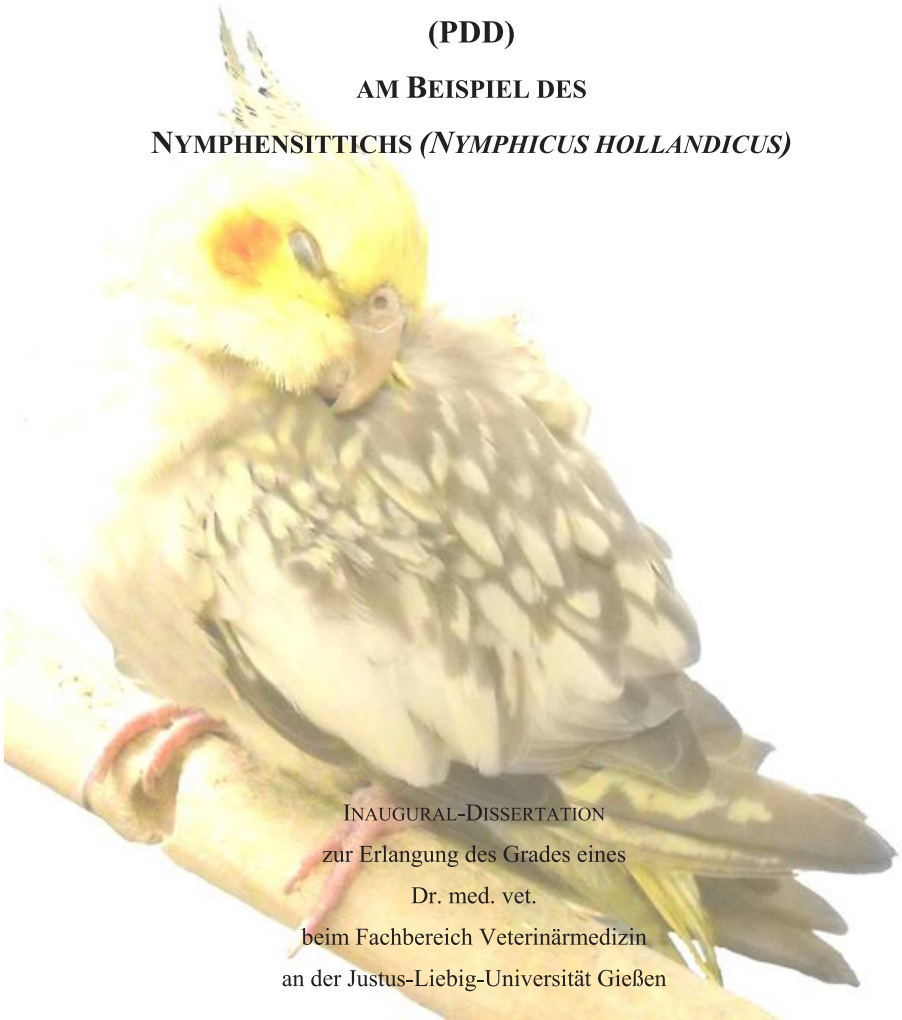


**UNTERSUCHUNGEN ZU KAUSALITÄT UND PATHOGENITÄT
VON ZWEI VERSCHIEDENEN ISOLATEN
DES *PSITTACIFORM 1 BORNAVIRUS*
ALS URSACHE DER PSITTAZINEN DRÜSEN-
MAGENDILATATION
(PDD)
AM BEISPIEL DES
NYMPHENSITTICHS (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*)**



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

ANNE KATRIN PIEPENBRING

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

1. Auflage 2017

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

ISBN 978-3-86345-364-0

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

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

Betreuer: Prof. Dr. M. Lierz

**Untersuchungen zu Kausalität und Pathogenität
von zwei verschiedenen Isolaten
des *Psittaciform 1 bornavirus*
als Ursache der Psittazinen Drüsenmagendilatation (PDD)
am Beispiel des
*Nymphensittichs (Nymphicus hollandicus)***

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

Eingereicht von
Anne Katrin Piepenbring
Tierärztin aus Köln

Gießen 2017

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

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

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lierz

Prof. Dr. Friedemann Weber

Tag der Disputation: 21. Februar 2017

Diese Arbeit wurde finanziell gefördert durch die **Loro Parque Fundación**, Teneriffa, Spanien (Project ID: PP-65-2009-1) und den Verein zur Erhaltung Bedrohter Papageien e.V. (ACTP), Schöneiche.

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab als Vortrag auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt und in *peer reviewed journals* publiziert:

PIEPENBRING, A.K.; ENDERLEIN, D.; HERZOG, S., AL-IBADI, B.; HEFFELS-REDMANN, U.; HECKMANN, J.; LANGE-HERBST, H.; HERDEN, C.; LIERZ, M. (2016): PaBV-2 isolate causes different disease patterns in cockatiels than PaBV-4. *Avian Pathology* 2016, April, 45(2):156-68.

PIEPENBRING, A.K.; ENDERLEIN, D.; HERZOG, S.; KALETA, E.F.; HEFFELS-REDMANN, U.; RESSMEYER, S.; HERDEN, C.; LIERZ, M. (2012): Pathogenesis of Avian Bornavirus in Experimentally Infected Cockatiels. *Emerging Infectious Diseases* 18(2):234-41.

PIEPENBRING, A.; HERZOG, S.; HERDEN, C.; HEFFELS-REDMANN, U.; RESSMEYER, S.; KALETA, E.F.; ENDERLEIN, D.; LIERZ M. (2011): Pathogenesis of avian Bornavirus (ABV) in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*)*. *Proceedings of the 11th European Association of Avian Veterinarians Conference Madrid, Spanien:* 211-212.

***Ausgezeichnet mit dem Helga Gerlach Student Session Award, First Prize**

PIEPENBRING, A.; ENDERLEIN, D.; HEFFELS-REDMANN, U.; HERZOG, S.; KALETA, E.F.; HERDEN, C.; LIERZ M. (2011): Experimentelle Infektion von Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) mit aviärem Bornavirus (ABV). *Proceedings der 2. DVG-Vogel- und Reptilientagung, Hannover:* 76-79.

PIEPENBRING, A.K.; HERZOG, S.; ENDERLEIN, D.; KALETA, E.F.; HEFFELS-REDMANN, U.; RESSMEYER, S.; LIERZ, M.; HERDEN, C. (2012): Experimental Avian Bornavirus (ABV) Infection of Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). 22nd Annual conference of the Society for Virology, Essen. Poster

LIERZ, M.; **PIEPENBRING, A.**; HEFFELS-REDMANN, U.; HERZOG, S.; HERDEN, C.;
ENDERLEIN, D. (2012), Pathogenese der aviären Bornavirus-Infektion: Experimentelle
Studien an Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) mit verschiedenen ABV-
Isolaten. Proceedings der 17. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, München: 142-
146.

LIERZ, M.; HERDEN, C.; HERZOG, S.; **PIEPENBRING, A.** (2010): Die neuropathische
Drüsenmagendilatation der Psittaziden und das aviäre Bornavirus als potentielle
Ursache. Tierärztliche Praxis (K). 2010;38:87–94.

HERZOG, S.; ENDERLEIN, D.; HEFFELS-REDMANN, U.; **PIEPENBRING, A.**; NEUMANN, D.;
KALETA, E.F.; MÜLLER, H.; LIERZ, M.; HERDEN, C. (2010): Indirect
immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian bornavirus infection in
psittacine birds. Journal of Clinical Microbiology **48**(6):2282-4.

Enderlein, D.; Heffels-Redmann, U.; Kaleta, E.F.; Müller, H; Herzog, S.; Herden, C.;
Piepenbring, A.; Neumann, D.; Lierz, M. (2010): Neue Erkenntnisse zur Rolle des
aviären Bornavirus bei der Drüsenmagenerweiterung der Psittaziden. Proceedings der
16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, München: 15-20.

FÜR MEINE FAMILIE UND SEBASTIAN

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Die Psittazine Drüsenmagendilatation (PDD)	3
2.1.1	Pathogenese	3
2.1.2	Klinische Symptome.....	4
2.1.3	Diagnose	5
2.1.4	Differentialdiagnosen.....	7
2.1.5	Therapie	7
2.1.6	Ätiologie	8
2.2	Bornaviridae.....	9
2.2.1	Taxonomische Neuorganisation der <i>Bornaviridae</i>	9
2.2.2	Bornavirus der Säugetiere (<i>Mammalian 1 bornavirus</i>)	10
2.2.3	Aviäre Bornaviren.....	13
2.2.3.1	Kausalität der PDD durch eine Infektion mit aviären Bornaviren.....	18
2.2.3.2	Nachweis einer Infektion mit aviären Bornaviren	19
2.2.3.3	Übertragungsweg und Pathogenese	22
3	Material und Methoden.....	28
3.1	Versuchsaufbau.....	28
3.1.1	Versuchstiere	28
3.1.2	Haltung in Isolatoren	29
3.2	Versuchsablauf.....	30
3.2.1	Infektionsrouten	30
3.2.2	Statistische Berechnung der benötigten Versuchstierzahl	31
3.2.3	Versuche	32
3.2.4	Kontrollgruppe.....	36
3.3	PaBV-Isolate	36
3.3.1	Herkunft der PaBV-Isolate	36
3.3.1.1	PaBV-4-Isolat	36
3.3.1.2	PaBV-2-Isolat	36
3.3.2	Virusanzucht, Herstellung der Virusinokulate und Sequenzierung.....	37
3.3.3	Nachweis von PaBV	39
3.3.3.1	RNA-Nachweis mittels real-time-Reverse-Transkriptase- TaqMan-PCR (real-time-RT-TaqMan-PCR).....	39
3.3.3.1.1	RNA-Extraktion.....	39
3.3.3.1.2	Reverse Transkription.....	40
3.3.3.1.3	Real-time –TaqMan-PCR, Etablierung einer neuen PabV-2-detektierenden PCR.....	41
3.3.3.2	Antikörpernachweis mithilfe des indirekten Immun- fluoreszenztests.....	42
3.3.3.3	Antigennachweis mittels Immunhistochemie.....	43
3.3.3.4	Virus-Reisolierung in CEC-32-Zellen	44
3.3.3.5	Sequenzierung.....	44
3.3.4	Nachweis der Psittazinen Drüsenmagendilatation.....	45
3.3.4.1	Histopathologische Untersuchung	45
3.3.5	Bakteriologische und mykologische Untersuchung	45

3.3.6	Färbungen.....	46
3.3.6.1	Methylenblaufärbung	46
3.3.6.2	Giemsafärbung	46
3.3.7	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Wachstumseigenschaften der Isolate in Zellkultur	47
4.2	Überprüfung der Isolate mittels Sequenzierung.....	47
4.3	Erfolgskontrolle der PCR	49
4.3.1	Versuch I (PaBV-4).....	49
4.3.2	Versuch II (PaBV-2)	49
4.3.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II	50
4.4	Klinische Beobachtungen.....	50
4.4.1	Versuch I (PaBV-4).....	50
4.4.2	Versuch II (PaBV-2)	53
4.4.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4).....	55
4.4.4	Kontrollgruppen	56
4.5	Pathologisch-anatomische Veränderungen	57
4.5.1	Versuch I (PaBV-4).....	57
4.5.2	Versuch II (PaBV-2)	58
4.5.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4).....	60
4.5.4	Kontrollgruppen	61
4.6	Histopathologische Untersuchungen.....	62
4.6.1	Versuch I (PaBV-4).....	62
4.6.2	Versuch II (PaBV-2)	64
4.6.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II	66
4.6.4	Kontrollgruppen	67
4.7	Bakteriologische, mykologische und parasitologische Untersuchungen.....	69
4.7.1	Versuch I (PaBV-4).....	69
4.7.2	Versuch II (PaBV-2)	69
4.7.3	Kontrollgruppen	69
4.8	PaBV-RNA-Nachweis im Versuchsverlauf.....	70
4.8.1	Versuch I (PaBV-4).....	70
4.8.2	Versuch II (PaBV-2)	71
4.8.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-4, PaBV-2).....	72
4.8.4	Kontrollgruppen	72
4.9	Nachweis spezifischer Antikörper gegen PaBV	73
4.9.1	Versuch I (PaBV-4).....	73
4.9.2	Versuch II (PaBV-2)	74
4.9.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-4, PaBV-2).....	75
4.9.4	Kontrollgruppen	75
4.10	PaBV-RNA-Nachweis im Organmaterial	78
4.10.1	Versuch I (PaBV-4).....	78
4.10.2	Versuch II (PaBV-2)	81
4.10.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-4, PaBV-2).....	84
4.10.4	Kontrollgruppen	84
4.11	PaBV-Antigennachweis im Organmaterial mittels Immunhistochemie	85
4.11.1	Versuch I (PaBV-4).....	85

