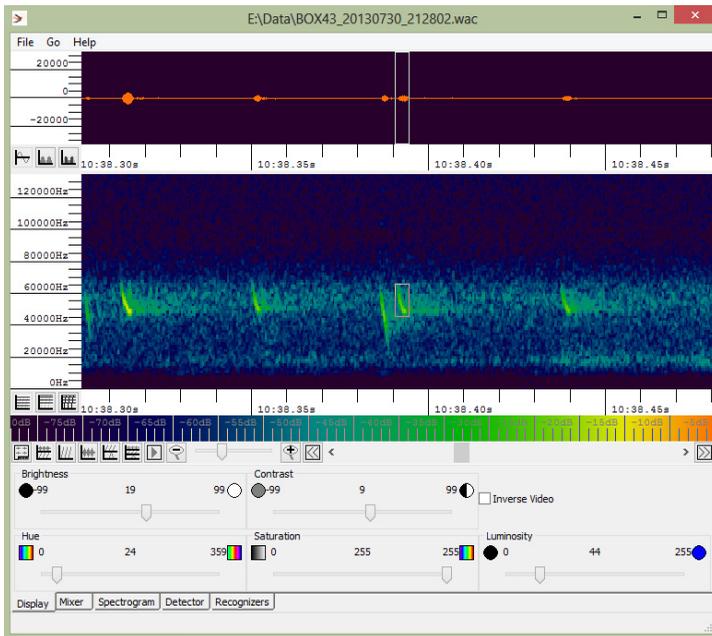
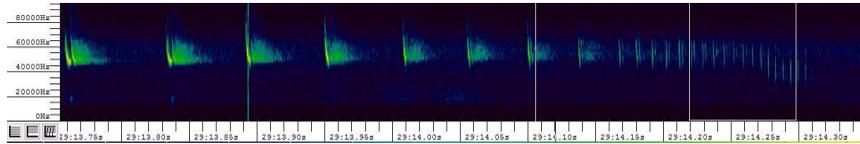


Tabelle 11 Einstellungen zur Rufanalyse im Programm Song Scope

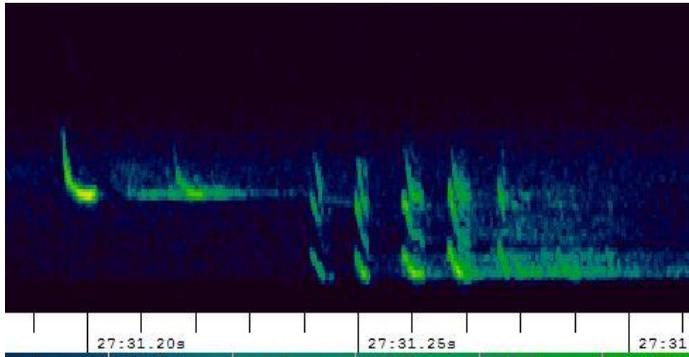
Display		
Hue:		24
Luminosity:		44
Contrast:		9
Brightness:		19
Mixer		
Playback Speed:		1/10
Sample Rate:		38400
Spectrogramm		
FFT Size:		256
FFT Overlap:		½
Amplitude Gain:		-14
Frequency Min:		0
Frequency Range:		90
Recognizers		
Minimum quality:		10
Minimum score:		25
Show Top:		5 Matches

Abbildung 6 – Rufe einer Zwergfledermaus



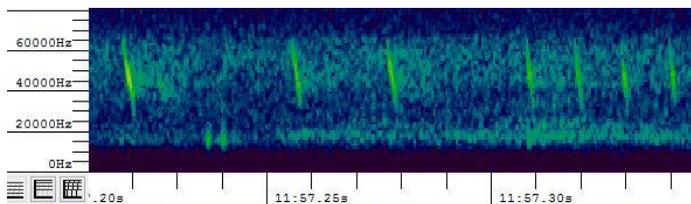
Beispiel der Rufe einer Zwergfledermaus (*Pipistrellus pipistrellus*). Sie zeigen einen starken Abfall der Frequenz von 64500 Hz zu 43500 Hz mit einer mittleren Frequenz von 49000 Hz. Die schneller werdende Abfolge der Rufe deutet auf Jagdrufe hin, mit einer typischen tieferen Frequenz zum Ende der Abfolge.

Abbildung 7 – Rufe einer Breitflügelfledermaus



Beispiel der Rufe einer Breitflügelfledermaus (*Eptesicus serotinus*). Sie zeigen einen Abfall der Frequenz von 49500 Hz zu 28500 Hz mit einer mittleren Frequenz von 34000 Hz. Im Vergleich zum Ruf der Zwergfledermaus ist ein noch längerer frequenzkonstanter Anteil zu erkennen. Die Rufe ab 27:31:25 deuten auf soziale Interaktionen hin.

Abbildung 8 – Rufe einer Myotis-Fledermaus



Beispiele der Rufe einer Fledermaus der Gattung *Myotis*. Der Ruf ist sehr kurz, wie man an der starken Steigung sehen kann. Die Frequenz fällt schnell von 72000 Hz auf 21000 Hz mit einer mittleren Frequenz von 44000 Hz. Gleichzeitig sind im Bild deutliche Störgeräusche als heller fleckiger Hintergrund zu erkennen.

10.2. Auswertung von Ultraschalldetektoren zur Bestimmung von Fledermausarten in Betrieben mit equiner BD

Tabelle 12 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 1

Uhrzeit hh:mm:ss	Art	mittlere Frequenz [Hertz]	Frequenzbereich [Hertz]	Länge [Millisekunden]
21:08:24	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	50000	45000-64500	5
21:09:04	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	52000	48000-61500	3
21:09:32	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	50000	43500-58500	5
21:10:21	<i>Myotis sp.</i>	57000	48000-67500	3
21:10:34	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	55000	46500-103500	6
21:11:36	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	43500-69000	5
21:20:42	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	52500	46500-69000	5
21:20:45	<i>Eptesicus serotinus</i>	35000	25500-60000	6
21:21:42	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	43500-64500	5
21:26:25	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	52000	45000-70500	5
21:27:44	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	45000-58500	4
21:27:44	<i>Myotis sp.</i>	26000	15000-39000	4
21:29:11	<i>Eptesicus serotinus</i>	34000	28500-49500	6
21:29:14	<i>Myotis brandtii</i>	44000	27000-76500	5
21:30:28	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	43500-60000	5
21:36:44	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	42000-64500	5
21:36:56	<i>Myotis sp.</i>	51000	42000-67500	3
21:37:10	<i>Myotis sp.</i>	50000	39000-67500	4
21:37:44	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	40500-57000	6
21:41:58	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	39000-69000	6
21:47:22	<i>Pipistrellus nathusii</i>	41000	36000-57000	8
21:47:26	<i>Eptesicus serotinus</i>	28000	21000-42000	13
21:53:28	<i>Myotis sp.</i>	44000	21000-72000	4
21:56:42	<i>Myotis sp.</i>	42000	19500-60000	6
21:59:07	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	43500-52500	9

Tabelle 13 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 2

Uhrzeit hh:mm:ss	Art	mittlere Frequenz [Hertz]	Frequenzbereich [Hertz]	Länge [Millisekunden]
21:22:46	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	45000	42000-49500	6
21:37:44	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	51000	46000-60000	5
21:38:06	<i>Myotis daubentonii</i>	47000	36000-66000	3
21:39:05	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	50000	46000-57000	6
21:41:00	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	52000	46500-60000	5
21:41:25	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	54000	45000-82500	6
21:43:57	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	51000	46500-63000	4
21:46:40	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	43500-64500	8
21:48:34	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	45000-61500	10
21:56:30	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	45000-57000	9
21:57:03	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	48000	40500-57000	4
21:57:41	<i>Myotis sp.</i>	53000	43500-69000	4

Tabelle 14 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 3

Uhrzeit hh:mm:ss	Art	mittlere Frequenz [Hertz]	Frequenzbereich [Hertz]	Länge [Millisekunden]
21:25:29	<i>Myotis daubentonii</i>	47000	34500-64500	3
21:26:44	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	43500-70500	5
21:30:12	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	44000	39000-58500	6
21:31:15	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	50000	43500-100500	7
21:34:07	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	48000	42000-64500	5
21:34:32	<i>Myotis sp.</i>	51000	40500-64500	2
21:36:57	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	48000	40500-102000	5
21:38:37	<i>Myotis sp.</i>	46500	25500-64500	3
21:39:12	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	43500-64500	5
21:39:12	<i>Myotis daubentonii</i>	48000	39000-58500	2
21:39:14	<i>Myotis daubentonii</i>	50000	36000-78000	3
21:39:56	<i>Myotis daubentonii</i>	47000	25500-78000	4
21:41:40	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	40500-105000	6
21:42:14	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	18000	13500-25500	5
21:43:12	<i>Myotis daubentonii</i>	51000	37500-84000	3
21:44:20	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	40500-69000	5
21:46:17	<i>Myotis daubentonii</i>	45000	25500-64500	4
21:50:01	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	48000	42000-615000	6
22:06:33	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	42000-57000	9

Tabelle 15 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 5

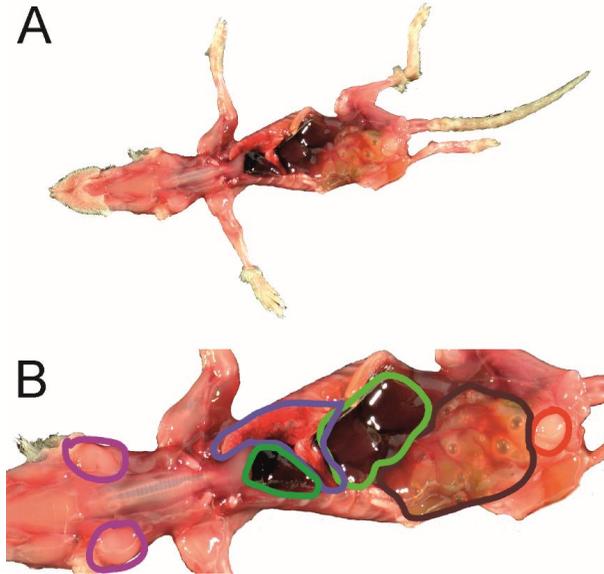
Uhrzeit hh:mm:ss	Art	mittlere Frequenz [Hertz]	Frequenzbereich [Hertz]	Länge [Millisekunden]
21:02:32	<i>Nyctalus noctula</i>	18000	20000-18000	18
21:02:40	<i>Nyctalus noctula</i>	18000	20000-18000	18
21:22:46	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	45000	42000-49500	6
21:32:00	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	46000	40500-57000	6
21:32:49	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	42000-61500	6
21:32:55	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	52000	45000-64500	3
21:35:12	<i>Myotis daubentonii</i>	43000	28500-61500	5
21:35:45	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	43500-57000	8
21:37:44	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	51000	46000-60000	5
21:38:06	<i>Myotis daubentonii</i>	47000	36000-66000	3
21:38:29	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	48000	46500-57000	8
21:39:05	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	50000	46000-57000	6
21:41:00	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	52000	46500-60000	5
21:41:25	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	54000	45000-82500	6
21:43:57	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	51000	46500-63000	4
21:51:52	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	44000	42000-54000	7
21:52:03	<i>Myotis sp.</i>	43000	31000-52000	3
21:54:13	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	47000	43500-69000	6
21:57:52	<i>Myotis daubentonii</i>	43000	27000-61500	4
21:58:35	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	46000	45000-51000	7