4.11.2	Versuch II (PaBV-2).....	86
4.11.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4)	87
4.11.4	Kontrollgruppen.....	88
4.12	Virus-Reisolierung und Sequenzierung der Reisolat.....	88
4.12.1	Versuch I (PaBV-4)	88
4.12.2	Versuch II (PaBV-2).....	88
4.12.3	Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4)	89
4.12.4	Kontrollgruppen.....	89
4.13	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse.....	92
5	Diskussion.....	93
5.1	Eignung der gewählten Inokulate	94
5.2	Eignung der Versuchstiere	96
5.3	Versuchstierhaltung	97
5.4	Inokulationsrouten	99
5.5	Untersuchungen zum Krankheitsverlauf	100
5.5.1	Erstes Auftreten klinischer Symptome - Inkubationszeit	100
5.5.2	Krankheitsbilder und -verläufe	101
5.5.3	Anzahl der erkrankten Versuchstiere.....	102
5.5.4	Geschlechtsspezifische Prädisposition	103
5.6	Pathologisch-anatomische Befunde	104
5.7	Histopathologische Befunde	105
5.8	Bakteriologische und mykologische Befunde	106
5.9	Untersuchungen zum Infektionsverlauf.....	107
5.9.1	Nachweis von PaBV-Antikörpern	107
5.9.2	Nachweis von PaBV-RNA in Kropf- und Kloakentupfern	108
5.9.3	Nachweis von PaBV-RNA in Organproben	109
5.9.4	Nachweis von PaBV-Antigen.....	111
5.9.5	PaBV-Reisolierung	112
5.10	Sentineltiere	113
5.11	Kontrolltiere	114
5.12	Übergreifende Betrachtung und Schlussfolgerung	115
6	Zusammenfassung	117
7	Summary	119
8	Literaturverzeichnis	121
9	Danksagung	139
10	Erklärung	142

II. Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u>	Drüsenmagendilatation bei einem Graupapagei	6
<u>Abbildung 2:</u>	Schematischer Virion-Aufbau der <i>Bornaviridae</i>	10
<u>Abbildung 3:</u>	Anordnung der ORFs und schematische Darstellung der Transkription des Genoms des <i>Mammalian 1 bornavirus</i>	11
<u>Abbildung 4:</u>	Genomstruktur von aviären Bornaviren (ehemals ABV) und Bornaviren der Säugetiere (ehemals BDV).....	14
<u>Abbildung 5:</u>	Phylogenetischer Baum der Familie der <i>Bornaviridae</i>	16
<u>Abbildung 6:</u>	Haltung der Versuchstiere in Versuch I und Versuch II	30
<u>Abbildung 7:</u>	Versuchsaufbau	32
<u>Abbildung 8:</u>	Blutproben- (links) und Tupferprobenentnahme (rechts) in den Isolatoren.....	35
<u>Abbildung 9:</u>	Darstellung der Ergebnisse der PaBV-2-real-time PCR	49
<u>Abbildung 10:</u>	Charakteristische Symptome einer PDD	52
<u>Abbildung 11:</u>	Perakuter bis akuter Krankheitsverlauf	54
<u>Abbildung 12:</u>	Pathologisch-anatomische Befunde in Versuch I (ic2)	58
<u>Abbildung 13:</u>	Ernährungszustand der Vögel in Versuch II	59
<u>Abbildung 14:</u>	Drüsenmagen-dilatation in Versuch II	60
<u>Abbildung 15:</u>	Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate (PaBV-4)	63
<u>Abbildung 16:</u>	Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Organen aus Versuch I (PaBV-4)	64
<u>Abbildung 17:</u>	Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Organen aus Versuch II (PaBV-2)	66
<u>Abbildung 18:</u>	Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Organen aus Versuch I und II	67
<u>Abbildung 19:</u>	Vergleich typischer und atypischer mononukleärer Infiltrate	68
<u>Abbildung 20:</u>	Zeitpunkt des ersten PaBV-4-RNA-Nachweises	70
<u>Abbildung 21:</u>	Zeitpunkt des ersten PaBV-2-RNA-Nachweises	71
<u>Abbildung 22:</u>	Erster Nachweis von PaBV-RNA in Versuch I und Versuch II	72
<u>Abbildung 23:</u>	Zeitpunkt des ersten Antikörperrnachweises Versuch I	73
<u>Abbildung 24:</u>	Zeitpunkt des ersten Antikörperrnachweises Versuch II	74
<u>Abbildung 25:</u>	Erster Antikörper-Nachweis in Versuch I und Versuch II	75
<u>Abbildung 26:</u>	PaBV-4-RNA-Nachweis in den Organen	80
<u>Abbildung 27:</u>	Korrelation des PaBV-RNA-Gehaltes (1/Ct Median) eines Vogels zu seinem jeweiligen Todeszeitpunkt	80
<u>Abbildung 28:</u>	PaBV-2-RNA-Nachweis in den Organen	83
<u>Abbildung 29:</u>	Abhängigkeit des RNA-Gehaltes (1/Ct Median) eines Vogels von seinem jeweiligen Todeszeitpunkt	83
<u>Abbildung 30:</u>	Nachweis des Phosphoproteins p24 in PaBV-2-inokulierten Nymphensittichen	87
<u>Abbildung 31:</u>	Nachweis des Phosphoproteins p24 in PaBV-2-inokulierten Nymphensittichen	88

III. Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u>	Neue Nomenklatur der Bornaviridae (KUHN et al., 2015)	17
<u>Tabelle 2:</u>	Einteilung der Versuchstiere für Versuch I (PaBV-4)	33
<u>Tabelle 3:</u>	Einteilung der Versuchstiere für Versuch II (PaBV-2)	33
<u>Tabelle 4:</u>	Vergleich der Ct-Werte der in der real-time-PCR verwendeten Standards (geometrischer Mittelwert von 10 PCRs)	50
<u>Tabelle 5:</u>	Übersicht der klinischen Befunde in Versuch I	52
<u>Tabelle 6:</u>	Übersicht der klinischen Befunde in Versuch II	55
<u>Tabelle 7:</u>	Übersicht der klinischen Beobachtungen in Versuch I und II	56
<u>Tabelle 8:</u>	Übersicht über die pathologisch-anatomischen Befunde in Versuch I (PaBV-4)	57
<u>Tabelle 9:</u>	Übersicht über die pathologisch-anatomischen Befunde in Versuch II (PaBV-2)	59
<u>Tabelle 10:</u>	Übersicht der pathologisch-anatomischen Befunde von Versuch I und II	61
<u>Tabelle 11:</u>	Histopathologischer Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in den Ganglienregionen verschiedener Organe in Versuch I (PaBV-4)	63
<u>Tabelle 12:</u>	Histopathologischer Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in den Ganglienregionen verschiedener Organe in Versuch II (PaBV-2)	65
<u>Tabelle 13:</u>	Übersicht Versuch I (PaBV-4)	76
<u>Tabelle 14:</u>	Übersicht Versuch II (PaBV-2)	77
<u>Tabelle 15:</u>	PaBV-4-RNA-Gehalte im Organmaterial (Versuch I)	79
<u>Tabelle 16:</u>	PaBV-2-RNA-Gehalte im Organmaterial (Versuch II)	82
<u>Tabelle 17:</u>	Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch I (PaBV-4)	85
<u>Tabelle 18:</u>	Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch II (PaBV-2)	86
<u>Tabelle 19:</u>	Zusammenstellung der Befunde <i>post mortem</i> Versuch I (PaBV-4)	90
<u>Tabelle 20:</u>	Zusammenstellung der Befunde <i>post mortem</i> Versuch II (PaBV-2)	91

IV. Abkürzungsverzeichnis

ABBV	Aquatic bird bornavirus
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode
A.dest.	Aqua destillata
BoDV	Borna disease virus
cDNA	complementary DNA
CEC-32	Chicken embryo cells (eigentlich Wachtelzellen)
CnBV	Canary bornavirus
Ct	Cycle threshold
d	dies = lat. Tag, Tage
DEF	Duck embryo fibroblasts
Dis.	Diskoordination
Dm	Drüsenmagen
DNA	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpi	dies post infectionem
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
EsBV	Estrildid finch bornavirus
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Geschl.	Geschlecht
HE	Hämatoxylin Eosin
ic	intracerebrally = intrazerebral
ID	Identitätsnummer
IgG	Immunglobulin G
IgY	Immunglobulin Y
IHC	Immunhistochemie
ID ₅₀	Infektiöse Dosis 50
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
INF- α	Interferon alpha
iv	intravenös
KVRAF	Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
LGSV	Lovergidge's garter snake virus
m	männlich
MDCK	Madin-Darby-Canine-Kidneycells
MuBV	Munia bornavirus
o.R.	Ohne Ring
PaBV	Parrot bornavirus

PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
pi	post infectionem
pm	post mortem
PMV	Paramyxovirus
PDD	Psittazine Drüsenmagendilatation
QM	Quail smooth muscle cells
red. AB	reduziertes Allgemeinbefinden
red. KGW	reduziertes Körpergewicht
RIG-1	retinoic acid inducible gene 1
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
se	Sentinel tier
spp.	species pluralis, mehrere nicht im Einzelnen zu nennende Spezies einer Gattung
Taq	Thermophilus aquaticus
unverd. Kör.	unverdaute Körner im Kot
VS BV-1	Variegated squirrel bornavirus 1
w	weiblich

1 Einleitung

Die Psittazine Drüsenmagendilatation oder auch Proventricular Dilatation Disease (PDD) ist seit Ende der 1970er Jahre bekannt, führt meist zu gastrointestinalen und/oder neurologischen Symptomen und endet in der Regel tödlich (RIDGWAY et al., 1983; GRAHAM 1984; TURNER 1984; WOERPEL et al., 1984a; BUSCHE et al., 1985). Am häufigsten sind Großpapageien wie Aras, Kakadus, Amazonen und Graupapageien betroffen (GREGORY et al., 1994). Da 50 Papageienarten laut IUCN Red List¹ derzeit als bedroht gelten sowie weitere 54 Papageienarten als gefährdet und 48 als potenziell gefährdet, hat die PDD eine große aktuelle Bedeutung und gefährdet neben Vögeln in privater Haltung vor allem Erhaltungszuchtprogramme. Da bis 2008 das auslösende Agens nicht identifiziert werden konnte, gestalteten sich sowohl Diagnose als auch Bekämpfungsmaßnahmen, Prophylaxe und Therapie sehr schwierig bis unmöglich.

Verschiedene Erreger wurden als Ursache der PDD diskutiert (GRAHAM 1984; HUGHES 1984; WOERPEL et al., 1984b; MANNL et al., 1987; GREGORY et al., 1997a; GRUND et al., 2002; GOUGH et al., 2006), wurden aber nicht weiter untersucht, da sie nicht regelmäßig in PDD-erkrankten Papageien nachgewiesen wurden. Im Jahr 2008 wurde bei Papageien, die an PDD erkrankt waren, ein neues Virus beschrieben, das aufgrund einer ca. 70%igen Sequenzhomologie gegenüber dem *Borna Disease Virus* (BoDV) der Familie der *Bornaviridae* zugeordnet und als Aviäres Bornavirus bezeichnet wurde (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). Daraufhin folgten zahlreiche Studien an natürlich infizierten Vögeln, die einen engen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit aviären Bornaviren und der PDD nahelegten. Erste Infektionsversuche mit jeweils zwei bis drei Vögeln festigten die Annahme, dass aviäre Bornaviren an der Entstehung einer PDD beteiligt sind. Allen Infektionsstudien war jedoch gemeinsam, dass entweder das Inokulat weitere Viren enthielt, oder die Versuchstiere Infektionen mit anderen Viren aufwiesen (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010; MIRHOSSEINI et

¹ www.iucnredlist.org

al., 2011). Studien zum Infektionsverlauf fehlten bislang vollständig. Somit war die Ursächlichkeit der aviären Bornaviren für die PDD bislang nicht sicher belegt.

Im Gegensatz zu den Bornaviren der Säugetiere weisen aviäre Bornaviren eine hohe genetische Variabilität auf. Erst ging man davon aus, dass es sich um ein einziges Virus, das Aviäre Bornavirus, handelt, das unterschiedliche Genotypen umfasst, die in verschiedenen Vogelspezies nachgewiesen werden konnten. Aufgrund der aktuellen Erkenntnisse über die hohen genetischen Unterschiede zwischen den in den verschiedenen Spezies nachgewiesenen Virusisolaten ist durch Kuhn et al. (2015) eine taxonomische Neuordnung angeregt worden, die weltweit anerkannt wurde (KUHN et al., 2015). Hiernach werden fünf Varianten, die bei Psittaziden nachgewiesen wurden, in der neu benannten Spezies *Psittaciform 1 bornavirus* zusammengefasst und als *parrot bornavirus* (PaBV-) 1, 2, 3, 4 und 7 bezeichnet. Drei weitere Varianten (PaBV-5, -6 und -8) konnten bislang keiner Virusspezies zugeordnet werden. Inwiefern die verschiedenen PaBV-Varianten eine unterschiedliche Pathogenität und Virulenz sowie Wirtsspezifität aufweisen, ist bislang nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit zwei verschiedenen Varianten des *Psittaciform 1 bornavirus* und der Erkrankung an PDD im Tierversuch erstmalig anhand einer statistisch auswertbaren Tier- und Probenanzahl untersucht mit dem Ziel, die Henle-Koch'schen Postulate zu erfüllen. So soll der genaue Infektionsverlauf anhand von Serokonversion und Virusausscheidung über einen Zeitraum von mehreren Monaten untersucht werden. Eine erfolgte Infektion der Vögel soll durch Antigen- und Genomnachweis in den Organen sowie die Reisolierung von infektiösem Virus aus den infizierten Vögeln nachgewiesen werden. Durch den nahezu identischen Versuchsaufbau soll untersucht werden, ob ein Einfluss der Virusvariante auf den Infektions- und/oder den Erkrankungsverlauf besteht.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Psittazine Drüsenmagendilatation (PDD)

Die psittazine Drüsenmagendilatation (PDD) wurde zum ersten Mal Ende der 1970er Jahre beschrieben (RIDGWAY et al., 1983; GRAHAM 1984; BUSCHE et al., 1985). Synonyme für diese Erkrankung sind "Proventricular dilatation disease", "Neuropathische Magendilatation der Psittaziden", "Macaw wasting disease", "Proventricular dilatation syndrome" oder „Myenteric ganglioneuritis“ (CLARK 1984; HUGHES 1984; GRAHAM 1991; GRIMM 1991). Ursprünglich wurde die Erkrankung vermutlich über importierte Papageien aus Bolivien in die USA, die Schweiz und nach Deutschland eingebracht und breitete sich von dort weltweit aus (WOERPEL et al., 1984a). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte die PDD bei über 60 Psittazidenspezies nachgewiesen werden. Großpapageien, wie z.B. Aras, Kakadus, Amazonen und Graupapageien, scheinen am häufigsten betroffen zu sein (GREGORY et al., 1994). Die Erkrankung konnte jedoch vereinzelt auch bei Vögeln anderer Ordnungen nachgewiesen werden, wie z.B. Passeriformes, Anseriformes und Piciformes (DAOUST et al., 1991; GREGORY 1995; WEISSENBOCK et al., 2009b).

2.1.1 Pathogenese

Im Zuge der PDD kommt es entlang des oberen Magen-Darm-Trakts (Ösophagus, Kropf, Drüsen- und Muskelmagen, Duodenum) zu nicht-eitrigen, entzündlichen Infiltrationen der autonomen Nerven (GRAHAM 1991). Hieraus resultiert ein Innervationsverlust der betroffenen glatten Muskulatur im Zusammenhang mit einer langsamen, aber kontinuierlich fortschreitenden Inaktivitätsatrophie (HUGHES 1984; DAHLHAUSEN et al., 2002; GRUND et al., 2004; LIERZ 2005). Dadurch wird die Drüsenmagenmotilität herabgesetzt, im extremen Fall bis hin zur Stase. Es kommt zu einer aufsteigenden Futteranschlupfung in Drüsenmagen und Kropf mit nachfolgender Dilatation des Drüsenmagens (GREGORY 1995). Gelegentlich, in stark fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, kann das Duodenum ebenfalls dilatiert sein (BUSCHE et al., 1985; LUTZ et al., 1991). Durch die Schwächung der dilatierten Organwände können diese rupturieren (TURNER 1984; SHIVAPRASAD et al., 1995). Die nicht-eitrigen entzündlichen Infiltrate

können zudem auch im Gehirn, dem Rückenmark, den peripheren Nerven, dem Reizleitungssystem des Herzens bzw. Myokard und in den Nebennieren nachgewiesen werden (HUGHES 1984; WOERPEL et al., 1984b; GRAHAM 1991; VICE 1992).

Die Angaben in der Literatur über die Inkubationszeit der PDD sind sehr unterschiedlich. In einer Studie mit 127 Vögeln waren Psittaziden zwischen der 10. Lebenswoche und dem 17. Lebensjahr betroffen. Das Durchschnittsalter betrug hier 3,8 Jahre (GRAHAM 1991). In einem israelischen Zuchtbetrieb zeigten Küken im Alter zwischen 10 und 14 Wochen bereits klinische Anzeichen einer PDD (LUBLIN et al., 2006). SUEDEMEYER et al. berichten von einem Graupapagei (*Psittacus erithacus erithacus*), der nach vier Jahren in Besitz des Halters an einer PDD erkrankte und verstarb (SUEDEMEYER 1992). In einem Infektionsversuch mit verschiedenen Papageien erkrankten die Tiere eine Woche bis drei Monate, nachdem sie mit einem Organhomogenisat von Papageien mit nachgewiesener PDD auf verschiedenen Wegen infiziert worden waren (GREGORY 1998).

2.1.2 Klinische Symptome

Die klinischen Anzeichen sind in der Regel unspezifisch und vom Erkrankungsstadium abhängig. So zeigen erkrankte Vögel häufig Apathie, Anorexie und Aufplustern (RIDGWAY et al., 1983; CLARK 1984; TURNER 1984) sowie plötzliche Todesfälle ohne vorherige Symptomatik (GRUND et al., 2004; LUBLIN et al., 2006).

Häufig führt die herabgesetzte Darmmotilität bei den erkrankten Vögeln zu einer Maldigestion. Klinisch sichtbare Anzeichen können sich daher insbesondere in unverdaut ausgeschiedenen Körnern im Kot, Polyurie und Polydypsie, Durchfall sowie Regurgitieren und Erbrechen äußern (RIDGWAY et al., 1983; CLARK 1984; TURNER 1984; WOERPEL et al., 1984b; MANNL et al., 1987).

Adspektorisch kann eine Volumenzunahme des Abdominalbereichs auf eine hochgradige Dilatation oder bereits bestehende Ruptur der beschriebenen Organe hinweisen (TURNER 1984). Trotz häufig erhaltenen Appetits magern die Vögel bis zur Kachexie ab und sterben schließlich infolge des Energiedefizits (RIDGWAY et

al., 1983; WOERPEL et al., 1984b; VICE 1992). Auch ein Todesfall durch Dilatation des rechten Ventrikels infolge einer PDD ist beschrieben (BERHANE et al., 2001).

Neben den gastrointestinalen Symptomen werden ebenfalls zentralnervöse Ausfallserscheinungen, wie unkoordinierte Bewegungen, Lahmheit und Ataxie, Tortikollis, Tremor und epileptiforme Anfälle, in einem Fall auch Blindheit beschrieben (TURNER 1984; BUSCHE et al., 1985; PHALEN 1986; MANNL et al., 1987; BERHANE et al., 2001; LUBLIN et al., 2006; STEINMETZ et al., 2008).

Die allgemeinen, gastrointestinalen und zentralnervösen Symptome können jeweils separat aber auch kombiniert auftreten (BOUTETTE et al., 2004).

2.1.3 Diagnose

Anhand der klinischen Symptome ist lediglich eine Verdachtsdiagnose möglich. Mithilfe eines Röntgenbildes, besonders durch Röntgenkontrastaufnahmen (Abbildung 1, links), kann der erweiterte, dünnwandige Drüsenmagen dargestellt werden (WOERPEL et al., 1984b). Hier kann gleichzeitig eine verlängerte Passagezeit Hinweis auf eine PDD geben (WOERPEL et al., 1984a). Auch endoskopisch kann eine Drüsenmagenerweiterung festgestellt werden (BOUTETTE et al., 2004).

Post mortem kann anhand der pathologisch-anatomischen Befunde die Verdachtsdiagnose untermauert werden. Betroffene Tiere weisen häufig eine hochgradig atrophisierte Pektoralismuskulatur sowie einen schlechten bis sehr schlechten Ernährungszustand auf. Der Drüsenmagen ist meist hochgradig dilatiert und dünnwandig (Abbildung 1, rechts) und mit großen Mengen Futter gefüllt (HUGHES 1984; TURNER 1984; WOERPEL et al., 1984a; BUSCHE et al., 1985). Möglicherweise kann er bereits rupturiert sein (SHIVAPRASAD et al., 1995). Auch andere Abschnitte des oberen Magen-Darm-Traktes können eine Dilatation aufweisen (BUSCHE et al., 1985). Unverdaute Körner können im gesamten Magen-Darm-Trakt gefunden werden. Gelegentlich sind Ulzerationen mit oder ohne Hämorrhagien in der Schleimhaut des Drüsenmagens sichtbar (HUGHES 1984; TURNER 1984; MANNL et al., 1987). Eine Enteritis und, insbesondere nach

Ruptur, eine Zölomitis kann gleichfalls beobachtet werden (TURNER 1984) (Gregory et al., 1995; Lublin et al., 2006).

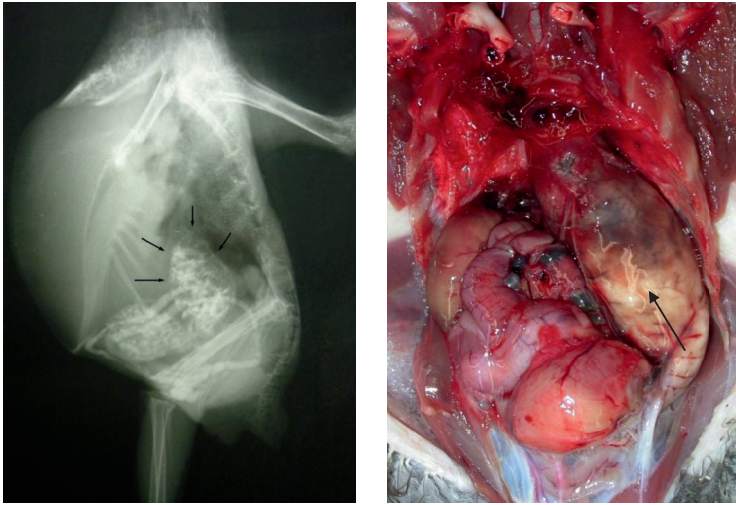


Abbildung 1: Drüsenmagendilatation bei einem Graupapagei

Hochgradig vergrößerter und dilatierter Drüsenmagen eines Kongo-Graupapagei im Kontrastströntgenbild (links) und in der pathologisch-anatomischen Untersuchung (rechts, Situs)

Die Diagnose einer PDD kann nur durch den histopathologischen Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Ganglienregionen im Sinne einer non-purulenten Ganglioneuritis des oberen Magen-Darm-Traktes gestellt werden (BOUTETTE et al., 2004). Am lebenden Tier ist die histopathologische Untersuchung einer Kropfbiopsie möglich (DOOLEN 1994). In einer Studie von Gregory et al. (1996) wurden histologische Befunde von Kropf, Drüsen- und Muskelmagen von 29 Vögeln miteinander verglichen, bei denen eine PDD bereits histologisch diagnostiziert worden war. Dabei wurden bei 22 Vögeln die charakteristischen Infiltrate im Kropf nachgewiesen, bei 25 Vögeln im Drüsenmagen und bei 27 Vögeln im Muskelmagen. Die Autoren schlussfolgerten eine Wahrscheinlichkeit für einen falsch negativen Befund von 24 % wenn nur der Kropf untersucht wird. Da aber auch negative Befunde bei der Untersuchung

von Drüsen- oder Muskelmagen auftraten, empfehlen die Autoren eine Biopsie von Drüsen- oder Muskelmagen nur, wenn das Ergebnis der Kropfbiopsie fraglich oder negativ ist. Für eine standardmäßige Biopsie von Drüsen- und Muskelmagen sei der Eingriff zu risikoreich (DOOLEN 1994; GREGORY et al., 1996). Die histopathologische Untersuchung ist nur im positiven Fall beweisend. Falsch negative Ergebnisse können entstehen, wenn in der entnommenen Probe kein Nervengewebe enthalten ist, oder wenn gerade an der beprobten Stelle keine Infiltrate auftreten (GREGORY et al., 1996). Erst die histologische Untersuchung aller Organproben post mortem liefert also eine sichere Diagnose.

2.1.4 Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch kommen bei einer Drüsenmagendilatation mit entsprechender gastrointestinaler Symptomatik in erster Linie mykotische Infektionen, z.B. mit *Candida* spp. oder *Macrorhabdus ornithogaster*, sowie bakterielle oder parasitäre Infektionen in Betracht. Weiterhin sollten bei Würgen und Erbrechen Fremdkörper und Neoplasien, vor allem im Kropfbereich, ausgeschlossen werden (WOERPEL et al., 1984a; GREGORY 1995). Bei zentralnervösen Symptomen sollten Schwermetallintoxikationen mit Blei oder Zink, Mangelerscheinungen (z.B. Kalzium, Vitamin-B, Vitamin-E, Selen) (WOERPEL et al., 1984a) und virale Infektionen mit psittazinen Herpesviren oder Paramyxoviren abgeklärt werden. Alle diese Differentialdiagnosen können einer PDD ähneln und als Einzelerkrankung vorliegen, diese jedoch auch in Form von Sekundärinfektionen verschlimmern.