Tabelle 16 Rohdaten Ultraschallaufzeichnungen Rundgang Betrieb 6

Uhrzeit hh:mm:ss	Art	mittlere Frequenz [Hertz]	Frequenzbereich [Hertz]	Länge [Millisekunden]
21:01:42	<i>Nyctalus noctula</i>	30000	31500-27000	16
21:27:56	<i>Myotis sp.</i>	49000	37500-61500	4
21:29:02	<i>Myotis sp.</i>	49000	33000-67500	3
21:30:43	<i>Myotis sp.</i>	55000	40500-88500	3
21:31:30	<i>Myotis sp.</i>	48000	24000-64500	4
21:31:50	<i>Myotis sp.</i>	51000	30000-84000	5
21:32:27	<i>Myotis sp.</i>	48000	27000-73500	4
21:32:58	<i>Myotis sp.</i>	49000	27000-87000	4
21:34:46	<i>Myotis sp.</i>	48000	28500-66000	3
21:34:49	<i>Pipistrellus nathusii</i>	17500	12000-21000	8
21:36:56	<i>Myotis sp.</i>	56000	37500-108000	4
21:38:31	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	44500	37500-52500	3
21:38:55	<i>Myotis sp.</i>	47500	27000-67500	5
21:41:43	<i>Myotis sp.</i>	50000	36000-69000	4
21:41:45	<i>Myotis sp.</i>	51000	25500-90000	4
21:42:05	<i>Myotis sp.</i>	51000	37500-84000	2
21:45:43	<i>Myotis sp.</i>	47500	34500-60000	3
21:48:20	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	46000	42000-51000	7
21:51:56	<i>Myotis sp.</i>	50000	39000-64500	3
21:53:03	<i>Myotis sp.</i>	46000	33000-60000	3
21:53:17	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	50000	45000-63000	5
21:59:09	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	49000	43500-58500	8
22:07:40	<i>Myotis sp.</i>	49000	25500-70500	6
22:07:55	<i>Myotis sp.</i>	51000	28500-78000	4
22:15:47	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	51000	46500-63000	5
22:17:26	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	53000	46500-67500	7
22:18:32	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	46000	40500-54000	8
22:21:05	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	42500	37500-48000	10

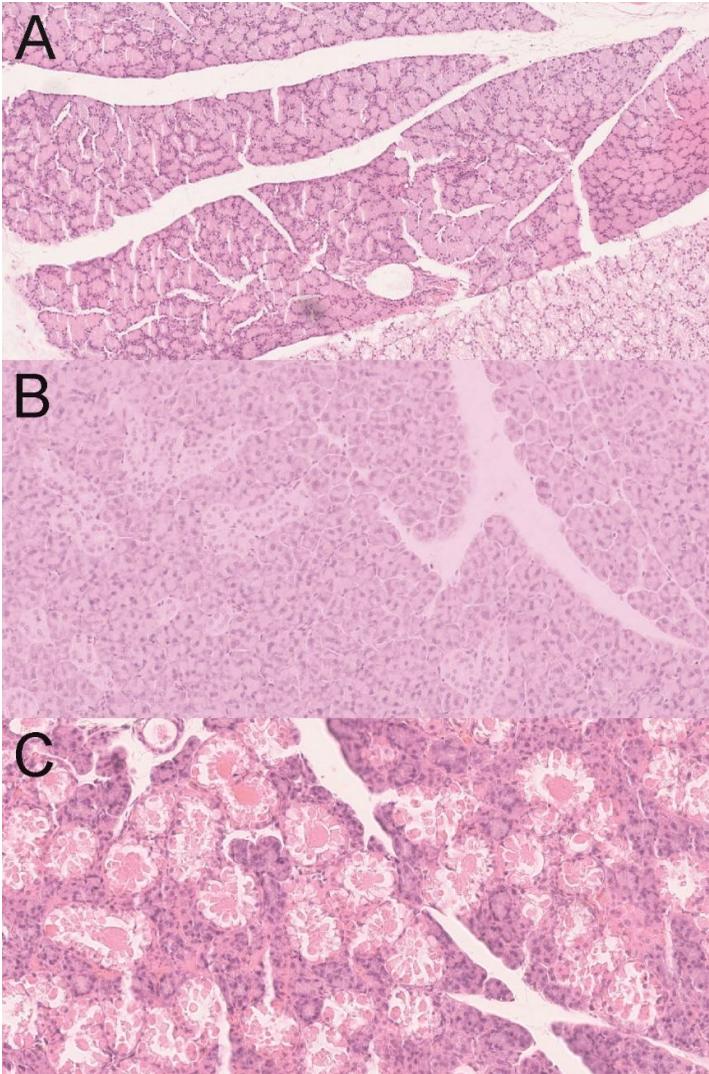
10.3. Pathologische Untersuchungen bei Feldspitzmäusen - Normalbefunde

Abbildung 9 – Situs Feldspitzmaus



- A) enthäuteter Tierkörper von ventral mit eröffneter Brusthöhle und Bauchhöhle
B) lila: Speicheldrüsen (Glandula submandibularis), blau: Lunge, dunkelgrün: Herz, hellgrün: Leber, schwarz: Darmkonvolut, rot: Harnblase

Abbildung 10 – Speicheldrüsen bei der Feldspitzmaus

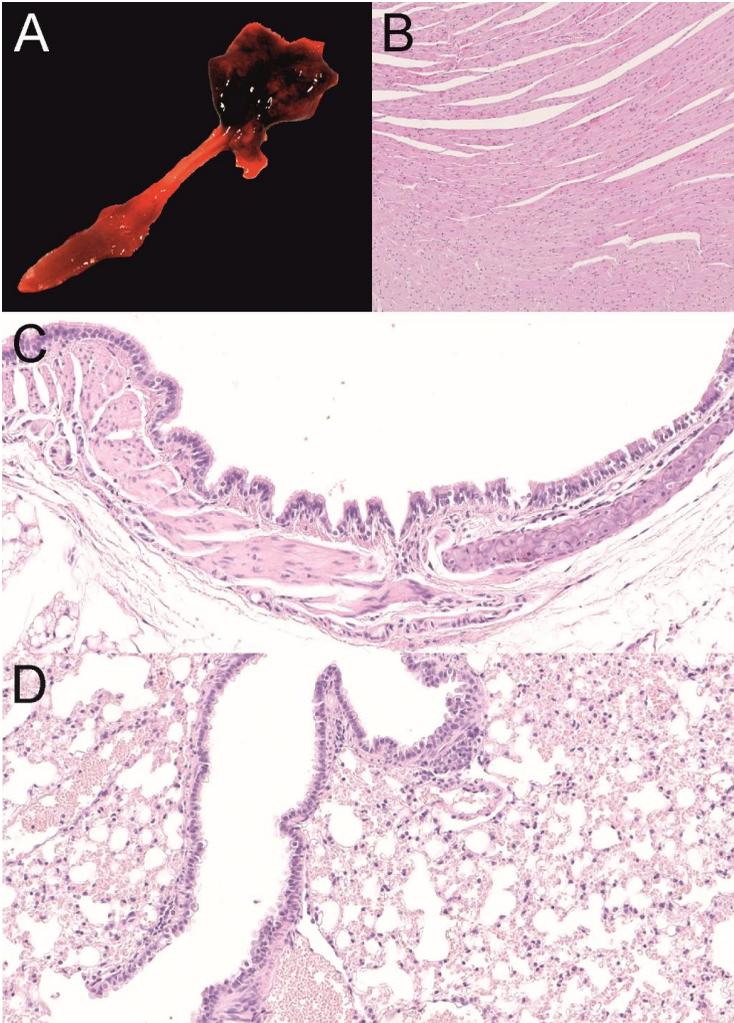


A) Glandula parotis, seröse Speicheldrüse

B) Glandula sublingualis, muköse Speicheldrüse

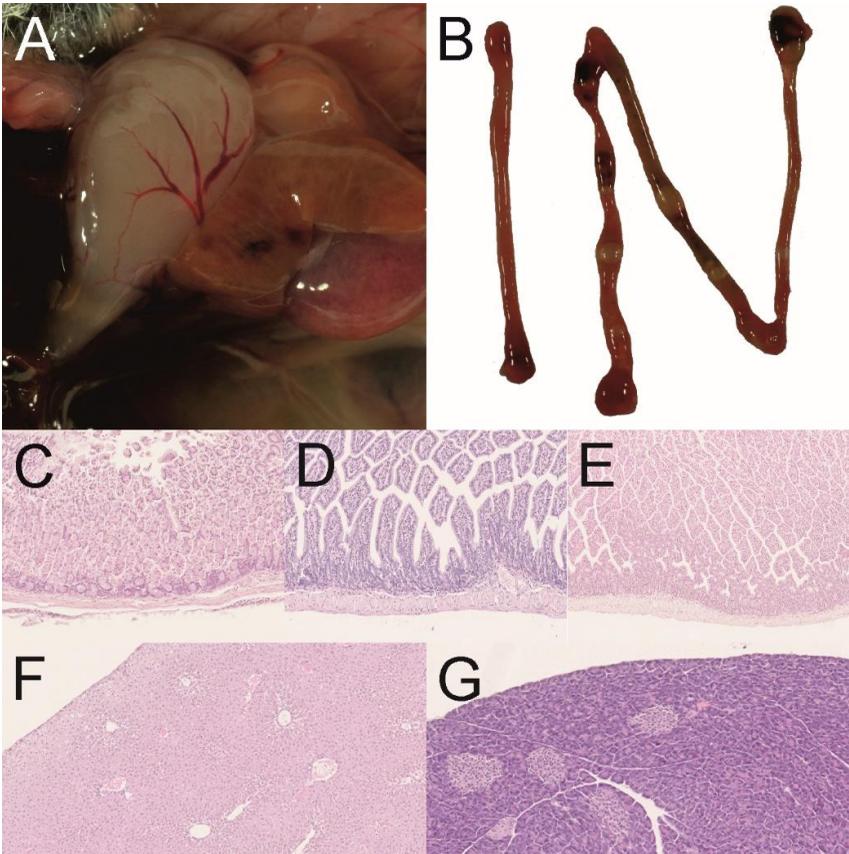
C) Glandula submandibularis, gemischte Speicheldrüse mit serösen und mukösen Anteilen

Abbildung 11 – Organe der Brusthöhle



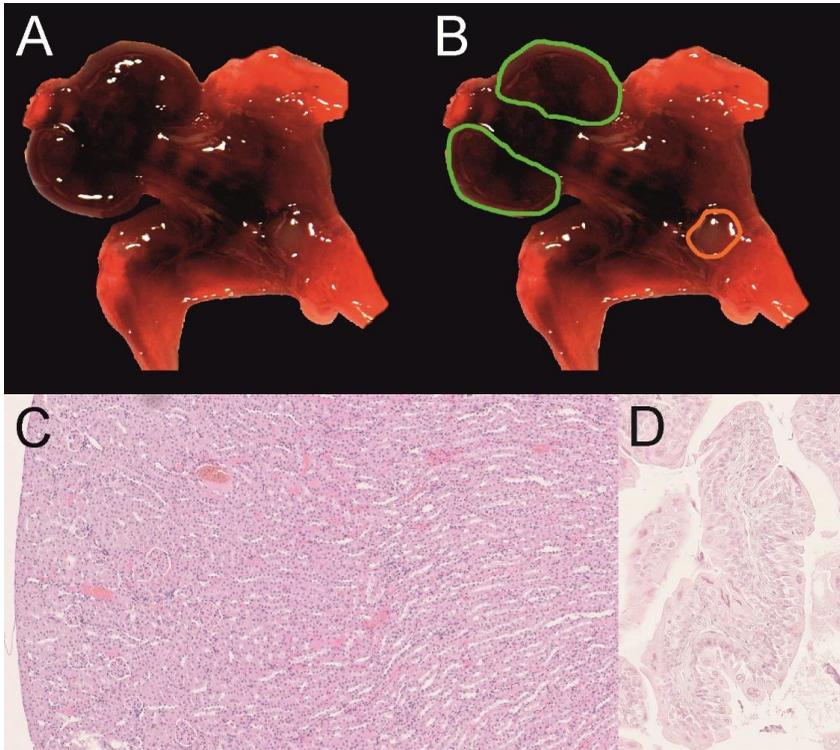
- A) Übersicht Geschlinge
- B) Herz
- C) Luftröhre
- D) Lunge mit Bronchus