2.1.5 Therapie

Eine kausale Therapie ist bislang nicht bekannt. Lediglich unterstützende Maßnahmen können den Erkrankungsverlauf möglicherweise mildern. Energiereiches, leichtverdauliches Futter, wie z.B. Pelletfutter, kann den Gastrointestinaltrakt entlasten und die Resorption der Nährstoffe erleichtern. Eine symptomatische Therapie durch die Gabe von Metoclopramid, Cisaprid oder Cimetidin ist möglich, jedoch von unterschiedlichem Erfolg. Eine Therapie der Sekundärinfektionen ist ebenfalls wichtig (SUEDMEYER 1992; LIERZ 2005). Die Gabe von Cyclooxygenase-2-Hemmern, z.B. Celecoxib (Celebrex, Pfizer) gilt als

derzeit erfolgversprechendste Möglichkeit zur symptomatischen Therapie. In einer Studie konnte eine erste Verbesserung der klinischen Symptome schon nach einer Woche erzielt werden. Die Therapiedauer betrug zwischen 6 und 24 Wochen (DAHLHAUSEN et al., 2002).

Fallbeispiele über den Einsatz von Amantadin, einem Virostatikum, und Ciclosporin-A, einem Immunsuppressivum, weisen einzelne Erfolge auf (GANCZ et al., 2010; GANCZ et al., 2012). Es fehlen jedoch Studien, die die Ergebnisse untermauern.

2.1.6 Ätiologie

Trotz zahlreicher Studien zur Erregeridentifizierung blieb die Ätiologie der PDD lange unklar, eine Virusätiologie galt jedoch als wahrscheinlich. Gough et al. (1996) kultivierten den Kot zweier an PDD erkrankter Aras auf Ara-Embryo-Zellen und beobachteten einen zytopathischen Effekt nach der zweiten Passagierung. Bei der Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie wies die Arbeitsgruppe ca. 83 nm große, virusähnliche Partikel nach, die behüllt zu sein schienen, jedoch keiner bekannten Virusfamilie zugeordnet werden konnten (GOUGH et al., 1996). In einem Versuch von Gregory et al. (1998) wurden fünf gesunde Psittaziden mit einem Organhomogenisat aus Drüsenmagen, Muskelmagen, Kropf und Gehirn eines PDD-kranken Weißhaubenkakadus (*Cacatua alba*) auf intramuskulärem, subkutanem, intraokulärem, oralem und intranasalem Weg gleichzeitig inokuliert. Bei allen fünf Vögeln wurden PDD-assoziierte Symptome eine Woche bis drei Monate *post infectionem* beobachtet. In Organhomogenisaten sowohl der natürlich als auch der experimentell infizierten Vögel wurden ca. 80 nm große, behüllte Viruspartikel nachgewiesen. Eine weitere Charakterisierung der Viruspartikel gelang jedoch nicht (GREGORY 1998).

In der Literatur wurden im Laufe der Zeit verschiedene neurotrope Viren als Auslöser der PDD in Betracht gezogen. Dazu gehörten Adenoviren (HELDSTAB et al., 1985), Herpesviren (GRAHAM 1984; WOERPEL et al., 1984b), Reoviren (HUGHES 1984), Coronaviren (BUSCHE et al., 1985; GOUGH et al., 2006), Eastern Equine Enzephalomyelitis-Viren (GASKIN et al., 1991; GREGORY et al., 1997a;

GREGORY et al., 1997b), Western Equine Enzephalomyelitis-Viren (GREGORY et al., 1997b) und aviäre Paramyxoviren vom Serotyp 1 und 3 (MANNL et al., 1987; GERLACH 1991; GRUND et al., 2002). In den nachfolgenden Jahren folgten keine weiteren Publikationen, die die Ursache der einzelnen Viren für die PDD weiter belegten.

Im Jahr 2008 entdeckten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein bislang nicht beschriebenes Virus bei Papageien, die an PDD erkrankt waren (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). Es wurde der Familie der *Bornaviridae* zugeordnet und als vielversprechender Kandidat als Ursache der PDD beschrieben.

2.2 Bornaviridae

Die Familie der *Bornaviridae* ist der Ordnung *Mononegavirales* untergeordnet. Zu dieser Ordnung gehören ebenfalls die Familien der *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Filoviridae*. Bei den *Mononegavirales* handelt es sich um relativ große, behüllte Viren mit einem einzigen, linearen RNA-Molekül negativer Polarität. Das RNA-Molekül alleine ist also nicht replikationsfähig. Die Familie der *Bornaviridae* umfasst als einziges Genus das Bornavirus, das wiederum fünf verschiedene klassifizierte, sowie weitere bislang noch nicht klassifizierte Spezies umfasst.

2.2.1 Taxonomische Neuorganisation der *Bornaviridae*

Bislang wurde davon ausgegangen, dass das „Aviäre Bornavirus“, wie es zuerst genannt wurde, ein zweites Genus neben dem (ehemals genannten) *Borna Disease Virus* (ehemals BDV) innerhalb der Familie der *Bornaviridae* darstellte (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; RINDER et al., 2009). Aufgrund der starken Heterogenität innerhalb der aviären Bornaviren wurde von Kuhn et al. (2015) eine Neuordnung der Taxonomie erarbeitet, die die gesamte Familie der *Bornaviridae* einschließt. Hiernach umfasst die Virusfamilie als einziges Genus das Bornavirus, das die Spezies *Mammalian 1 bornavirus*, *Psittaciform 1 bornavirus*, *Passeriform 1 bornavirus*, *Waterbird 1 bornavirus* und *Passeriform 2 bornavirus* umfasst. Diese Spezies umfassen wiederum mehrere Virusvarianten.

Die Bezeichnung „Virusstamm“ oder „Genotyp“ soll nicht mehr in Zusammenhang mit Bornaviren verwendet werden, da laut Kuhn et. al *per definitionem* unterschiedliche Virusstämme unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen. Es wird stattdessen die Verwendung des Wortes „Virusvariante“ empfohlen (KUHN et al., 2014; KUHN et al., 2015).

2.2.2 Bornavirus der Säugetiere (*Mammalian 1 bornavirus*)

Das Bornavirus der Säugetiere, nach neuer Taxonomie als *Mammalian 1 bornavirus* bezeichnet (KUHN et al., 2015), ist ca. 90 nm groß, streng neurotrop und repliziert im Gegensatz zu den anderen Vertretern der *Mononegavirales* im Zellkern. Das Genom weist sechs verschiedene, z.T. überlappende offene Leserahmen (engl.: *open reading frames* = ORFs) auf, die für folgende Proteine kodieren:

Nukleoprotein (N): Bestandteil des Nukleokapsids, an nukleärem Im- und Export beteiligt,

X-Protein (X): Nicht-Strukturprotein, vermutlich regulatorische Funktion bei der Replikation in der Wirtszelle,

Phosphoprotein (P): Phosphoryliert, Bestandteil des Nukleokapsids,

Matrixprotein (M): Membranassoziiert, vermittelt innerhalb der Virushülle die Verbindung mit dem Glykoprotein,

Glykoprotein (G): Membranprotein, vermutlich an Rezeptorbindung beteiligt,

RNA-abhängige RNA-Polymerase (L): Bestandteil des Nukleokapsids (BRIESE et al., 1994; CUBITT et al., 1994; DE LA TORRE 1994; SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEEMANN et al., 1995; SCHWEMMLE et al., 1998; KOHNO et al., 1999; HAAS 2011).

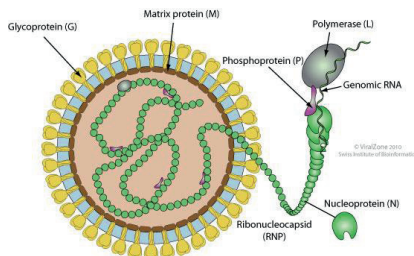


Abbildung 2: Schematischer Virion-Aufbau der Bornaviridae
(SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS 2010)

Die genomische Organisation des *Mammalian 1 bornavirus* ist sehr stabil. Bisher wurden nur zwei unterschiedliche Virusvarianten nachgewiesen: Das ehemals „klassische“ *Borna Disease Virus* (ehemals BDV), nach aktueller Taxonomie jetzt *Borna disease virus 1* (BoDV-1) und die Variante BDV No/98, nach aktueller Taxonomie jetzt BoDV-2 (NOWOTNY et al., 2000; SCHWEMMLE et al., 2012; KUHN et al., 2015).

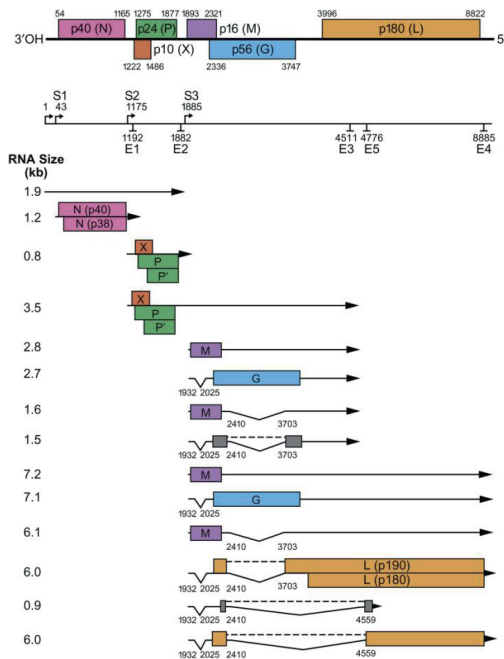


Abbildung 3: Anordnung der ORFs und schematische Darstellung der Transkription des Genoms des *Mammalian 1 bornavirus*.

S = Transkriptions-Initiationsstelle, E = Transkriptions-Terminationsstelle, Position der Introns: I (nt 1932-2025), II (nt 2410-3703) und III (nt 2410-4559) (SCHWEMMLE et al., 2012).

Das Virus ist nicht zytopathogen (LUDWIG et al., 1988). Die natürliche Infektion erfolgt sehr wahrscheinlich durch Tröpfcheninfektion und anschließende intraaxonale Wanderung über den *Nervus olfactorius* zum *Bulbus olfactorius*, um schließlich in Neuronen des ZNS zu gelangen, insbesondere in das limbische

System (CARBONE et al., 1987; MORALES et al., 1988). Dort führt es zu einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis oder Meningoenzephalomyelitis (ROTT et al., 1995) mit perivaskulären und parenchymalen mononukleären Immunzellinfiltraten bestehend aus vorwiegend Lymphozyten aber auch Monozyten und Plasmazellen (DESCHL et al., 1990; RICHT et al., 1990; BILZER et al., 1994). Später kann das Virus vereinzelt auch im peripheren Nervensystem nachgewiesen werden (STITZ et al., 2002). Allein bei experimentell infizierten Lewis-Ratten, die am ersten Lebenstag mit BoDV-1 infiziert wurden, konnte eine Verbreitung des Virus in nicht-neuronale Gewebe nachgewiesen werden (HERZOG et al., 1984). Die Pathogenese erfolgt immunmoduliert hauptsächlich durch CD8+-T-Lymphozyten, die durch ihre zytotoxischen Eigenschaften eine Neurodegeneration hervorrufen. Ebenfalls beteiligt sind CD4+-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen (NARAYAN et al., 1983b; STITZ et al., 2002). Nicht immer nachweisbar, aber im positiven Fall beweisend, sind die Joest-Degen'schen intranukleären Einschlusskörperschen (JOEST 1911).