Abbildung 12 – Organe des Verdauungstraktes



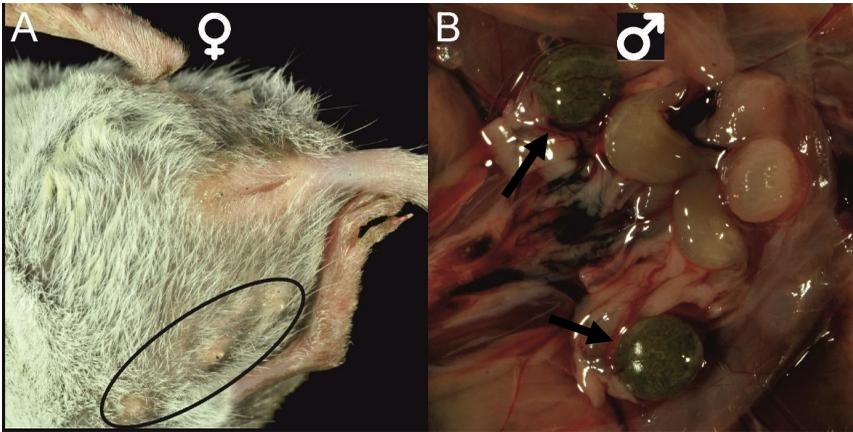
- A) Magen in der Bauchhöhle mit Milz (Darmkonvolut und Leber entnommen)
- B) Darm mit Dünndarm und Dickdarm
- C) Magenschleimhaut
- D) Schleimhaut des Dünndarms (Jejunum)
- E) Schleimhaut des Dickdarms (Colon)
- F) Leber
- G) Pankreas

Abbildung 13 – Niere und Harnblase



- A) Übersicht über den caudalen Abschnitt der Bauchhöhle (Darmkonvolut entnommen)
- B) markierte Organe: Niere (grün), Harnblase (orange)
- C) Niere mit deutlicher Trennung in Rinde (links) mit Glomerula und proximalen Tubuli und Mark (rechts) mit parallel angeordneten distalen Tubuli und Sammelrohren
- D) Harnblasenschleimhaut

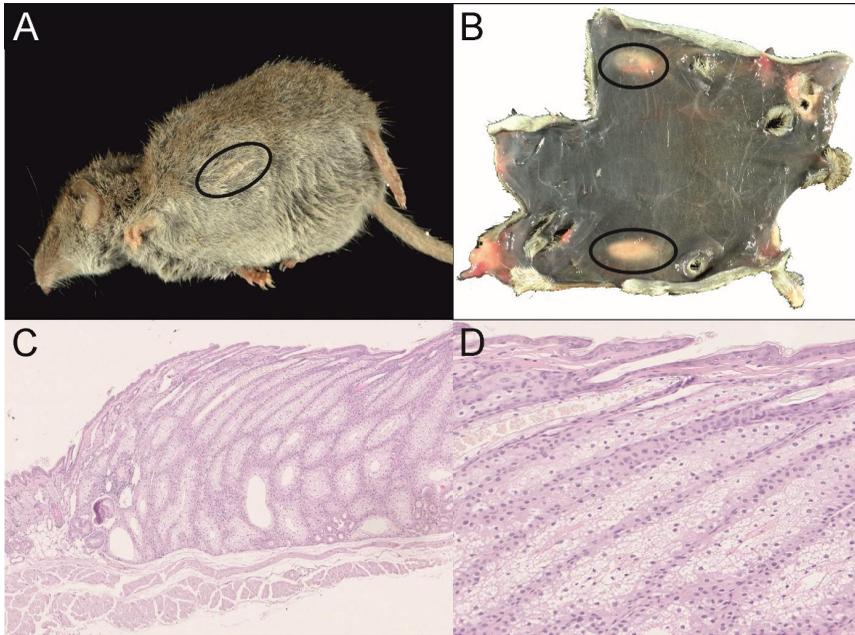
Abbildung 14 – Mamdrüsen und Hoden bei der Feldspitzmaus



A) Geschlechtsreifes Weibchen, Mamdrüsen mit drei Komplexen

B) Geschlechtsreifes Männchen, intraabdominal gelegene Hoden (Pfeil) mit grüner Pigmentierung sowie dorsal der Harnblase paarige Samenblasendrüsen (Glandula vesicularis)

Abbildung 15 – Flankendrüse bei Spitzmäusen



A) Flankendrüse an der seitlichen Bauchwand, insbesondere bei Männchen ausgeprägt (hier Darstellung bei einer Hausspitzmaus)

B) Lage der Flankendrüse bei abzogener Haut

C-D) Nester von Talgdrüsen-ähnlichen Drüsenzellen unter der Epidermis

10.4. Ergebnisse der pathologischen Untersuchungen bei Feldspitzmäusen der Haltung

Tier	#1 S1361/16
Geschlecht	männlich
Todesdatum	31.8.2016
Alter	1124 Tage
Vorbericht	verringerte Futteraufnahme in den 2 Wochen vor dem Tod, am Tag vor dem Tod keine Futteraufnahme
Gewicht	10 g
Ernährungszustand	schlecht
relevante Befunde	Rundzellentumor in der caudalen Thoraxhöhle mit Infiltration in Lunge, Thoraxwand und Mediastinum, daneben multifokale eitrige Hepatitis und futterleerer Magen-Darmtrakt

Tier	#2 S1768/16
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	30.11.2016
Alter	1215 Tage
Vorbericht	seit langem Alopezie am Rücken, am Tag vor dem Tod deutliche Verringerung der Futteraufnahme, sonst keine Symptome/alt
Gewicht	11 g
Ernährungszustand	schlecht
relevante Befunde	Karzinom in der Lunge und Leberadenom, daneben futterleerer Magen und bilateral-symmetrische Alopezie im Bereich des gesamten Rückens

Tier	#3 S1687/15
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	9.12.2015
Alter	823 Tage
Vorbericht	Alopezie seit Monaten, in den Wochen vor dem Tod leicht verringerte Futteraufnahme und staksiger Gang, dann Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit Apathie, Euthanasie
Gewicht	9 g
Ernährungszustand	schlecht
relevante Befunde	Pankreaskarzinom mit geringgradigem Hydroperitoneum, maligne Neoplasie in der Leber mit pyogranulomatöser Entzündung, daneben Alopezie an Rückenlinie

Tier	#5 S120/14
Geschlecht	männlich
Todesdatum	30.1.2014
Alter	92 Tage
Vorbericht	ohne Symptome tot aufgefunden
Gewicht	14,1 g
Ernährungszustand	adipös
relevante Befunde	Invagination des distalen Colons mit blutigem Darminhalt und geringgradigem Bandwurmbefall, daneben eitrige Pneumonie

Anhang

Tier	#6 S119/14
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	29.1.2014
Alter	91 Tage
Vorbericht	in den letzten 2 Tagen vor Tod deutlich gesteigerte Atemfrequenz, Apathie und Einstellung der Futterraufnahme
Gewicht	15,3 g
Ernährungszustand	adipös
relevante Befunde	futterleerer Magen-Darmtrakt, multifokale nicht-eitrige Hepatitis mit großen intranukleären Einschlusskörperchen in Hepatozyten und mittelgradigem Hydroperitoneum, fokale katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie

Tier	#7 S813/16
Geschlecht	männlich
Todesdatum	26.5.2016
Alter	931 Tage
Vorbericht	seit Monaten Alopezie, am Tag vor dem Tod deutliche Verringerung der Futterraufnahme, sonst keine Symptome
Gewicht	11,1 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	futterleerer Magen-Darmtrakt, fettige Degeneration von Hepatozyten, Fibropapillom am Rücken und Alopezie im Bereich des Schädeldaches

Tier	#8 S181/16
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	8.2.2016
Alter	599 Tage
Vorbericht	4 Tage vor dem Tod verringerte Futterraufnahme und gesträubtes Haarkleid am Tag vor dem Tod deutliche Verringerung der Futterraufnahme
Gewicht	9,1 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	Rundzellentumor in der Thoraxhöhle neben der Lunge

Tier	#9
Geschlecht	männlich
Todesdatum	15.7.2016
Alter	758 Tage
Vorbericht	ohne Symptome tot aufgefunden, seit langem Alopezie am hinteren Rücken
Gewicht	11 g
Ernährungszustand	unbekannt
relevante Befunde	keine Sektion

Anhang

Tier	#10 S892/16
Geschlecht	männlich
Todesdatum	10.6.2016
Alter	722 Tage
Vorbericht	seit Monaten Alopezie, in den letzten 2 Wochen vor dem Tod leicht verringerte Futtermittelaufnahme, am Tag vor dem Tod deutliche Verringerung der Futtermittelaufnahme
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	schlecht
relevante Befunde	Nierentumor in der rechten Niere, Alopezie an Rücken, Flanke, Bauch und Kopf, daneben futterleerer Magen-Darmtrakt und Exsikkose

Tier	#11 S972/14
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	22.7.2014
Alter	adult
Vorbericht	1 Tag nach Transport in Haltung gestorben, keine Futtermittelaufnahme
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	futterleerer Magen-Darmtrakt

Tier	#12 S45/17
Geschlecht	männlich
Todesdatum	8.1.2017
Alter	903 Tage
Vorbericht	seit Monaten Alopezie, am Tag vor dem Tod deutliche Verringerung der Futtermittelaufnahme, sonst keine Symptome
Gewicht	10 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	Alopezie im Bereich des gesamten Rückens, Darmanschoppung, akute Lungenstauung

Tier	#13
Geschlecht	männlich
Todesdatum	24.03.2017
Alter	978 Tage
Vorbericht	seit langem Alopezie am Rücken, mehrere Monate vor dem Tod Umfangsvermehrung an der linken Hintergliedmaße, chirurgische Entfernung, stellt sich in der Untersuchung als Mastzellentumor dar Tierkörper stand nicht zur Sektion zur Verfügung
Gewicht	ca 11 g
Ernährungszustand	unbekannt
relevante Befunde	keine Sektion; 2 Monate vor dem Tod Entfernung eines Mastzelltumors an linker Hintergliedmaße

Anhang

Tier	#14 S924/18
Geschlecht	männlich
Todesdatum	20.6.2018
Alter	1353 Tage
Vorbericht	alt, ohne akute Symptome tot aufgefunden
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	schlecht
relevante Befunde	multifokale Lebertumoren mit Nekrosen, daneben verheilter Bruch in der Schwanzwirbelsäule und schütteres Haarkleid mit einzelnen Stellen von Alopezie