Die natürlichen Hauptwirte des *Mammalian 1 bornavirus* sind Pferde und Schafe. Hier kommt es in der Regel zu einer persistierenden Infektion. Die Erkrankung geht mit neurologischen Symptomen einher und verläuft meist letal. Natürliche Infektionen sind aber auch sporadisch bei Katzen, Rindern, Kaninchen, Mäusen, Kameliden, Ziegen, Luchsen, Hunden, Primaten, Faultieren, Flusspferden und Straußen nachgewiesen worden (RICHT et al., 1992; SCHÜPPEL et al., 1994; ROTT et al., 1995; SCHÜPPEL et al., 1995; BECHT et al., 1996; WEISSENBOCK et al., 1998). Als Erregerreservoir wurden Feldpitzmäuse nachgewiesen (HILBE et al., 2006). Experimentell konnte eine noch größere Vielfalt an Tierarten infiziert werden, vom Huhn bis zum Primaten (ZWICK 1939; LUDWIG et al., 1985; RICHT et al., 1992; ROTT et al., 1995; BECHT et al., 1996). Inkubationszeit, klinische Symptome und Schwere der Erkrankung scheinen von der infizierten Spezies sowie von der Virusvariante abzuhängen (HERZOG et al., 1991; ROTT et al., 1995). So sind Kaninchen, Lewis-Ratten und Meerschweinchen hochempfindlich, während Hühner, Affen, Rinder und Spitzhörnchen weniger empfänglich sind. Hamster, Farbratten, Mäuse, Frettchen und Tauben scheinen keine Symptome zu entwickeln, obwohl sie persistent infiziert werden können (ZWICK 1939; HEINIG

1969; RICHT et al., 1992; ROTT et al., 1995). Auch bei natürlich infizierten Pferden wird häufig eine subklinische Infektion beobachtet. Hier können meist auch BoDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (HERZOG et al., 1994; RICHT et al., 1994a; BECHT et al., 1996). Bislang ist nicht nachgewiesen, dass diese schützende Eigenschaften besitzen, sodass sie womöglich nicht in die Immunpathogenese involviert sind bzw. protektiv sind (NARAYAN et al., 1983b; STITZ et al., 1989; STITZ et al., 1998). Virale RNA kann in Nasen- und Konjunktivalsekreten sowie in Speichel (HERZOG et al., 1997) und bei immuninkompetenten, experimentell infizierten Ratten im Urin (SAUDER et al., 2003) nachgewiesen werden. Ein zoonotisches Potential von BoDV wurde in der Literatur regelmäßig diskutiert. BoDV-spezifische Antikörper konnten bei Menschen in Deutschland, Japan und den USA nachgewiesen werden und sollen mit psychiatrischen Krankheitsbildern in Zusammenhang stehen. Ein Nachweis von BoDV bei Menschen ist bislang nicht erfolgt (RICHT et al., 1997). Ein neues, bislang nicht zugeordnetes Bornavirus, wurde aber 2011 bei drei Bunthörnchenzüchtern in Sachsen-Anhalt nachgewiesen. Diese starben infolge einer progressiven Enzephalitis und Meningoenzephalitis innerhalb von zwei bis vier Monaten nach Auftreten der ersten Symptome. Sowohl bei den drei Züchtern als auch bei einem Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*) aus einem der Zuchtbestände wurde ein virales Genom nachgewiesen, das zwischen 67,6% und 81,7% Sequenzähnlichkeit mit dem *Mammalian 1 bornavirus* aufwies. Diese neue Spezies, das *Variegated squirrel 1 bornavirus* (VSBV-1), ist somit ein Bornavirus mit sehr wahrscheinlich zoonotischem Potential (HOFFMANN et al., 2015).

2.2.3 Aviäre Bornaviren

Mittels neuester Technik wie Microarrayanalyse (KISTLER et al., 2008) und Pyrosequenzanalyse (HONKAVUORI et al., 2008) mit anschließender PCR wurde 2008 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander bei an PDD erkrankten Papageien aus den USA und Israel ein neues Virus nachgewiesen, das bei Kontrolltieren nicht gefunden wurde. Die Sequenzierung des Genoms zeigte eine Sequenzähnlichkeit von bis zu 70 % zu Bornaviren der Säugetiere. Trotz dieser relativ geringen Sequenzhomologie wies das neu

entdeckte Virus alle wichtigen Eigenschaften der *Bornaviridae* auf (KISTLER et al., 2008):

- spezifische Anordnung der sechs unterscheidbaren offenen Leserahmen (engl. open reading frames = ORF) die für die Gene L, N, X, P, M und G kodieren
- nicht-kodierende, regulatorische Sequenzen (Introns)
- ähnliche Struktur der Initiations- und Terminationsregionen für die Transkription
- ähnliche Anordnung der Signal-Codons für das prä-mRNA-Splicing.

Somit wurde das neue Virus der Familie der *Bornaviridae* zugeordnet und vorerst „Aviäres Bornavirus“ genannt.

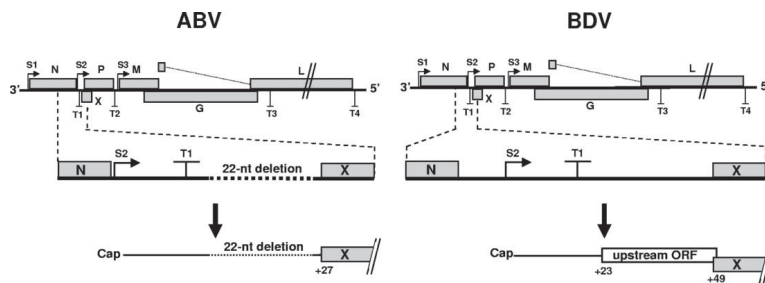


Abbildung 4: Genomstruktur von aviären Bornaviren (ehemals ABV) und Bornaviren der Säugetiere (ehemals BDV).

Ein wichtiger Unterschied scheint in der Position der regulatorischen Elemente der Transkriptionseinheiten 1 und 2 (vergrößerter Abschnitt) zu bestehen. Bei ABV ist die Startregion S2 direkt in 5'-Richtung des ORF für das N-Gen zu finden. Desweiteren fehlt aviären Bornaviren eine regulatorische Sequenz in 3'-Richtung des ORF für das X-Gen (RINDER et al., 2009)

Seit der Entdeckung des Virus im Jahr 2008 wurden acht verschiedene aviäre Bornaviren bei Psittaziden beschrieben (HONKAUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; WEISSENBOCK et al., 2009a; RUBBENSTROTH et al., 2012; PHILADELPHO et al., 2014). Weitere wurden bei Kanarienvögeln (*Serinus canaria forma domestica*) (WEISSENBOCK et al., 2009b; RUBBENSTROTH et al., 2013), bei Astrildern (*Pytilia hypogrammica*, *Lonchura striata forma domestica* und *Estrilda troglodytes*)

(RUBBENSTROTH et al., 2014b) sowie bei Trompeterschwänen (*Cygnus buccinator*) (DELNATTE et al., 2011), Höckerschwänen (*Cygnus olor*) (GUO et al., 2012; DELNATTE et al., 2013), Kanadagänsen (*Branta canadensis*) (DELNATTE et al., 2011), Schneegänsen (*Chen caerulescens*) und Zwergschneegänsen (*Chen rossii*) (PAYNE et al., 2012), Stock- und Brautenten (*Anas platyrhynchos* und *Aix sponsa*) (GUO et al., 2014) sowie bei Möwen (*Larus argentatus*, *Larus delawarensis* und *Leucophaeus atricilla*) (GUO et al., 2015) nachgewiesen.

Nach aktueller taxonomischer Nomenklatur nach Kuhn et al. (2015) werden aviäre Bornaviren folgendermaßen eingeteilt: Die Spezies *Psittaciform 1 bornavirus* umfasst die Varianten *parrot bornavirus 1*, 2, 3, 4 und 7 (PaBV-1, -2, -3, -4 und PaBV-7), die Spezies *Passeriform 1 bornavirus* umfasst die Varianten *canary bornavirus 1*, 2, 3 (CnBV-1, -2, -3) und *munia bornavirus 1* (MuBV-1). Die Spezies *Passeriform 2 bornavirus* beinhaltet die Virusvariante *estrildid finch bornavirus 1* (EsBV-1) und die Spezies *Waterbird 1 bornavirus* beinhaltet die Variante *aquatic bird bornavirus 1* (ABBV-1). Bisher nicht klassifizierte Varianten sind ABV-MALL, PaBV-5 und PaBV-6 sowie das kürzlich entdeckte *Variagated squirrel 1 bornavirus* (VSBV-1) da hier noch ausführliche Sequenzdaten fehlen um sie abschließend zuzuordnen (KUHN et al., 2015) (Tabelle 1). Kürzlich wurde eine neue PaBV-Variante, das *Parrot bornavirus 8* (PaBV-8) entdeckt. Es wurde noch nicht offiziell klassifiziert, da die Studien von Kuhn et al. (2015) und Philadelpho et al. (2014) relativ zeitgleich publiziert wurden. Aufgrund einer ca. 80-86 %igen Sequenzhomologie zu *Psittaciform 1 bornavirus* wird angenommen, dass es sich bei PaBV-8 um eine neue Variante dieser Spezies handelt (PHILADELPHO et al., 2014).

So sind weltweit derzeit 15 verschiedene Virusvarianten aviärer Bornaviren bekannt. Die am häufigsten nachgewiesenen Varianten bei Psittaziden in Europa und Nordamerika sind PaBV-4 und PaBV-2 (WEISSENBÖCK et al., 2009a; HOPPES et al., 2010; STAEHELI et al., 2010). In einer Studie von Heffels-Redmann et al. (2011) wurden aviäre Bornaviren bei 22,8% der 1442 lebenden und 73 toten untersuchten Vögel nachgewiesen. Diese Vögel gehörten zu 54 unterschiedlichen

Genera und stammten aus 215 europäischen Vogelhaltungen (HEFFELS-REDMANN et al., 2011).

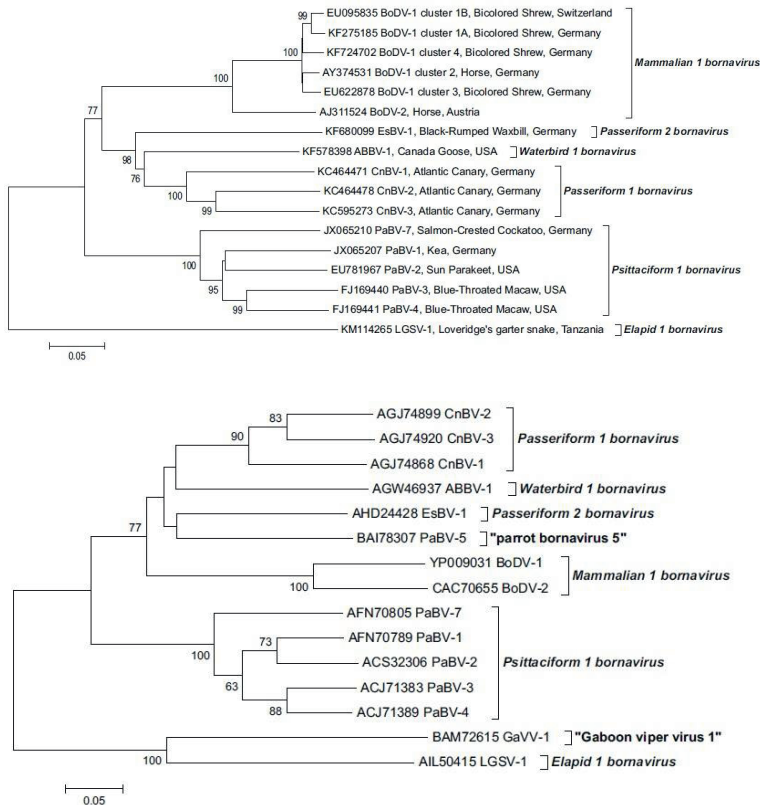


Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der Familie der Bornaviridae

Phylogenetische Verwandtschaft der Bornaviridae basierend auf 17 Nukleinsäuresequenzen kodierend für das N-, X und P-Protein sowie die N/X intergenetische Region (oben) und basierend auf 15 Aminosäuresequenzen des X-Proteins (unten) (KUHN et al., 2015)

Tabelle 1: Neue Nomenklatur der Bornaviridae (KUHN et al., 2015)

Familie	Genus	Spezies	Virusvariante
<i>Bornaviridae</i>			
	<i>Bornavirus</i>		
		<i>Mammalian 1 bornavirus</i>	Borna disease virus 1 (BoDV-1) Borna disease virus 2 (BoDV-2)
		<i>Psittaciform 1 bornavirus</i>	Parrot bornavirus 1 (PaBV-1) Parrot bornavirus 2 (PaBV-2) Parrot bornavirus 3 (PaBV-3) Parrot bornavirus 4 (PaBV-4) Parrot bornavirus 7 (PaBV-7)
		<i>Passeriform 1 bornavirus</i>	Canary bornavirus 1 (CnBV-1) Canary bornavirus 2 (CnBV-2) Canary bornavirus 3 (CnBV-3) Munia bornavirus 1 (MuBV-1)
		<i>Waterbird 1 bornavirus</i>	Aquatic bird bornavirus 1 (ABBV-1)
		<i>Passeriform 2 bornavirus</i>	Estrildid finch bornavirus 1 (EsBV-1)
	noch nicht zugeordnete Bornaviren	<i>Elapid 1 bornavirus</i>	Loveridge's garter snake virus 1 (LGSV-1)
	noch nicht klassifizierte Bornaviren		Avian bornavirus MALL (ABV-MALL) Gaboon viper virus 1 (GVV-1) Parrot bornavirus 5 (PaBV-5) Parrot bornavirus 6 (PaBV-6) Parrot bornavirus 8 (PaBV-8)

2.2.3.1 Kausalität der PDD durch eine Infektion mit aviären Bornaviren

Um die Kausalität einer Erkrankung durch einen Erregerkandidaten zu beweisen, sind Infektionsversuche zur Reproduktion des Krankheitsbildes sowie letztendlich die Erfüllung der Henle-Koch'schen Postulate notwendig.