Tier	#15 S702/17
Geschlecht	männlich
Todesdatum	3.5.2017
Alter	941 Tage
Vorbericht	seit Monaten Alopezie, ohne akute Symptome tot aufgefunden
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	Lungenblutungen und alveoläres Lungenödem, Leydigzelltumor im rechten Hoden, Alopezie am kaudalen Rücken

Tier	#16 S1624/15
Geschlecht	männlich
Todesdatum	23.11.2015
Alter	432 Tage
Vorbericht	innerhalb von 2 Tagen 3g Körpergewicht verloren, daneben multifokalen Haarverlust, zuletzt stark gestörtes Allgemeinbefinden mit struppigem Haarkleid, staksiger Gang und Apathie
Gewicht	9 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	T-Zell-Lymphom mit Splenomegalie und generalisierter Lymphknotenschwellung sowie multifokalen dermalen Ulzerationen am Bauch, daneben futterleerer Magen-Darmtrakt

Tier	#17 S925/18
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	24.12.2017
Alter	1194 Tage
Vorbericht	seit Monaten Alopezie, ohne akute Symptome tot aufgefunden
Gewicht	9 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	akute Stauung von Leber, Lunge und Niere, alveoläres Lungenödem, multifokale Alopezie am Rücken

Anhang

Tier	#18 S415/18
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	18.3.2018
Alter	1278 Tage
Vorbericht	1 Woche vor Tod Schwäche mit verminderter Futterraufnahme
Gewicht	6 g
Ernährungszustand	schlecht
relevante Befunde	Rundzellentumor in der Lunge, Alopezie im Bauchbereich, daneben futterleerer Magen-Darmtrakt mit Ausnahme von Enddarm mit Koprostase

Tier	#19 S1243/17
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	25.08.2017
Alter	1014 Tage
Vorbericht	seit Monaten Alopezie, ohne akute Symptome tot aufgefunden
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	hepatozelluläres Karzinom, daneben Basalzelltumor, multifokale Alopezie am Rücken und futterleerer Magen-Darmtrakt

Tier	#20 S1467/17
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	18.10.2017
Alter	1068 Tage
Vorbericht	aufgefallen mit dickem Bauch, Euthanasie wegen Verdacht auf Tumorerkrankung
Gewicht	11,7 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	maligner Rundzellentumor in Leber und angrenzendem Bauchraum mit 4 ml Aszites mit Fibrinbeimengungen, daneben eitrig Pneumonie, pyogranulomatöse Hepatitis und Alopezie am Rücken

Tier	#21 S35/17
Geschlecht	männlich
Todesdatum	5.1.2017
Alter	782 Tage
Vorbericht	Euthanasie aufgrund schlechtem Allgemeinbefinden mit Schwäche und verringerter Futterraufnahme in den letzten 8 Wochen vor dem Tod
Gewicht	6 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	maligner Rundzellentumor am Brusteingang im Mediastinum mit 150µl Thoraxerguss, daneben Alopezie im Nacken und Rücken

Anhang

Tier	#22 S840/18
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	1.6.2018
Alter	1237 Tage
Vorbericht	torkelnder Gang, leicht verminderte Futteraufnahme in den letzten 2 Wochen vor dem Tod
Gewicht	9 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	akute Stauung von Leber, Niere und Lunge

Tier	#23 S1388/17
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	4.10.2017
Alter	997 Tage
Vorbericht	mehrere Wochen vor dem Tod zwanghafte Kreisbewegungen, die sich zu Seitwärtsrollen verwandelt haben, dazu Ataxie und heftige Atmung, deshalb Entscheidung zur Euthanasie
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	mäßig
relevante Befunde	Rundzellentumor im Bereich der Lunge

Tier	#24 S326/18
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	1.3.2018
Alter	1145 Tage
Vorbericht	ohne Symptome tot aufgefunden
Gewicht	7 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	multifokale eitrige Hepatitis mit Blutungen

Tier	#25 S218/16
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	16.2.2016
Alter	401 Tage
Vorbericht	nach Verpaarung dicken Bauch bekommen und Nestbauerhalten gezeigt, dann tot aufgefunden
Gewicht	10 g
Ernährungszustand	sehr gut
relevante Befunde	Perforation des Uterus mit zwei ungleich großen Embryonen, daneben Alopezie bilateral mediocranial der Schultern

Anhang

Tier	#26 S274/19
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	20.02.2019
Alter	1141 Tage
Vorbericht	Euthanasie zur Organentnahme / Aufgabe der Zucht
Gewicht	7 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	keine Auffälligkeiten

Tier	#27 S385/19
Geschlecht	männlich
Todesdatum	13.3.2019
Alter	1163 Tage
Vorbericht	Euthanasie aus Altersgründen
Gewicht	7 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	Leberkarzinom, Alopezie im Bereich des Rückens

Tier	#28 S1675/18
Geschlecht	männlich
Todesdatum	29.11.2018
Alter	1058 Tage
Vorbericht	ohne vorherige Symptome tot aufgefunden
Gewicht	6 g
Ernährungszustand	schlecht
relevante Befunde	Hepatitis, Ektoparasitenbefall

Tier	#29 S384/19
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	13.3.2019
Alter	1085 Tage
Vorbericht	Euthanasie aus Altersgründen
Gewicht	7 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	keine Auffälligkeiten

Tier	#30 S386/19
Geschlecht	männlich
Todesdatum	13.3.2019
Alter	1085 Tage
Vorbericht	Euthanasie aus Altersgründen
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	Leberadenom

Anhang

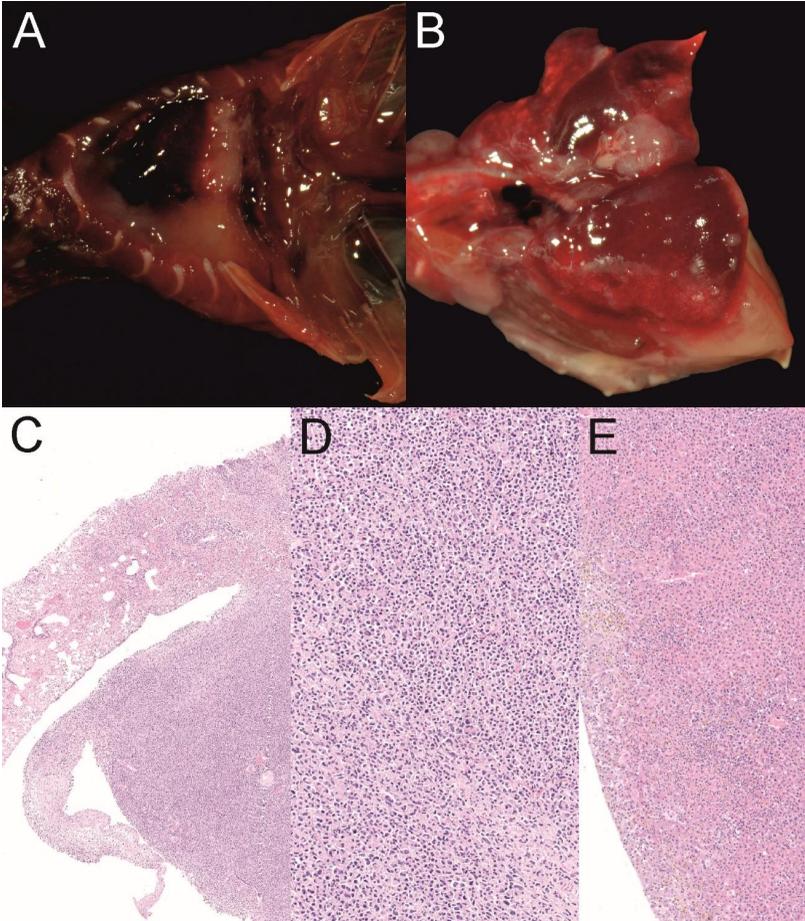
Tier	#31 S275/19
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	20.2.2019
Alter	1063 Tage
Vorbericht	Euthanasie zur Organentnahme / Aufgabe der Zucht
Gewicht	7 g
Ernährungszustand	gut
relevante Befunde	keine Auffälligkeiten

Tier	#32 S502/19
Geschlecht	männlich
Todesdatum	29.3.2019
Alter	719 Tage
Vorbericht	Euthanasie zur Organentnahme / Aufgabe der Zucht
Gewicht	9 g
Ernährungszustand	sehr gut
relevante Befunde	Alopezie am caudalen Nacken

Tier	#33 S503/19
Geschlecht	männlich
Todesdatum	29.3.2019
Alter	719 Tage
Vorbericht	Euthanasie zur Organentnahme / Aufgabe der Zucht
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	sehr gut
relevante Befunde	keine Auffälligkeiten

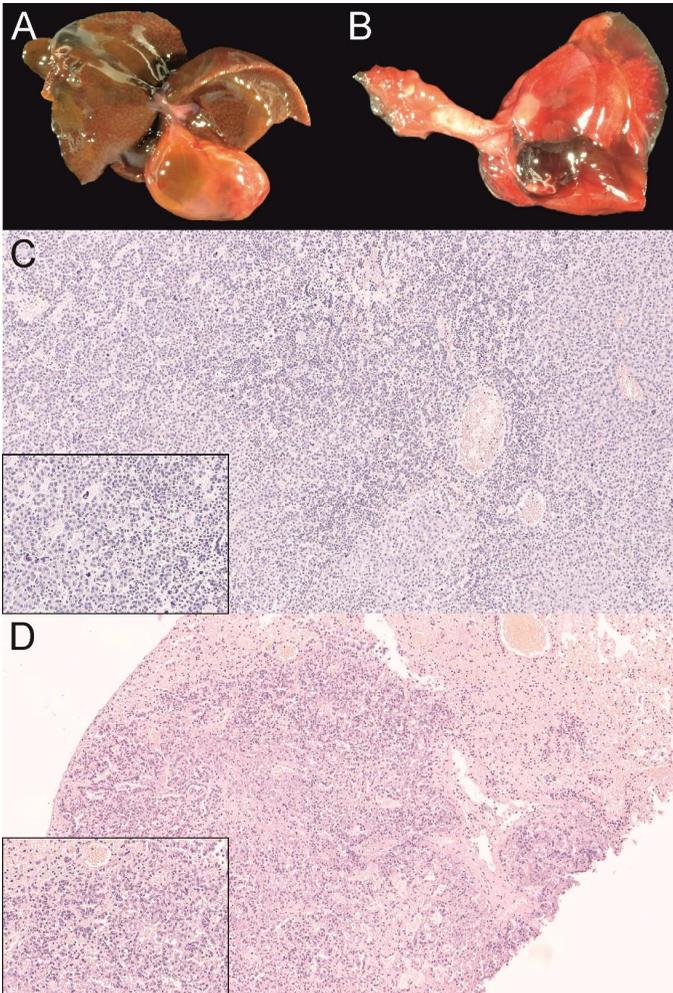
Tier	#34 S504/19
Geschlecht	weiblich
Todesdatum	29.3.2019
Alter	719 Tage
Vorbericht	Euthanasie zur Organentnahme / Aufgabe der Zucht
Gewicht	8 g
Ernährungszustand	sehr gut
relevante Befunde	Alopezie im Bereich des Rückens

Abbildung 16 – Rundzellentumor und eitrige Hepatitis bei Spitzmaus 1



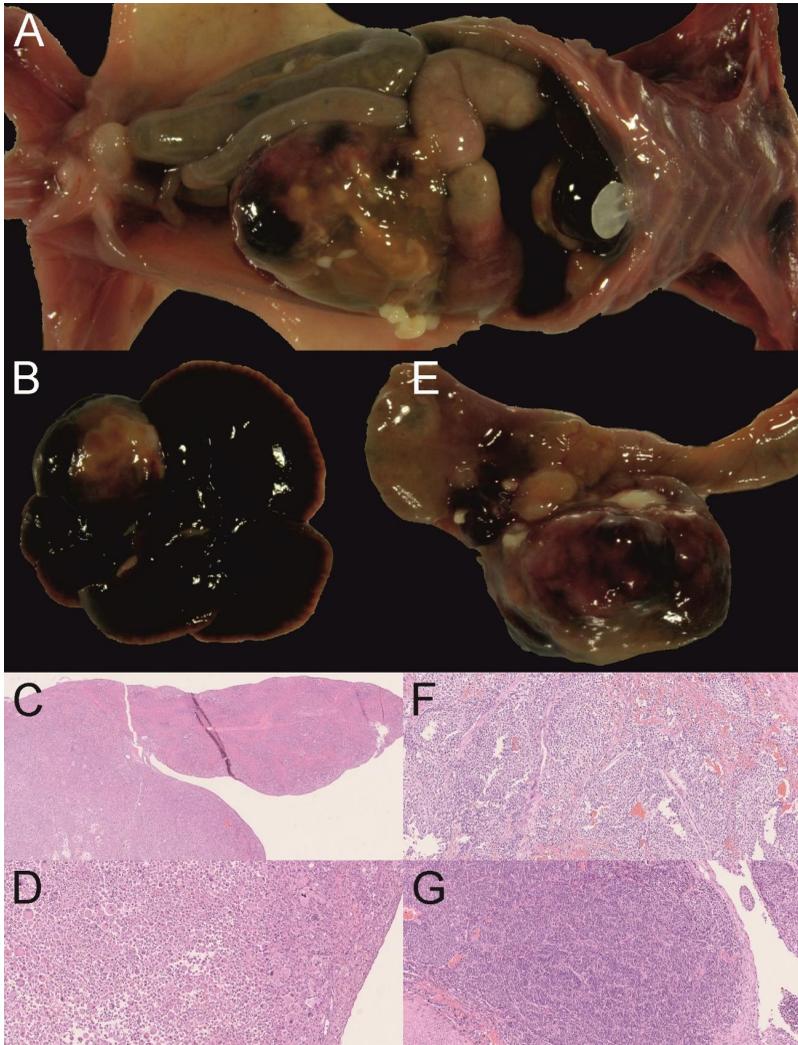
A und B) weiße speckige Neoplasie in Mediastinum und in der rechten Lunge
C und D) Lunge, maligne Neoplasie aus pleomorphen Rundzellen
E) Leber, eitrige Hepatitis mit multifokaler Infiltration von neutrophilen Granulozyten

Abbildung 17 – Leberadenom und Lungentumor bei Spitzmaus 2



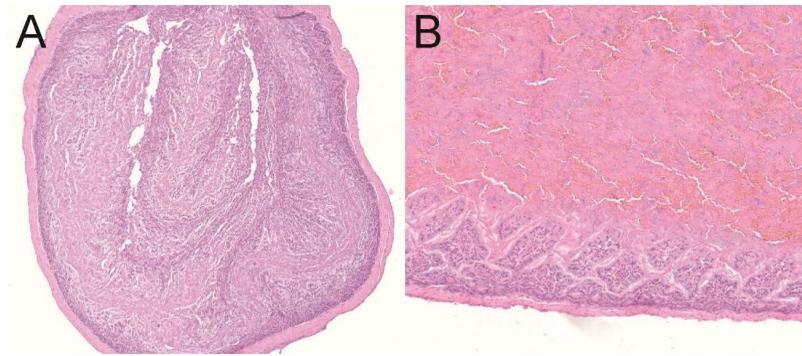
- A) Leber, weißbrauner Knoten am Leberhilus
- B) Lunge, kleiner weißer Knoten im linken Spitzenlappen
- C) Leber, Leberadenom
- D) Lunge, maligne Neoplasie aus epithelialen Zellen

Abbildung 18 – Lebertumor und Pankreastumor bei Spitzmaus 3



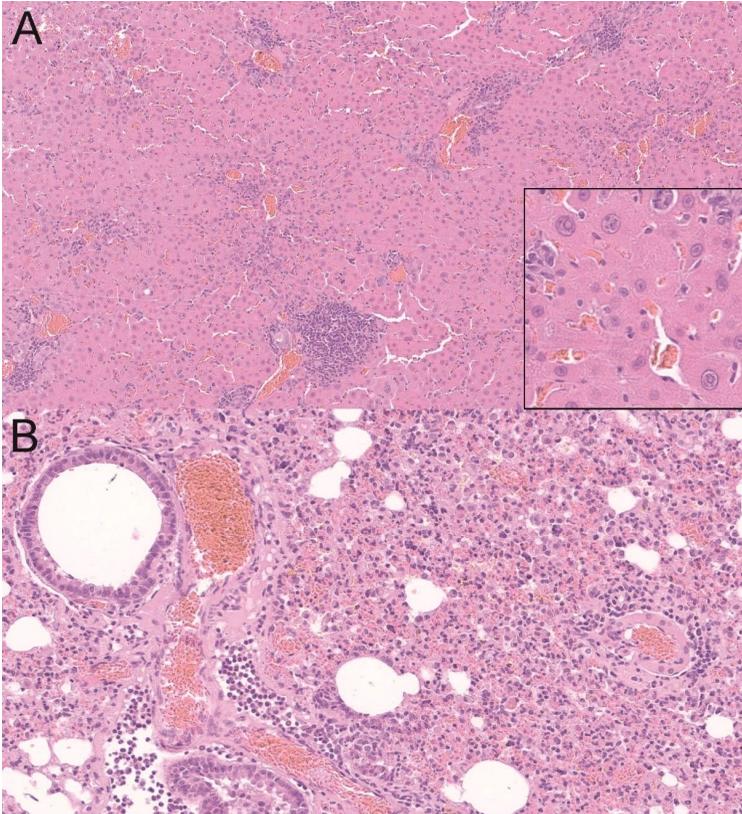
- A) Umfangsvermehrung im Bereich des Pankreas und Umfangsvermehrung in der Leber
- B) Leber, weißliche derbe Umfangsvermehrung
- C - D) Leber, maligne Neoplasie aus runden zytoplasmareichen Zellen mit deutlicher Anisozytose
- E) Magen und proximaler Abschnitt des Duodenums mit angrenzendem Pankreas, rot-braune Umfangsvermehrung
- F - G) Pankreas, Neoplasie aus in Inseln liegenden epithelialen Zellen

Abbildung 19 – Darminvagination bei Spitzmaus 5



- A) Dickdarm, Invagination mit sichtbaren Schleimhautschichten im Inneren des Darmlumens
B) Dickdarm, Invagination mit stärker geschädigten Schleimhautbereichen mit Nekrosen und blutigen Darminhalt (Bild der hämorrhagischen Infarzierung)

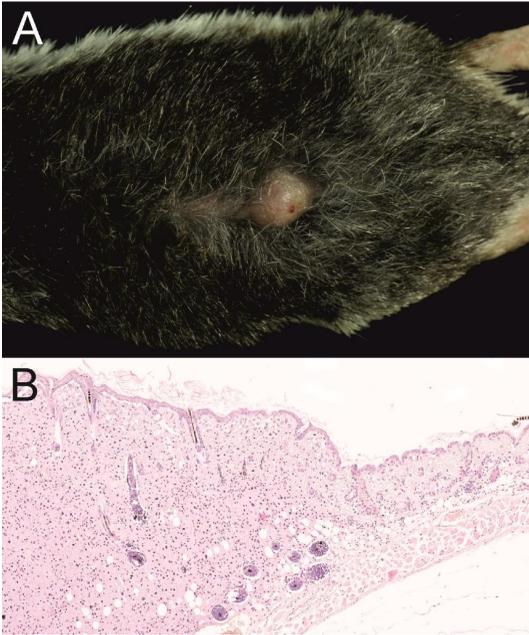
Abbildung 20 – Hepatitis und Pneumonie bei Spitzmaus 6



A) Leber, Hepatitis mit multifokalen nicht-eitrigen Infiltraten und eosinophilen Einschlüssen in Hepatozyten

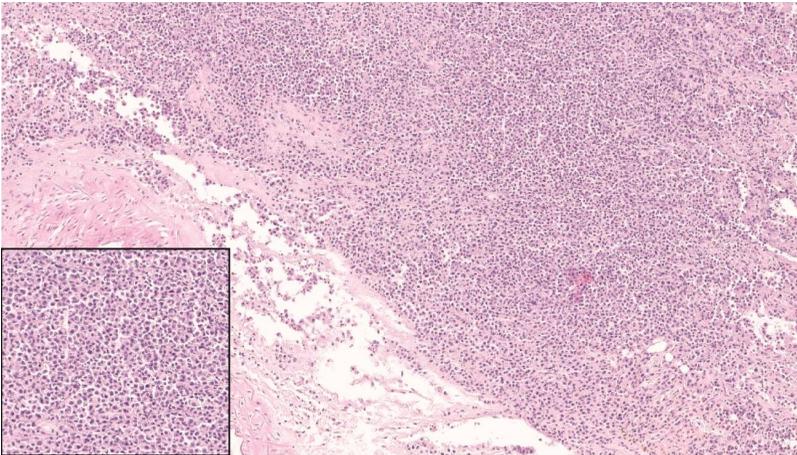
B) Lunge, Pneumonie mit intraalveolären neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen

Abbildung 21 – Hautknoten bei Spitzmaus 7



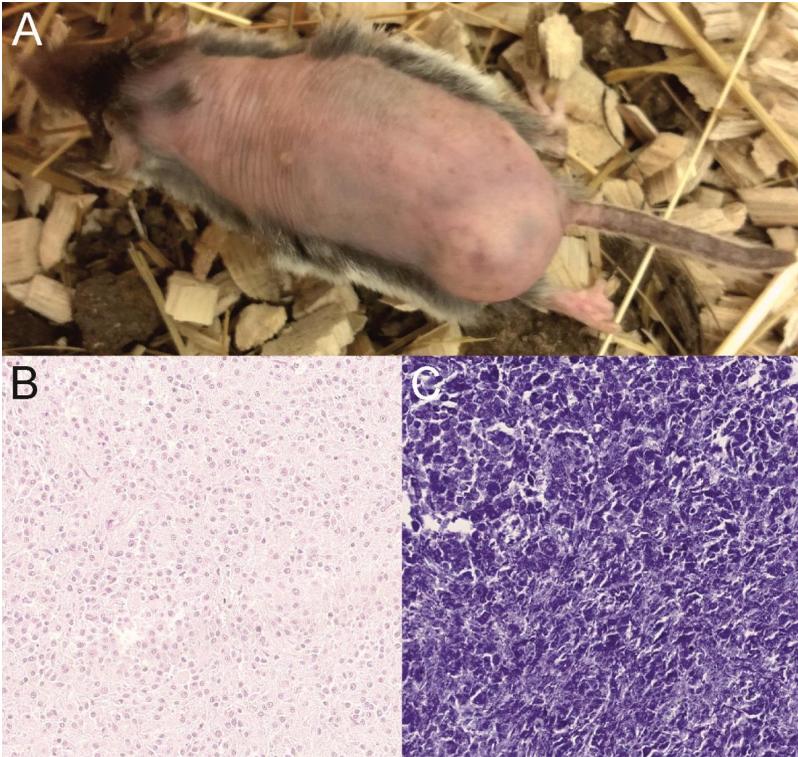
A und B) Haut, Fibropapillom

Abbildung 22 – Rundzellentumor im Thorax bei Spitzmaus 8



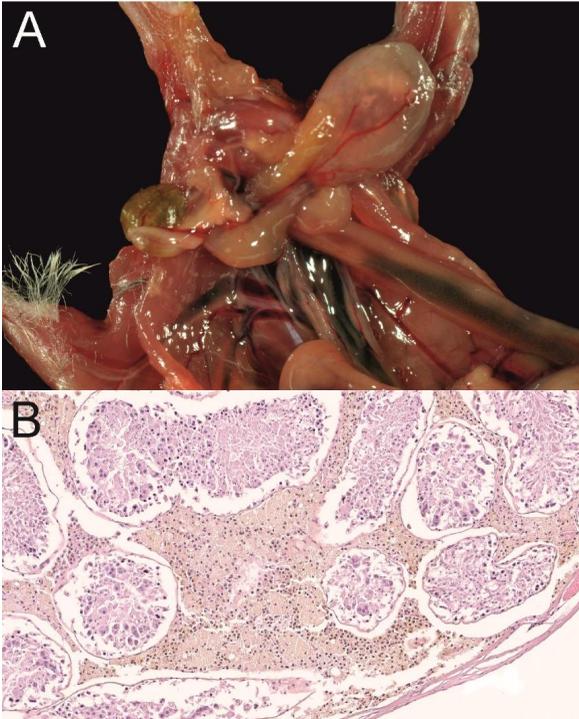
Maligner Rundzellentumor angrenzend an große thorakale Gefäße und an die Lunge

Abbildung 23 – Mastzelltumor an der linken Hintergliedmaße bei Spitzmaus 13



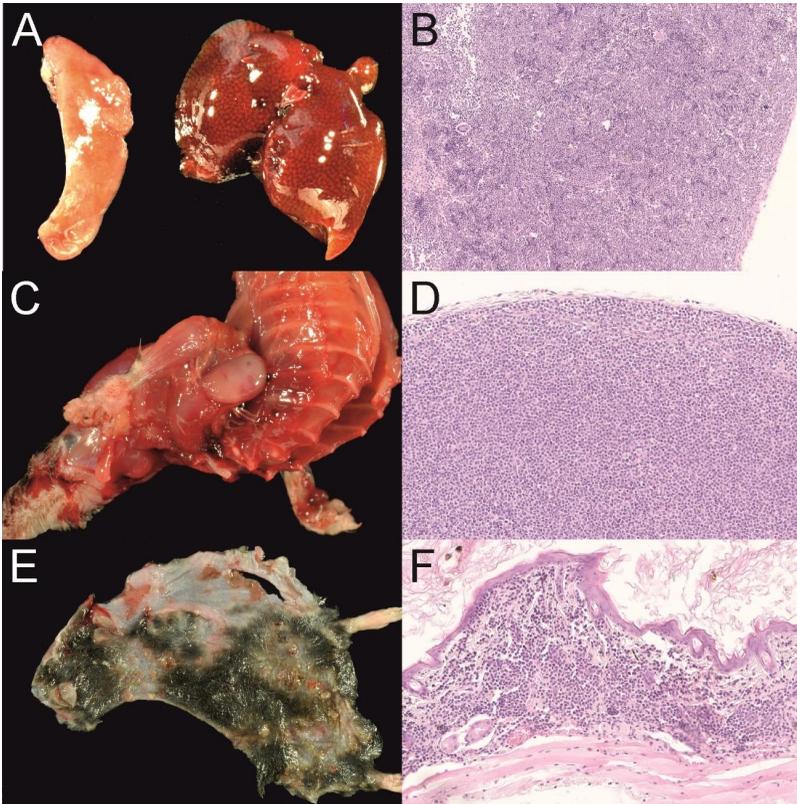
- A) Zustand vor der Entfernung des Tumors an der Hintergliedmaße
- B) Mastzelltumor
- C) Toluidinfärbung, Mastzelltumor mit metachromatischen Granula

Abbildung 24 – Hodentumor bei Spitzmaus 15



A und B) Hoden, Leydigzelltumor

Abbildung 25 – Lymphosarkom bei Spitzmaus 16



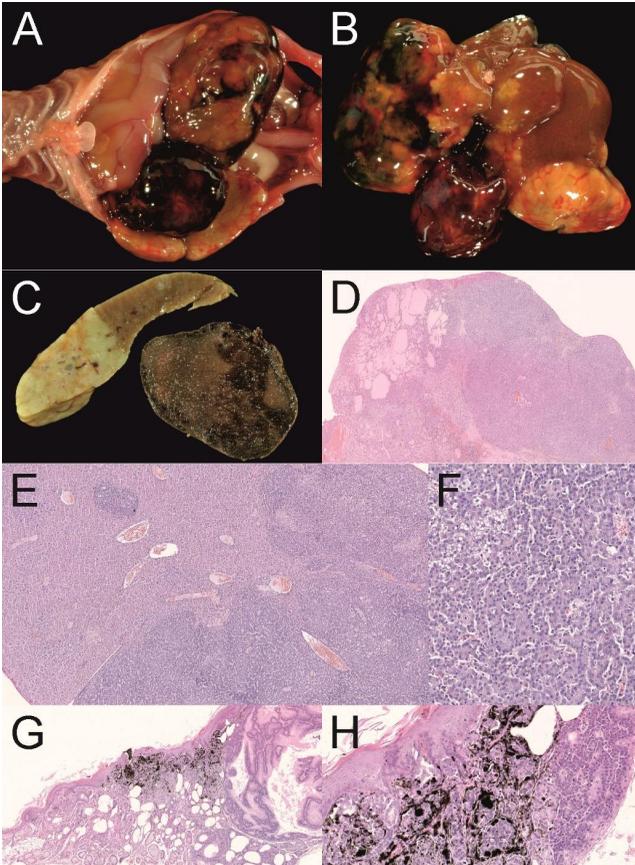
A und B) Milz und Leber, diffuse Infiltration der Milz und multifokale Infiltration der Leber mit Lymphosarkomzellen

C und D) Axillarylphknoten, Lymphosarkom

E und F) Haut, multifokale Ulzerationen infolge einer diffusen Infiltration eines epitheliotropen Lymphosarkoms

Tumorzellen stellten sich in der Immunhistologie CD3-positiv dar, dies deutet auf ein T-Zell-Lymphom hin

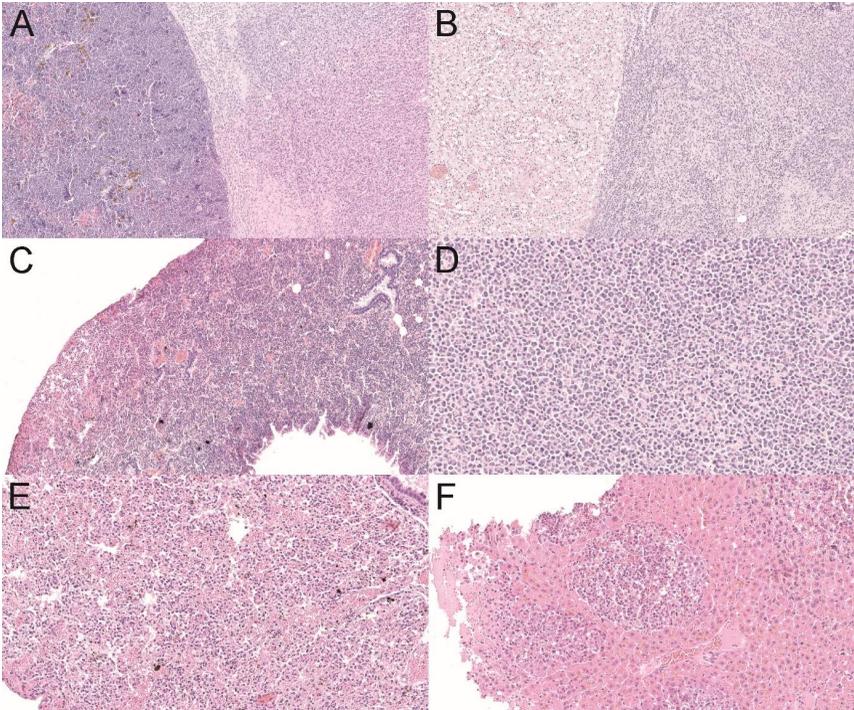
Abbildung 26 – Leberkarzinom und Basalzelltumor bei Spitzmaus 19



A – F) Leber, hepatozelluläres Karzinom (C Schnittflächen bei fixiertem Organ)

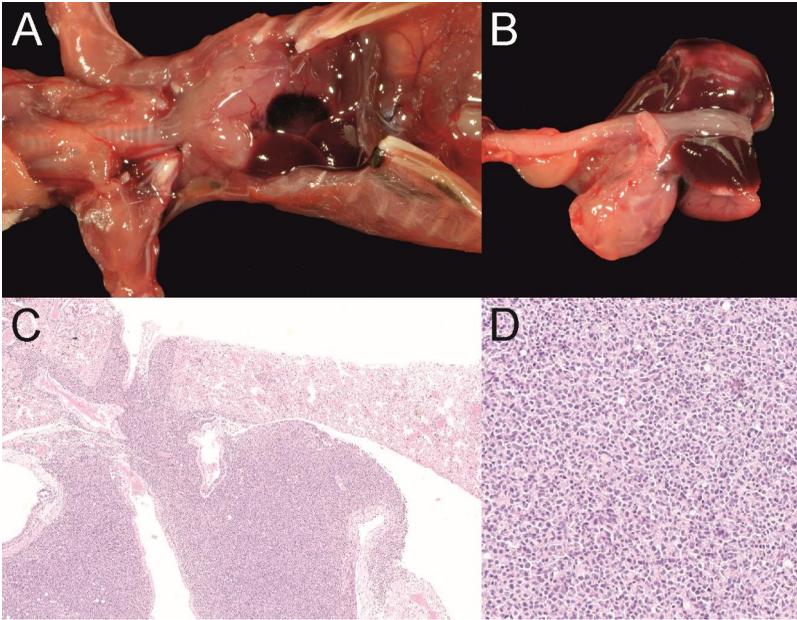
G – H) Haut, Basalzelltumor

Abbildung 27 – Rundzellentumor bei Spitzmaus 20



- A) Milz, maligne Neoplasie aus pleomorphen Rundzellen neben der Milz
- B) Niere, maligne Neoplasie aus pleomorphen Rundzellen neben der Niere
- C) Lunge, Infiltration von neoplastischen pleomorphen Rundzellen
- D) Bauchraum, maligne Neoplasie aus pleomorphen Rundzellen im Bauchraum
- E) Lunge, eitrige Pneumonie
- F) Leber, pyogranulomatöse Hepatitis mit kleinen Herden aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen

Abbildung 28 – Rundzellentumor im Mediastinum bei Spitzmaus 21

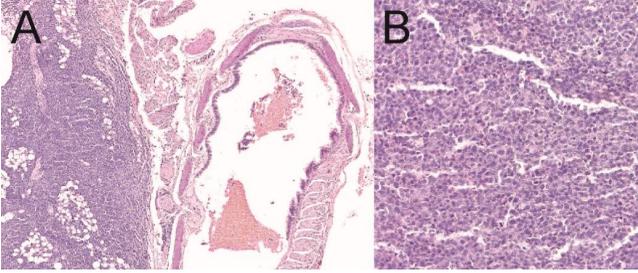


A und B) weißer speckiger Knoten am Brusteingang

C) Lunge, maligner Rundzellentumor am Lungenhilus in der Nähe der Trachea

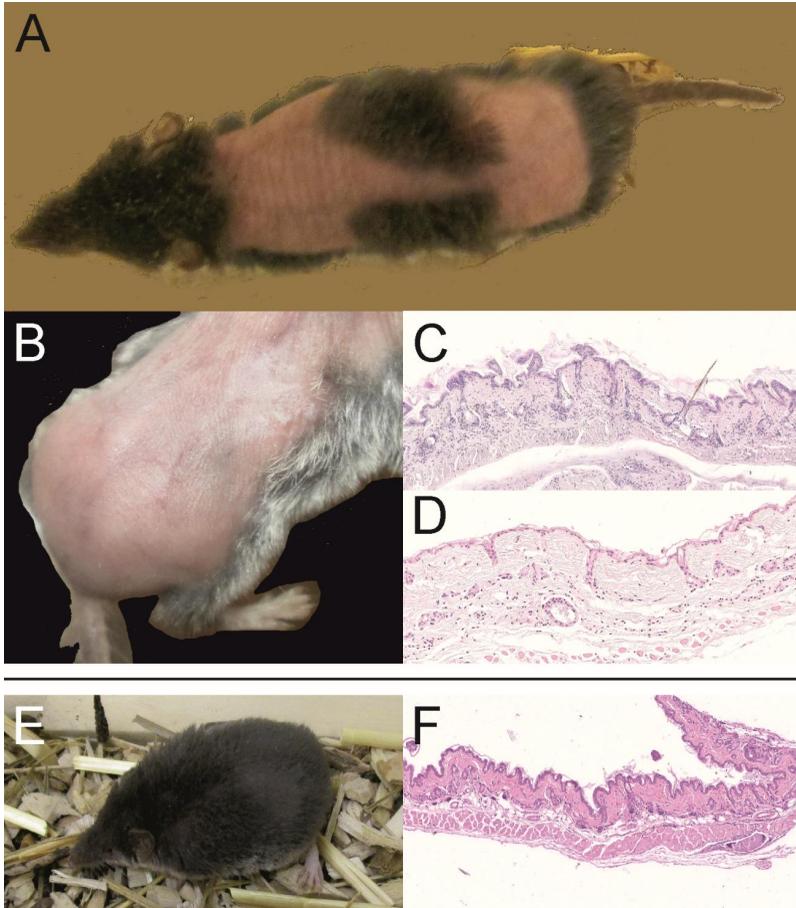
D) Lunge, maligner Rundzellentumor

Abbildung 29 – Rundzellentumor im Mediastinum bei Spitzmaus 23



A und B) Mediastinum, maligner Rundzellentumor aus pleomorphen Rundzellen

Abbildung 30 – Alopezie im Bereich des Rückens



- A) #2, symmetrische Alopezie im Bereich des Rückens
B) #12, vollständige Alopezie im Bereich des caudalen Rückens
C) #2, Haut, vereinzelte nicht-eitrige Infiltrate und deutliche orthokeratotische Hyperkeratose
D) #12, Haut, moderate orthokeratotische Hyperkeratose
E) Vergleichstier #22, keine Alopezie
F) Vergleichstier #5, keine Alopezie, moderate orthokeratotische Hyperkeratose

Eigenanteil

Nachweis der Eigenleistung von Daniel Nobach bei den zwei Veröffentlichungen sowie einem vorbereiteten unveröffentlichten Manuskript für die kumulative Dissertation

Artikel 1: **Daniel Nobach**, Manon Bourg, Sibylle Herzog, Hildburg Lange-Herbst, Jorge A Encarnaçã, Markus Eickmann, Christiane Herden

Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews

PloS ONE 10(8): e0137018.doi:10.1371/journal.pone.0137018

Artikel 2: **Daniel Nobach**, Christiane Herden

No evidence for European bats serving as reservoir for Borna disease virus 1 or other known mammalian orthobornaviruses

Virology Journal (2020) 17:11

Artikel 3 (unveröffentlicht): **Daniel Nobach**, Manon Bourg, Guido Schemken, Sibylle Herzog, Jorge A Encarnaçã, Markus Eickmann, Christiane Herden

Establishing a husbandry of the bicolored white-toothed shrew (*Crocidura leucodon*)

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

Daniel Nobach war in die komplette Planung der Studien einbezogen. Er übernahm die Kommunikation mit den Kooperationspartnern von anderen Universitäten und öffentlichen Instituten und war beteiligt beim Genehmigungsprozess zur Entnahme von Wildtieren zur wissenschaftlichen Forschung. Er organisierte eigenverantwortlich die Durchführung der Wildfänge einschließlich Dokumentation, Standortsuche, Kommunikation mit den Besitzern der Flächen, auf denen Fänge durchgeführt wurden, Fallenaufbau und Kontrolle, Tierartbestimmung und Überprüfung der Transportfähigkeit und Transport zu Haltung. Er war an der Konzeption und Anpassung der Haltung beteiligt, die in Zusammenarbeit mit dem Team der Tierexperimentellen Einrichtung der Philipps-Universität Marburg entwickelt wurde, sowie an der Organisation der Zucht. Außerdem übernahm er die Planung der verschiedenen Untersuchungen.

Daniel Nobach übernahm die Probenahme bei den Spitzmäusen sowie die dazugehörige Probenaufbereitung, die RNA-Isolation der Virusisolate, die Organisation der Sequenzierung mit phylogenetischer Analyse und die Etablierung und Durchführung der RT-PCR zur Analyse von Fledermäusen. Die Beurteilung der histologischen Schnitte mittels Lichtmikroskopie sowie der immunhistologischen Schnitte der Fledermäuse mittels dem Antikörper p24 sowie die komplette immunhistologische Untersuchung der Fledermäuse mit zusätzlichen Antikörpern und deren Interpretation gehörten zu seinen Aufgaben. Er war beteiligt an der Anfertigung und Auswertung der Immunhistologie und in-situ-Hybridisierung der Vergleichsspitzmäuse sowie der Beurteilung und klinischen Untersuchung der lebenden Feldspitzmäuse inklusive Wiegen der Tiere und Messung der Futteraufnahme. Er führte die postmortale Untersuchung gestorbener Feldspitzmäuse durch mit Sektion und anschließender Beurteilung von histologischen Schnitten mittels Lichtmikroskopie sowie die Dokumentation der erhobenen Befunde.

Daniel Nobach war für die Planung, Interpretation, Diskussion und Niederschrift der erzielten Ergebnisse unter Supervision von Frau Prof. Herden verantwortlich, die er in zwei wissenschaftlichen Artikeln in Fachzeitschriften mit Peer-Review-Prozess veröffentlichte. Er 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 er die fertigen Manuskripte zusammen. Daniel Nobach reichte beide Artikel eigenständig ein und war für die Revision mit den schriftlichen Stellungnahmen zuständig.

Er bereitete unter Supervision von Frau Prof. Herden das unveröffentlichte Manuskript zur Haltung der Feldspitzmäuse vor, mit Interpretation der Daten, allen Tabellen und Abbildungen sowie der Diskussion nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft, und überarbeitete das Manuskript nach dem Feedback der Ko-Autoren.

Folgende Untersuchungen wurden von Kollegen durchgeführt:

Virusisolation, RNA-Isolation und RT-qPCR der Tupfer, Immunhistologie, Statische Analyse, Organisation der Proben von Fledermäusen, Organisation der täglichen Pflege der Feldspitzmäuse in der Haltung

Veröffentlichungen

Als Erst-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

*Nobach D, Herden C (2020) No evidence for European bats serving as reservoir for Borna disease virus 1 or other known mammalian orthobornaviruses
Virologica 2020; 17(1):11

Review

Nobach D, Müller J, Tappe D, Herden C (2020) Update on immunopathology of bornavirus infections in humans and animals (Review)
Adv Virus Res; 107:59-222

Veröffentlichungen von Kongressbeiträgen

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, H. Lange-Herbst, J. Encarnação, M. Eickmann, C. Herden
Natürliche Borna Disease Virus-Infektion im Reservoirwirt *Crocidura leucodon*
(Vortrag, 57. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, März 2014, Abstract veröffentlicht in Tierärztl Praxis (G) 2014 42 2: A7)

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, H. Lange-Herbst, J.A. Encarnação, M. Eickmann, C. Herden
Shedding of infectious Borna disease virus in living bicolored white-toothed shrews
(Vortrag, 2nd joint European Congress of the ESVP, ECVP and ESTP, Berlin, August 2014, Abstract veröffentlicht in J Comp Path, 152 (1), Jan 2015, p. 52)

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, J.A. Encarnação, G. Schemken, M. Eickmann, C. Herden
Haltung von Insektivoren als neue Tiermodelle
(Poster, 58. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, März 2015, Abstract veröffentlicht in Tierärztl Praxis (K) 2015 43 3: A27)

D. Nobach, J. Wennemuth, F. Schmied, K. Köhler, K. Siudak
Ungewöhnlicher Nierentumor bei einem Meerschweinchen
(Poster, 59. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, März 2016, Abstract veröffentlicht in Tierärztl Praxis (K) 2016 44 3: A33-A39)

D. Nobach, N. Schmidt, E. Prenger-Berninghoff, C. Ewers, M. Henrich
Endokarditis valvularis mit Nachweis von *Erysipelothrix rhusiopathiae* bei einem Elch
(Poster, 60. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, März 2017, Abstract veröffentlicht in Tierärztl Praxis (G) 2017 45(3):A5-A13)

#D. Nobach, C. Herden

Tumoren bei der Feldspitzmaus

(Poster, 61. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, März 2018, Abstract veröffentlicht in Tierärztl Praxis (G) 2018 46(3):A1-A9)

D. Nobach, K. Schlottau, D. Hoffmann, M. Beer, C. Herden

Histological lesions and virus detection in rats, bank voles and mice experimentally infected with variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1)

(Poster, Joint Congress of Veterinary Pathology and Veterinary Clinical Pathology (ECVP/ECVCP Congress), Arnhem, September 2019, Abstract veröffentlicht in J Comp Path, 174, Jan 2020, p. 155))

D. Nobach, L. Raeder, S. Herzog, M. Eickmann, C. Herden

Die Hausspitzmaus als TierversuchsmodeLL für Reservoirwirte von BoDV-1

(Poster, 64. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Onlinekonferenz, März 2021, Abstract accepted Tierärztl Praxis)

Weitere Kongressbeiträge

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, H. Lange-Herbst, J.A. EncarnaçãO, M. Eickmann, C. Herden

Investigation on living, natural Borna disease virus -infected bicolored white-toothed shrews

(Vortrag, 88th Annual Meeting of the German Society for Mammalian Biology, Giessen, September 2014)

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, H. Lange-Herbst, J.A. EncarnaçãO, M. Eickmann, C. Herden

Various ways of shedding of Borna Disease Virus in living bicolored white-toothed shrews