Gancz et al. (2009) infizierten drei gesunde Nymphensittiche gleichzeitig intranasal, intramuskulär, per os und intraokulär mit einem Gehirnhomogenisat eines PaBV-4-positiven und an PDD erkrankten Kongo-Graupapagei. Sie konnten bei zwei der drei Tiere PDD-assoziierte Symptome 21 bzw. 31 Tage *post infectionem* beobachten. Bei allen drei Tieren wurde PaBV-RNA mittels PCR in Organewebe *post mortem* nachgewiesen. Alle 3 Vögel wiesen einen dilatierten Drüsenmagen sowie die charakteristischen histologischen Veränderungen einer PDD auf. Das verwendete Infektionshomogenisat enthielt jedoch auch Sequenzen, die eine 40-89%ige Homologie zu Viren aus der Familie der *Retro-* und *Astroviridae* zeigten. Diese wurden im *post mortem* gewonnenen Organmaterial der Versuchstiere jedoch nicht mehr nachgewiesen (GANCZ et al., 2009). In einem Infektionsversuch von Gray et al. (2010) wurden zwei Felsensittiche (*Cyanoliseus patagonius*) mit PaBV infiziert. Die Arbeitsgruppe kultivierte ein PaBV-4-Isolat eines Goldnackendaras (*Primolius auricollis*) auf einer Entenzelllinie (DEF) und inokulierte den Zellüberstand mit einem Titer von 8×10^4 infektiösen Einheiten intramuskulär in die Felsensittiche. Nach 66 Tagen pi zeigten die Tiere PDD-assoziierte Symptome. Ebenfalls konnte die Arbeitsgruppe PaBV-spezifische Antikörper mittels Western Blot ab Tag 33 pi und PaBV-RNA mittels PCR ab Tag 60 und 62 pi bei beiden Tieren nachweisen. *Post mortem* wiesen beide Tiere einen dilatierten Drüsenmagen sowie die typischen histologischen Läsionen einer PDD auf. Vor dem Experiment wurde bei den Felsensittichen jedoch psittazines Herpesvirus nachgewiesen (GRAY et al., 2010). Mirhosseini et al. (2011) übertrugen intramuskulär und *per os* ein PaBV-2-Isolat aus einem Nymphensittich auf zwei weitere Nymphensittiche. PDD-assoziierte Symptome konnten 33 und 41 Tage pi beobachtet werden. Die Vögel schieden während der Versuche zu keiner Zeit PaBV-RNA aus. *Post mortem* wurde bei beiden Vögeln ein dilatierter Drüsenmagen sowie die charakteristischen histopathologischen Befunde einer PDD konstatiert. PaBV-2 konnte im Gehirn, Rückenmark und Darm

nachgewiesen werden. Beide Vögel waren vor den Versuchen gleichzeitig auch PaBV-4-Träger. *Post mortem* wurde jedoch kein PaBV-4-Genom mehr nachgewiesen (MIRHOSSEINI et al., 2011). All diese Studien geben erste Hinweise auf einen engen kausalen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit aviären Bornaviren und der psittazinen Drüsenmagendilatation. Jedoch erlauben sie aufgrund der geringen Tierzahl keine statistischen Berechnungen und Vergleiche. Untersuchungen zur Serokonversion wurden bisher lediglich im Umfang der Studie von Gray et al. (2010) mit zwei Tieren durchgeführt (GRAY et al., 2010). Weiterhin bleibt bei diesen Studien fraglich, inwiefern das Vorhandensein anderer Infektionserreger die Versuche beeinflusst hat. In einer Feldstudie von Heffels-Redmann et al. (2011) wurden 1442 lebende und 73 tote Vögel aus 215 verschiedenen Beständen in Spanien, Deutschland, Italien, Großbritannien und Dänemark auf PaBV mittels Nachweis von RNA, Antikörpern, Antigen und infektiösem Virus untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass ein hoch signifikanter Zusammenhang ($P < 0,001$) bestand zwischen einer PaBV-Infektion und einer histopathologisch nachgewiesenen PDD bei den toten Vögeln sowie dem Auftreten PDD-assoziiierter Symptome bei den lebenden Vögeln (HEFFELS-REDMANN et al., 2011).

2.2.3.2 Nachweis einer Infektion mit aviären Bornaviren

Das Genom der aviären Bornaviren lässt sich mittels Konsensus RT-PCR für das M-, das N- und das L-Gen nachweisen (KISTLER et al., 2008). Darüber hinaus wurden zwei spezifische real-time-RT-PCRs entwickelt, deren Primer und Sonde an Sequenzen des P-Gens (Phosphoprotein) binden. Sie dienen dem Nachweis von PaBV-4 (Primer 1034-1322) und PaBV-3 (Primer 1367) und ermöglichen eine quantitative Analyse anhand des Ct-Wertes (engl. cycle threshold). Ct-Werte über 36,0 werden bislang als negativ gewertet (HONKAVUORI et al., 2008). Der sicherste Nachweis von PaBV-RNA gelingt mit der kombinierten Untersuchung von Kropf- und Kloakentupfern. Von insgesamt 55 PaBV-positiven Vögeln wiesen Enderlein et al. (2010) bei 36 Vögeln PaBV-RNA in beiden Tupfern nach, bei 11 Tieren nur im Kropf- und bei acht Tieren ausschließlich im Kloakentupfer (ENDERLEIN et al., 2010). Auch in einer Studie von Heffels-Redmann et al. (2012) waren von 14 PaBV-infizierten Vögeln 10 Tiere sowohl im Kropf- als auch

Kloakentupfer positiv. Bei drei Vögeln wurde PaBV-RNA nur im Kropftupfer, bei einem Vogel nur im Kloakentupfer nachgewiesen (HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Kotproben scheinen als Material zum Nachweis von PaBV-RNA nur bedingt geeignet zu sein. De Kloet et al. (2009) wiesen bei zwei von vier PaBV-positiven Aras PaBV-RNA in Kotproben nach (DE KLOET et al., 2009), andere Arbeitsgruppen wiesen im Kot PaBV-infizierter Vögel keinerlei PaBV-RNA nach (ENDERLEIN et al., 2009). Hoppes et al. (2010 und 2013) wiesen PaBV-RNA in einer nicht näher beschriebenen Anzahl an Kotproben und Kloakentupfern nach und stellten keinen Unterschied zwischen den beiden Proben fest (HOPPES et al., 2010; HOPPES et al., 2013). Auch in Federkielen kann PaBV-RNA nachgewiesen werden. Von 44 Vögeln der Gattungen *Aratinga*, *Phyrrhura* und *Psittacus* mit PaBV-Verdacht wurde bei 30 Tieren PaBV-RNA im Federkiel gefunden (DE KLOET et al., 2011). Hoppes et al. (2013) konnte dies nicht bestätigen (HOPPES et al., 2013). *Post mortem* lässt sich PaBV-RNA mittels RT-PCR in einer Vielzahl von Organen nachweisen. Die Breite der Verteilung scheint abhängig davon zu sein, ob ein Tier klinische Symptome aufwies oder nicht. In einer Studie von Lierz et al. (2009) wies ein an PDD erkrankter und verstorbener Vogel eine Verteilung viralen Genoms in nahezu alle Organe des Organismus auf. Bei einem weiteren, aus anderen Gründen als PDD euthanasierten, aber PaBV-infizierten Vogel wurde PaBV-RNA fast ausschließlich im Nervensystem detektiert. Der Gehalt viraler RNA im jeweiligen Gewebe lag bei der Untersuchung des ersten Vogels deutlich höher als beim zweiten Vogel (LIERZ et al., 2009). Ähnliche Beobachtungen machten auch Raghav et al. (2010). Sie stellten bei sieben von acht histologisch nachgewiesenen PDD-Fällen eine breite Gewebeverteilung von PaBV-RNA fest. Bei dem achten Vogel handelte es sich um ein klinisch unauffälliges Tier, bei dem PaBV-RNA ausschließlich im Nervensystem nachgewiesen wurde. Ein weiterer, klinisch und histologisch unauffälliger, aber PaBV-infizierter Vogel wies ebenfalls PaBV-RNA lediglich im Nervensystem sowie in Nieren und Muskulatur auf (RAGHAV et al., 2010). Virales Antigen lässt sich mittels immunhistochemischer Untersuchung nachweisen. Dabei werden mono- oder polyklonale Antikörper vom Kaninchen oder der Maus verwendet, die gegen Proteine des *Mammalian 1 Bornavirus* gerichtet sind. In der Literatur

wurden bislang Antikörper verwendet, die gegen das Matrix-, das Nukleo- und das Phosphoprotein gerichtet sind (RINDER et al., 2009; WEISSENBOCK et al., 2009a; HERZOG et al., 2010; RAGHAV et al., 2010; WÜNSCHMANN et al., 2011). PaBV-Antigen wurde bereits in einer Vielzahl von Organen nachgewiesen, darunter auch in nicht-neuronalem Gewebe wie Leber, Lunge oder Niere (RINDER et al., 2009; WEISSENBOCK et al., 2009a; RAGHAV et al., 2010; WÜNSCHMANN et al., 2011). Besonders hohe Antigenkonzentrationen können laut Rinder et al. (2009) vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem und im oberen Verdauungstrakt nachgewiesen werden (RINDER et al., 2009). Dies stellt einen erheblichen Unterschied zu Bornaviren der Säugetiere dar, die einen strikten Tropismus zum ZNS aufweisen (STITZ et al., 1995).

Spezifische Antikörper gegen aviäre Bornaviren werden mittels Western-Blot (LIERZ et al., 2009; VILLANUEVA et al., 2010), ELISA (DE KLOET et al., 2009) und indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT) (HERZOG et al., 2010) nachgewiesen. Bei Villanueva et al., 2010 wurde der Western-Blot auf der Basis PaBV-4-infizierter Enten-Embryofibroblasten-Lysate durchgeführt (VILLANUEVA et al., 2010), Lierz et al. (2009) führten den Western-Blot auf der Basis von in prokaryotischen Systemen exprimiertem PaBV-N- und -P-Protein durch (LIERZ et al., 2009). De Kloet et al. (2009) untersuchten Papageien-Seren mittels eines ELISA, basierend auf von *E. coli* synthetisiertem Bornavirus-N-Protein (DE KLOET et al., 2009). Herzog et al. (2010) führten einen indirekten Immunfluoreszenztest mithilfe persistent BoDV-infizierter MDCK-Zellen durch. Sie konnten bei 64% der zuvor PaBV-RNA-positiv getesteten Vögel (18/28) spezifische Antikörper gegen PaBV nachweisen sowie in 34% der negativ getesteten Vögel (17/49). Die Arbeitsgruppe führt dies darauf zurück, dass womöglich nicht alle PaBV-Varianten mittels der derzeit etablierten PCRs detektiert werden können (HERZOG et al., 2010).

Die Isolierung von infektiösem Virus gelingt aus verschiedenen Organen. Gray et al. (2010) verwendeten Entenembryozellen (Duck embryo fibroblasts = DEF) zur Vermehrung von PaBV (GRAY et al., 2010), Rinder et al. (2009) fanden heraus, dass PaBV sehr gut auf der Wachtelzelllinie CEC-32 kultivierbar ist. Auf

klassischen Säugetierzelllinien ließ sich das Virus bislang nicht erfolgreich vermehren (RINDER et al., 2009). Dies konnte durch eine Studie von Rubbenstroth et al. (2012) bestätigt werden. Hier wurden zwei Wachtelzelllinien (CEC-32, QM7), zwei Hühnerzelllinien (DF-1, LMH) und Entenprimärzellen (DEF) mit einer Affenzelllinie (VERO) verglichen. In allen fünf Vogelzelllinien konnte infektiöses Virus vermehrt werden, wobei die höchsten Titer in der Wachtelzelllinie CEC-32 erreicht wurden. In VERO-Zellen konnte PaBV nicht vermehrt werden. Desweiteren fand die Arbeitsgruppe Hinweise auf Unterschiede zwischen den PaBV-Varianten hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften. Auf CEC-32-Zellen vermehrten sich PaBV-1, -2 und -4 schneller als PaBV-7. Um ca. 100% der Zellen zu infizieren brauchten PaBV-1, -2 und -4 zwei bis drei Wochen, während PaBV-7 dafür sieben bis neun Wochen brauchte. Hingegen war nach drei Wochen Kultivierung auf DF-1-, LMH- oder DEF-Zellen mehr PaBV-7 als PaBV-4 nachweisbar. (RUBBENSTROTH et al., 2012). In einer darauffolgenden Studie von Rubbenstroth et al. (2013) zu CnBV mit den gleichen Zelllinien ließ sich CnBV-2 als einziges der untersuchten Viren neben den aviären Zellen auch auf VERO-Zellen vermehren. CnBV-1 und CnBV-3 dagegen ließen sich ausschließlich auf CEC-32-, QM7-, DF-1-, LMH- und DEF-Zellen kultivieren, nicht jedoch auf VERO-Zellen (RUBBENSTROTH et al., 2013).

2.2.3.3 Übertragungsweg und Pathogenese

Untersuchungen zu Pathogenese und Übertragungswegen finden sich bislang nur ansatzweise in der Literatur. In den bisher publizierten Infektionsversuchen wurden parallel mehrere Übertragungswege gewählt, wodurch die Zuordnung der erfolgreichen Infektion zu einem Übertragungsweg nicht möglich ist. Gancz et al. (2009) infizierten Nymphensittiche gleichzeitig intranasal, intramuskulär, intraokulär und *per os*, Mirhosseini et al. (2011) infizierten Nymphensittiche parallel intramuskulär und nasal (GANCZ et al., 2009; MIRHOSSEINI et al., 2011). Gray und Kollegen gelang die Infektion von Felsensittichen nach intramuskulärer Applikation (GRAY et al., 2010), welche jedoch keinen natürlichen Infektionsweg darstellt. In einer Studie von Kistler et al. (2010) wurde die Ausbreitung von PaBV und PDD in zwei Zuchtbeständen beschrieben. Nachdem eine PaBV-2-positive und an PDD erkrankte Graupapageien-Henne als Neuzugang in einen

Bestand A integriert wurde, infizierten sich 12 der 46 Kontakttiere mit PaBV. Zehn Vögel wiesen PDD-typische Symptome auf und verstarben. Drei Küken aus Zuchtbestand B, die vorübergehend von Zuchtbestand A betreut und dann wieder in ihren ursprünglichen Zuchtbetrieb B zurückgegeben wurden, infizierten sich ebenfalls mit PaBV-2. Nachdem sie wieder in Zuchtbetrieb B waren, verstarben alle drei an einer PDD. Nach ca. einem Monat wurde bei fünf weiteren Vögeln in Bestand B PaBV nachgewiesen. Kistler et al. (2010) vermuteten eine fäko-orale Übertragung, jedoch infizierten sich nicht alle Kontaktvögel. Die Daten aus der Studie zeigen außerdem, dass nicht alle PaBV-positiven Vögel im Untersuchungszeitraum erkrankten (KISTLER et al., 2010). Auch in anderen Studien wurde nachgewiesen, dass sich negative Tiere selbst durch direkten, lang andauernden Kontakt zu PaBV-positiven Tieren über einen langen Zeitraum nicht infizieren (LIERZ et al., 2009) und dass es eine Vielzahl infizierter Vögel gibt, die jedoch über einen langen, bislang nicht definierbaren Zeitraum klinisch gesund bleiben (DE KLOET et al., 2009; LIERZ et al., 2009; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2012). PaBV wird regelmäßig sowohl in Kotproben als auch in Kropf- und Kloakentupfern nachgewiesen, weshalb verschiedene Autoren eine fäko-orale Übertragung vermuten (GREGORY 1998; ENDERLEIN et al., 2009; RINDER et al., 2009). Ein Infektionsversuch mit Graupapageien weist hier in eine neue Richtung. Die Vögel konnten mittels subkutaner Inokulation persistent infiziert werden, durch okulonasale Infektion gelang dies jedoch nicht (RINDER et al., 2014). Ob die Infektion aufgrund der Verletzung der Haut gelang, ist mangels weiterer Studien noch nicht belegbar. Auch in einer ausführlichen Studie von Heckmann et al. (2015) konnte eine Infektionsroute über den oralen oder nasalen Weg nicht nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe infizierte neun Nymphensittiche oral per Knopfsonde und neun Nymphensittiche nasal mit PaBV-4. Über einen Untersuchungszeitraum von 173 bzw. 174 Tagen wurden weder eine persistierende PaBV-Infektion, noch Anzeichen einer Erkrankung an PDD nachgewiesen (HECKMANN et al., 2015). Rubbenstroth et. al (2013) infizierte 14 Kanarienvögel mit einem CnBV-2-Isolat aus einem Kanarienvogel und setzte fünf nicht infizierte Kontakttiere hinzu. Davon konnte bei zwei Vögeln eine persistierende Infektion nach 11 bzw. 15

Wochen nachgewiesen werden (RUBBENSTROTH et al., 2013). In einer zweiten Studie von Rubbenstroth et al. (2014) mit Nymphensittichen und Kanarienvögeln, die mit aviären Bornaviren infiziert worden waren, wurde wiederum keine Infektion mit aviären Bornaviren bei den Kontakttieren nachgewiesen (RUBBENSTROTH et al., 2014a).

Eine Ansteckung über infizierte Tiere ist also möglich, erfolgt aber offensichtlich nicht ohne Weiteres. Eine vertikale Übertragung des Virus über das Ei ist bislang nicht hinreichend geklärt. In mehreren Studien wurde PaBV sowohl in Eiern von PaBV-positiven Elterntieren als auch in Embryonen und Schlüpflingen nachgewiesen. Lierz et al. (2011) wies in zwei von 30 abgestorbenen Embryonen verschiedener Papageienspezies PaBV-RNA in Gehirn und Drüsenmagen nach. Sie wiesen eine geringe Viruslast auf (Ct Werte 31,41 und 35,1), PaBV-Antigen konnte mittels Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden. Daraufhin wurden die Elterntiere (*Cacatua leadbeateri* und *Amazona viridigenalis*) dieser zwei Embryonen beprobt und wiesen eine manifeste PaBV-Infektion auf (LIERZ et al., 2011). Monaco et al. (2012) untersuchten 61 Eier von zwei Beständen mit nachgewiesener PaBV-Infektion, von denen zehn PaBV-RNA enthielten (*Agapornis spp.*, *Nymphicus hollandicus* und *Psittacula krameri*). Je nach Entwicklungsgrad des Eies wurden Eiklar, Eigelb oder Gehirnproben der Embryonen zur Untersuchung herangezogen. Ein fünf Wochen alter, von Hand aufgezogener Schlüpfling wies ebenfalls PaBV-RNA in einer Kloakentupferprobe auf (MONACO et al., 2012). In einer Studie von Kerski et al. (2012) wurden vier PaBV-positive Elternpaare (*Aratinga solstitialis*) und deren Gelege untersucht. Von 16 gelegten Eiern wurden 14 von den Eltern über 20 Tage lang bebrütet und dann zum Schlüpfen in einen Inkubator verbracht. Ein Ei wurde nicht bebrütet, sondern zur Untersuchung des Eigelbs auf IgY verwendet. Dabei wurden spezifische Antikörper gegen PaBV nachgewiesen. Vier Embryonen starben während der Bebrütung bei den Eltern ab (an Tag 4 und 8), und bei allen vier wurde PaBV-RNA nachgewiesen. Sechs Embryonen starben an Tag 22 ab. Davon wiesen vier PaBV-RNA in Gehirn und Leber auf, zwei Embryonen waren negativ. Von vier Küken, die zum Schlupf kamen, starben zwei nach einer Woche bzw. nach elf Wochen. Das elf Wochen alte Küken sowie die zwei überlebenden Küken

wiesen PaBV-RNA in Gehirn und Leber bzw. in Feder- und Blutproben auf. Das Küken, das nach einer Woche verstarb, wurde aufgrund von Autolyse nicht untersucht. Spezifische Antikörper gegen PaBV wurden sowohl im Eiklar als auch in Blutproben der Embryonen und Schlüpflinge nachgewiesen (KERSKI et al., 2012). Auch in der Studie von Rubbenstroth et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass in Embryonen CnBV-positiver Kanarienvögel CnBV-RNA nachgewiesen werden kann. Dazu wurden 14 experimentell infizierte Kanarienvögel und fünf Kontakttiere über 23 Wochen überwacht. In diesem Zeitraum legten sie 29 Eier. Hierbei legten nur die experimentell infizierten Hennen mit einer persistierenden CnBV-Infektion und hoher Virusausscheidung Eier mit CnBV-RNA-positiven Embryonen. Hennen, die intermittierend CnBV-RNA ausschieden, und Hennen aus der Kontaktgruppe legten im Untersuchungszeitraum ausschließlich CnBV-RNA-negative Eier. Wie in der Studie von Lierz et al. (2011) wurde in den Embryonen weder CnBV-Antigen noch infektiöses Virus mittels Immunhistochemie oder Virusisolierung auf QM7-Zellen (*Quail smooth muscle cells*) in den Embryonen nachgewiesen (RUBBENSTROTH et al., 2013). Eine persistierende Infektion der Embryonen oder Küken konnte in keiner der Studien nachgewiesen werden. Einige der Autoren werfen somit die Frage auf, ob durch die Handaufzucht von Küken Bornavirus-positiver Eltern negative Nachzuchten möglich seien (LIERZ et al., 2011; KERSKI et al., 2012). Monaco et al. (2012) geben aber zu bedenken, dass sich aus Embryonen, deren Immunsystem sich schon im Ei mit aviären Bornaviren auseinandersetzen musste, möglicherweise latent infizierte Dauerausscheider entwickeln könnten (MONACO et al., 2012).

Ob sich die verschiedenen Virusvarianten unterschiedlich in verschiedenen Vogelspezies verhalten, ist bislang nicht näher untersucht. Die o.g. Studie von Rubbenstroth et al. (2012) zeigt unterschiedliche Wachstumseigenschaften der PaBV-Varianten bei der Anzucht auf Zelllinien auf (RUBBENSTROTH et al., 2012). Inwiefern die Ergebnisse auf den lebenden Organismus übertragen werden können, ist nicht hinreichend geklärt. In den bislang publizierten Infektionsversuchen mit Papageien wurde PaBV-4 (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010; RINDER et al., 2014) und PaBV-2 (MIRHOSSEINI et al., 2011) zur

Inokulation verwendet. Studien zum Einfluss der Virusvariante auf den Infektionsverlauf, die unter ähnlichen Bedingungen stattgefunden haben und somit vergleichbar wären, fehlen in der verfügbaren Literatur vollständig.

Hinsichtlich der Pathogenese verursachen aviäre Bornaviren ebenso wie die Bornaviren der Säugetiere keine zytopathischen Effekte (HOPPES et al., 2013) und führen ebenso zu einer nicht-eitrigen Entzündung von Ganglien und Nerven, jedoch nicht nur im ZNS, sondern auch im peripheren Nervensystem des oberen Magen-Darm-Trakts (HONKAUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). Die Arbeitsgruppe von Rossi und Kollegen untersuchte PDD erkrankte Vögel auf Anti-Gangliosid-Antikörper und stellte die These einer Autoimmunreaktion im Sinne eines Guillain-Barré-Syndromes auf. Es konnte jedoch nur eine geringe Übereinstimmung sowohl mit dem Auftreten einer PDD als auch mit dem Nachweis von PaBV nachgewiesen werden (ROSSI et al., 2011). Reuter et al. (2010) fanden heraus, dass aviäre Bornaviren ähnlich den Bornaviren der Säugetiere eine Strategie entwickelt haben, um das Immunsystem des Wirtes zu umgehen. Anhand PaBV-2 und PBV-4 infizierter Wachtelzellen (QM7 und CEC-32) wiesen sie nach, dass PaBV keine Immunantwort im Sinne einer Synthese von Interferon- α (IFN- α) auslöst. Anders als viele andere RNA-Viren wie z.B. Influenzaviren, blockiert PaBV aber keine Signalkaskade, die letztendlich zu der Synthese von IFN- α führen würde. Aufgrund der nachgewiesenen Empfänglichkeit von PaBV gegenüber 5'-monophosphat-spezifischer RNase gehen die Autoren davon aus, dass PaBV ebenso wie BoDV das 5'Ende seiner genomischen RNA verkürzt und somit von Immunrezeptoren wie RIG-I nicht erkannt wird (REUTER et al., 2010). Aufgrund vieler Ähnlichkeiten mit BoDV wird angenommen, dass auch bei einer Infektion mit aviären Bornaviren immunpathologische Prozesse zum Ausbruch der Erkrankung führen (HOPPES et al., 2013). Studien zur Immunpathogenese, wie sie beim *Mammalian 1 bornavirus* existieren, fehlen zu aviären Bornaviren bisher aber noch.

Solange der genaue Übertragungsweg noch ungeklärt ist, wird Zuchtbeständen empfohlen, insbesondere Neuzugänge auf aviäre Bornaviren zu untersuchen und die infizierten von den nicht infizierten Tieren zu separieren (LIERZ et al., 2010).

Durch diese Maßnahmen sowie durch die Einhaltung strikter Hygienevorschriften konnte die Infektion eines wertvollen Spix-Ara-Bestandes bereits nachhaltig eingedämmt werden (ENDERLEIN et al., 2011).

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen einer Infektion mit zwei verschiedenen Varianten des *Psittaciform 1 bornavirus* und der Erkrankung an PDD anhand einer statistisch relevanten Versuchstierzahl. Dabei soll jeweils der Infektionsverlauf eines PaBV-2- und eines PaBV-4-Isolates mittels Serokonversion und Virusausscheidung über einen Zeitraum von mehreren Monaten dargestellt werden. Gleichzeitig können durch den nahezu identischen Versuchsaufbau mögliche Virulenzunterschiede zwischen den Isolaten untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden juvenile Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) aus dem Zuchtbestand der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der JLU Gießen verwendet, die zufällig ausgewählt wurden. Dieser Bestand wird regelmäßig auf *Psittaciform 1 bornavirus*, Psittazines Herpesvirus, Aviäres Polyomavirus, Psittazines Circovirus und Chlamydien mittels PCR und Serologie getestet. Das Alter der Nymphensittiche bei Versuchsbeginn lag zwischen 44 und 137 Tagen bei Versuch I und zwischen 106 und 235 Tagen bei Versuch II. Da das Geschlecht phänotypisch beim Nymphensittich meist erst nach der Jugendmauser mit ca. neun Monaten äußerlich unterscheidbar ist, erfolgte die Geschlechteraufteilung auf die Gruppen zufällig.