(Vortrag, Joint Conference: German Symposium on Zoonoses Research 2014 and 7th International Conference on Emerging Zoonoses, Berlin, Oktober 2014)

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, J.A. EncarnaçãO, Guido Schemken, M. Eickmann, C. Herden

Husbandry of insectivores as new animal model

(Poster, National Symposium on Zoonoses Research 2015, Berlin, Okt 2015)

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, H. Lange-Herbst, J. EncarnaçãO, M. Eickmann, C. Herden

Borna disease virus-1 infection in living bicolored white-toothed shrews

(Vortrag, Workshop „Alternative Kleinsäuger-Tierversuchsmodelle“, Insel Riems, Jan 2016)

#D. Nobach, B. Hoffmann, C. Kohl, G. Wibbelt, J.A. EncarnaçãO, C. Herden

No evidence of bats as reservoir of Bornaviridae in germany

(Poster, National Symposium on Zoonoses Research 2016, Berlin, Okt 2016)

#D. Nobach, M. Bourg, S. Herzog, J.A. EncarnaçãO, H. Lange-Herbst, M. Eickmann, C. Herden

Bornavirus in KleinsäuGern in Bayern – Die Feldspitzmaus als Reservoir

(Vortrag, 5. Workshop des Netzwerks „Nagetier-übertragene Pathogene“, Giessen, Nov 2016)

D. Nobach, J. Müller, S. Herzog, M. Eickmann, C. Herden

Endogenous Borna-like N Elements in shrews

(Vortrag, National Symposium on Zoonoses Research 2017, Berlin, Okt 2017)

D. Nobach, J. Müller, S. Herzog, M. Eickmann, C. Herden

Borna Disease Virus-1 infection and Borna-like DNA-elements in *Crociodura leucodon*

(Poster, 28. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2018, März 2018)

D. Nobach, C. Herden

Effect of duration of formalin fixation on RNA quality

(Poster, National Symposium on Zoonoses Research 2018, Berlin, Okt 2018)

#D. Nobach

(Überraschende) Funde bei der Sektion von Spitzmäusen

(Vortrag, 6. Workshop des Netzwerks „Nagetier-übertragene Pathogene“, Berlin, Nov 2018)

D. Nobach, K. Schlottau, D. Hoffmann, M. Beer, C. Herden

Histological lesions and virus detection in rats, bank voles and mice infected with variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1)

(Poster, National Symposium on Zoonoses Research 2019, Berlin, Okt 2019)

D. Nobach, L. Raeder, S. Herzog, M. Eickmann, C. Herden

Reservoir hosts of Borna Disease Virus-1 – Experimental infection of shrews

(Poster, 28. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2021, März 2021)

Als Co-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

Emerg Infect Dis (2013) DOI: 10.3201/eid1912.131076

Bourg M, Nobach D, Herzog S, Lange-Herbst H, Nessler A, Hamann H-P, Becker S, Höper D,

Hoffmann B, Eickmann M, Herden C (2016) Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis

Virologia 2016; 13(1):151

Pretzold J, van den Brand JMA, Nobach D, Hoffmann B, Hoffmann D, Fast C, Reusken CBEM, van Run

PRWA, Schlottau K, Beer M, Herden C (2019) Distribution of zoonotic variegated squirrel bornavirus 1 in naturally infected variegated and Prevost's squirrels

Sci Rep 2019; 9(1):11402

Boos GS, Nobach D, Failing K, Eickmann M, Herden C (2019) Optimization of RNA extraction protocol

for long-term archived formalin-fixed paraffin-embedded tissues of horses

Exp Mol Pathol 2019; 110:104289

Niller HH, Angstwurm K, Rubbenstroth D, Schlottau K, Ebinger A, Giese S, Wunderlich S, Banas B,

Forth LF, Hoffmann D, Höper D, Schwemmle M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Nobach D, Herden C,

Brochhausen C, Velez-Char N, Mamilos A, Utpatel K, Evert M, Zoubaa S, Riemenschneider MJ, Ruf V,

Herms J, Rieder G, Errath M, Matiassek K, Schlegel J, Liesche-Starnecker F, Neumann B, Fuchs K, Linker

RA, Salzberger B, Freilinger T, Gartner L, Wenzel JJ, Reischl U, Jilg W, Gessner A, Jantsch J, Beer M,

Schmidt B. (2020) Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999-2019: an epidemiological investigation
Lancet Infect Dis. 2020 20(4):467-477

Schlottau K, Nobach D, Herden C, Finke S, Beer M, Hoffmann D (2020) First isolation, in-vivo and genomic characterization of zoonotic variegated squirrel Bornavirus 1 (VSBV-1) isolates
Emerg Microbes Infect 2020; 9(1)2474-2484

Rasche A, Lehmann F, Goldmann N, Nagel M, Moreira-Soto A, Nobach D, de Oliveira carneiro I, Osterrieder N, Greenwood AD, Steinmann E, Lukashev AN, Schuler G, Glebe D, Drexler JF; Equid HBV Consortium (2021) A hepatitis B virus causes chronic infections in equids worldwide
Proc Natl Acad Sci U S A 2021; 118(13):e2013982118

Veröffentlichungen von Kongressbeiträgen

M. Bourg, S. Herzog, M. Eickmann, D. Nobach, J.A. Encarnação, C. Herden
Nachweis von Borna disease virus in Feldspitzmäusen (*Crocidura leucodon*) in Bayern
(Vortrag, 56. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, März 2013, Abstract veröffentlicht in Tierärztl Praxis (G) 2013 41 3: A1-A7)

M. Bourg, S. Herzog, D. Nobach, H. Lange-Herbst, M. Eickmann, C. Herden
Bornavirus-Infektionen beim Rotfuchs?
(Poster, 58. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, März 2015, Abstract veröffentlicht in Tierärztl Praxis (K) 2015 43 3: A25)

C. Herden, J. Petzold, D. Nobach, C. Fast, B. Hoffmann, D. Hoffmann, K. Schlottau, J. P. Teifke, R. G. Ulrich, M. Beer
Organ distribution of the novel zoonotic variegated squirrel 1 bornavirus in naturally infected squirrels
(Vortrag, Annual Meeting of ESVP and ECVP, Bologna, Sept 2016, Abstract veröffentlicht in J Comp Path, 156 (1), Jan 2017, p.57)

J. Müller, D. Nobach, C. Herden
3R -> 3D Hautmodell zur Studie von Virusinfektionen
(Poster, 64. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Onlinekonferenz, März 2021, Abstract accepted Tierärztl Praxis)

Weitere Kongressbeiträge

M. Bourg, S. Herzog, R. G. Ulrich, D. Nobach, J.A. Encarnação, M. Eickmann, C. Herden
Bicoloured white-toothed shrews (*Crocidura leucodon*) as reservoir for Borna disease virus in Bavaria
(Vortrag, National Symposium on Zoonoses Research 2013, Berlin, September 2013)

M. Bourg, S. Herzog, R. G. Ulrich, D. Nobach, J.A. Encarnação, M. Eickmann, C. Herden
The role of small mammals especially bicoloured white-toothed shrews as reservoir for Borna disease virus in Bavaria, Germany
(Vortrag, 88th Annual Meeting of the German Society for Mammalian Biology, Giessen, September 2014)

C. Herden, D. Nobach*, J. Petzold* (*gleichberechtigte Autoren), C. Fast, B. Hoffmann, D. Tappe, D. Höper, J.P. Teifke, J. Schmidt-Chanasit, R.G. Ulrich, M. Beer
Viral antigen distribution of Variegated Squirrel Bornavirus-1 in organs of naturally infected squirrels
(Poster, 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2016, Münster, April 2016)

J. Petzold, D. Nobach, J. Petzold, B. Hoffmann, C. Fast, K. Schlottau, D. Tappe, D. Höper, J.P. Teifke, R.G. Ulrich, M. Beer, C. Herden
Small mammals as virus reservoirs – distribution of bornavirus antigen in organs of naturally infected squirrels and shrews
(Poster, National Symposium on Zoonoses Research 2016, Berlin, Okt 2016)

J. Müller, D. Nobach, C. Herden
3D-Hautmodell zur Studie von Eintrittspforten und Ausscheidung bei Virusinfektionen
(Poster, ICAR3R-Symposium, Gießen, Sept 2020)

A. Ebinger, D. Lehnau, R. Dürrwald, V. Haring, K. Schlottau, D. Nobach, V. Ruf, F. Liesche-Starneker, J. Fürstenau, F. Hansmann, T. Seuberlich, V. Schulze, B. Hoffmann, F. J. Conraths, R. G. Ulrich, M. Beer, D. Höper, D. Rubbenstroth
Identification of potential risk areas for zoonotic Borna disease virus 1 (BoDV-1) infection by large-scale phylogeographic analysis
(Poster, 28. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2021, März 2021)

V. Haring, K. Schlottau, V. Schulze, D. Nobach, A. Ebinger, B. Hoffmann, D. Hoffmann, M. Bauswein, B. Schmidt, H. H. Niller, S. Modrow, K. Weber, K. Hartmann, G. Buhmann, S. Nippert, D. Höper, P. Koch, C. Imholt, J. Jacob, K. Pörtner, C. Frank, C. Herden, M. Beer, D. Rubbenstroth, R. G. Ulrich
Large-scale screening of small mammals for exploring the BoDV-1 reservoir
(Poster, 28. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2021, März 2021)

*Diese Artikel wurden für die vorliegende Dissertation verwendet

#Ein Teil dieses Artikels wurde für die Dissertation verwendet oder Teile der Dissertation wurden hier vorgestellt.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Christiane Herden für die Überlassung des Themas und die Betreuung im Verlaufe der Arbeit.

Ich danke Dr. Sibylle Herzog und Dr. Markus Eickmann für die gute und angenehme Zusammenarbeit. Beide haben durch ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Forschungsarbeit beigetragen und die Qualität erhöht.

Guido Schemken und den Marburgern Tierpflegern danke ich für die gute Pflege der Spitzmäuse und die gemeinsame Etablierung der Haltung. Prof. Dr. Jorge Encarnação und seinen Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung beim Tierfang sowie die fachliche Betreuung bei der Fledermausbestimmung.

Ich danke Dr. Werner Hecht für die guten Ratschläge aller Art im Laboralltag und für das gute Beispiel, an Probleme heranzugehen.

Ich danke meiner Kollegin Dr. Manon Bourg für die gemeinsame Arbeit am Spitzmausprojekt, bei dem wir uns immer gegenseitig auf Hilfe und Unterstützung verlassen konnten.

Weiter danke ich allen anderen Kollegen im Institut, mit denen ich die pathologischen und wissenschaftlichen Herausforderungen in den letzten Jahren meistern durfte, unter anderem meinen Büronachbarn Sara Malberg und Ann-Kathrin Onkels und den weiteren Reservoirforschern Jana Petzold, Jana Müller, Leif Raeder und Janina Müller. Sie und alle anderen machen die Zeit der Doktorarbeit unvergesslich. Besonderer Dank geht auch an die Kollegen, die durch das Anfertigen von Schnitten oder das Isolieren von RNA bei der täglichen Arbeit helfen, insbesondere Silke Engel, Karina Hochheim, Silke Gantz, Alex Luh und Sabine Wack.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie und meiner Freundin für die jahrelange Unterstützung und den Glauben an mich.



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: 978-3-8359-6998-8



9 783835 196998

Photo front cover: © CreativeNature_nl @ iStockPhoto.com
Photo back cover: © Author