Vor Versuchsbeginn wurde bei allen Nymphensittichen eine klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt sowie von jedem Tier eine Röntgenaufnahme (Übersichtsaufnahme in latero-lateraler und ventro-dorsaler Projektion) angefertigt. Es wurden Tupferproben aus Rachen, Kropf und Kloake für eine bakteriologische Untersuchung (Durchführung s. 3.3.5) entnommen. Zum Ausschluss parasitärer Erkrankungen wurden Kotproben aller Tiere parasitologisch mittels Flotationsverfahren untersucht. Von jedem Tier wurden Kropf- und Kloakentupfer zur Untersuchung auf PaBV-RNA (s. 3.3.3.1) entnommen sowie 0,3 ml Blut aus der *Vena jugularis* zur Untersuchung auf spezifische Antikörper gegen PaBV (s. 3.3.3.2) sowie gegen Paramyxovirus-1. Nach vier Wochen wurde die Untersuchung auf PaBV wiederholt. In den Versuchen wurden ausschließlich Nymphensittiche eingesetzt, die in allen Untersuchungen negativ waren und deren klinische Untersuchung ohne besonderen Befund verlief.

Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Geschäftszeichen V 54 - 19 c 20 15(1) GI 18/9 Nr. 2/2010 mit Verlängerung unter dem Geschäftszeichen GI 20/10 am 22.08.2011 genehmigt.

3.1.2 Haltung in Isolatoren

In beiden Versuchen befanden sich die Nymphensittiche während der gesamten Versuchsdauer in Isolatoren der Firma Montair Process Technology² (Modell HM1500, Innenmaße: 150 x 80 x 63 cm). Dabei wurde jeweils eine Infektionsgruppe (n = 9) in einem Isolator gehalten. In Versuch I wurden die Nymphensittiche in handelsüblichen Käfigen (Maße ca. 40 x 40 x 60 cm) in den Isolatoren untergebracht (je 3-4 Tiere/Käfig). Jeder Käfig wurde mit ausreichend Sitzstangen sowie Wasser- und Futternapfen ausgestattet. Für Versuch II wurden die Isolatoren tiergerechter umgebaut, um den Vögeln mehr Platz zum Fliegen zu bieten und eine Schwarmhaltung zu ermöglichen. Hier wurde jede Infektionsgruppe frei in einem Isolator gehalten. In jeden Isolator wurde eine Kunststoff-Nippeltränke installiert und ein Futterautomat aus rostfreiem Edelstahl, der mit handelsüblichem Großsittichfutter ohne Sonnenblumenkerne (Versele Laga®) *ad libitum* befüllt wurde. Das Bodengitter wurde mit dicken Zellstofflagen ausgelegt um eine regelmäßige Reinigung durch Entnahme der oberen Lagen durchführen zu können. Als Sitzstangen dienten Apfelbaumäste unterschiedlicher Dicke und Länge, die zuvor autoklaviert wurden. Sie wurden mittels Haken und Tesa Powerstrips® an den Wänden der Isolatoren in unterschiedlicher Höhe befestigt. Desweiteren wurden je zwei Nistkästen in jedem Isolator angebracht, um den Tieren bei Bedarf ein natürliches Eiablage- und Brutpflegeverhalten zu gewährleisten. Durch morgendliches An- und abendliches Abschalten der Beleuchtung zur gleichen Uhrzeit wurde den Tieren ein natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus von ca. 12 Stunden ermöglicht. Die Luftstromrate innerhalb der Isolatoren betrug 7 – 10 m³/h und die Temperatur 22 - 23°C. Zum Einfangen der Tiere für die Probenahme wurden handelsübliche Kescher verwendet.

² Montair Process Technology B.V., Heuvelsestraat 14, 5976 NG Kronenberg, Niederlande



Abbildung 6: Haltung der Versuchstiere in Versuch I und Versuch II

Links: Haltung der Versuchstiere in Versuch I in Käfigen, rechts: Haltung der Versuchstiere in Versuch II in Gruppenhaltung frei im Isolator

3.2 Versuchsablauf

3.2.1 Infektionsrouten

In der Literatur ist über Infektionsversuche mit dem *Mammalian 1 Bornavirus* bei Lewis-Ratten beschrieben, dass eine Virusreplikation und -ausbreitung nach intrazerebraler Infektion am schnellsten und effektivsten erfolgte und auch nach intranasaler und intramuskulärer Applikation eine persistierende Infektion gelang (NARAYAN et al., 1983a; CARBONE et al., 1987; MORALES et al., 1988) während nach intravenöser Infektion keine Virusreplikation beobachtet wurde (NARAYAN et al., 1983b). Da in den vorliegenden Versuchen ein größtmöglicher Unterschied zwischen den Inokulationsrouten erreicht werden sollte und um die Versuchstierzahl so gering wie möglich zu halten, wurden die Inokulationsrouten „intrazerebral“ und „intravenös“ in Anlehnung an die BoDV-Literatur ausgewählt. Es wurde jeweils ein Infektionsversuch mit PaBV-4 und ein Infektionsversuch mit PaBV-2 nach gleichem Schema durchgeführt. Die Inokulationen wurden

ausschließlich unter Inhalationsnarkose (Isofluran³, Einleitung 5 %, Erhaltung 2,5 %) durchgeführt. Bei der intrazerebralen Infektion wurde jeweils 0,1 ml der Virussuspension mittels Insulinspritze subdural durch die Okzipitalregion des Schädelknochens injiziert. Bei der intravenösen Infektion wurde 0,1 ml der Virussuspension intravenös in die *Vena jugularis* appliziert. Direkt nach der Infektion wurden die Tiere in die Isolatoren gesetzt und bis zur vollständigen Rekonvaleszenz aus der Narkose überwacht.

3.2.2 Statistische Berechnung der benötigten Versuchstierzahl

Die statistische Fallzahlberechnung wurde von Herrn Dr. rer. nat. Klaus Failing, Leiter der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, durchgeführt. Der Berechnung lag das Programm „N“, Version 2,2, der Firma idv – Datenanalyse und Versuchsplanung⁴ zugrunde. Der Berechnung der Anzahl der für die jeweiligen Versuche benötigten Tierzahlen pro Gruppe wurden von Herrn Dr. Failing stets folgende Parameterwerte zugrunde gelegt:

α (Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art) = 0,05

β (Fehlerwahrscheinlichkeit 2. Art) = 0,1

p1 (zu erwartende Erkrankungsrate der via intrazerebraler Injektion infizierten Tiere) = 0,9

p2 (zu erwartende Erkrankungsrate der via intravenöser Injektion infizierten Tiere) = 0,1

Hieraus ergab sich unter Anwendung des Programms N zum Vergleich von zwei Binomialwahrscheinlichkeiten bei einseitiger Betrachtungsweise ein erforderlicher Stichprobenumfang von $n = 9$ Nymphensittichen pro Gruppe. Dies ergibt eine Gesamtzahl von $n = 18$ Nymphensittichen für jeden Versuch.

³ Actavis Deutschland GmbH & Co.KG, 40764 Langenfeld

⁴ idv – Datenanalyse und Versuchsplanung, Dr. Volker W. Rahlfs, Wessobrunner Str.6, D-82131 Gauting

3.2.3 Versuche

Es wurden zwei Versuche durchgeführt, in denen jeweils neun Nymphensittiche intravenös (iv) und neun Nymphensittiche intrazerebral (ic) mit PaBV-4 (Versuch I) bzw. mit PaBV-2 (Versuch II) infiziert wurden. In beiden Versuchen wurde ein nichtinfizierter Nymphensittich als Sentineltier (se) in die Gruppe der intrazerebral infizierten Tiere gesetzt (Abbildung 7, Gruppenübersicht s. Tabelle 2 und Tabelle 3). In Versuch I wurden die Tiere insgesamt 229 bzw. 230 Tage überwacht. An Tag 115 und 116 *post infectionem* wurden aus jeder Gruppe je drei Tiere euthanasiert. In Versuch II wurden die Nymphensittiche 231 Tage überwacht.

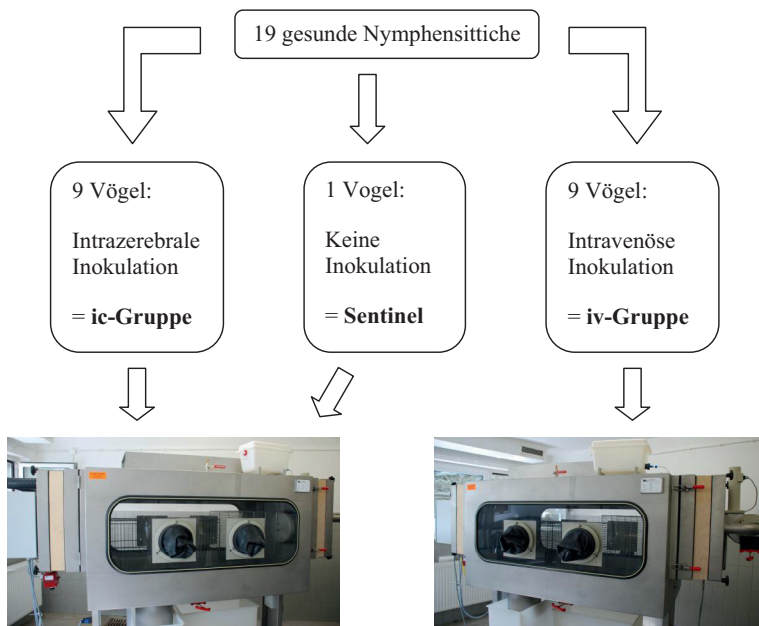


Abbildung 7: Versuchsaufbau

Tabelle 2: Einteilung der Versuchstiere für Versuch I (PaBV-4)

Tier-Nr.	Ring-Nr.	Geschlecht	Alter (Tage)	Gruppe
ic1	AZ 1937 960	w	137	i.c.
ic2	AZ 1937 969	w	121	
ic3	AZ 1937 957	w	137	
ic4	AZ 1937 967	w	137	
ic5	AZ 1937 971	w	121	
ic6	AZ 1937 963	m	137	
ic7	AZ 1937 953	m	137	
ic8	AZ 1937 965	w	137	
ic9	o.R.	m	44	
iv1	AZ 1937 961	w	137	i.v.
iv2	AZ 1937 955	w	137	
iv3	AZ 1937 968	m	137	
iv4	AZ 1937 959	m	137	
iv5	AZ 1937 970	w	121	
iv6	AZ 1937 972	w	121	
iv7	AZ 1937 956	m	137	
iv8	AZ 1937 964	m	137	
iv9	o.R.	w	44	
se1	AZ 1937 958	m	137	Sentinel (ic)

Tabelle 3: Einteilung der Versuchstiere für Versuch II (PaBV-2)

Tier-Nr.	Ring-Nr.	Geschlecht	Alter (Tage)	Gruppe
ic10	Z III 1973 722	m	233	i.c.
ic11	Z III 1973 724	w	216	
ic12	Z III 1973 727	w	212	
ic13	Z III 1973 730	w	196	
ic14	Z III 1973 739	w	168	
ic15	Z III 1973 740	w	182	
ic16	Z III 1973 746	w	175	
ic17	Z III 1973 747	m	164	
ic18	Z III 1973 749	m	106	
iv10	Z III 1973 719	m	235	i.v.
iv11	Z III 1973 725	w	212	
iv12	Z III 1973 729	m	196	
iv13	Z III 1973 732	w	196	
iv14	Z III 1973 733	m	202	
iv15	Z III 1973 734	w	202	
iv16	Z III 1973 742	m	161	
iv17	Z III 1973 745	m	175	
iv18	Z III 1973 748	w	133	
se2	Z III 1973 728	m	196	Sentinel (ic)

Die Tiere wurden täglich tierärztlich in Augenschein genommen. Dabei wurde besonders auf folgende Symptome geachtet:

Allgemeine klinische Symptome:

- Aufplustern
- Apathie
- Schläfrigkeit

Gastrointestinale Symptome:

- Regurgitieren, Erbrechen
- Abmagerung
- Auftreten unverdauter Körner im Kot
- Diarrhoe

Neurologische Symptome:

- Diskoordination
- Ataxie
- Tremor
- Opisthotonus, Torticollis
- Krämpfe

Einmal wöchentlich wurde den Nymphensittichen 0,3 ml Blut mittels steriler Insulinspritze aus der *Vena jugularis* entnommen, das sofort in Lithium-Heparin-Röhrchen überführt wurde. Alle zwei bzw. drei Tage wurden Tupferproben mittels steriler Watteträger aus Kropf und Kloake je Tier entnommen (Abbildung 8), die je Tier gepoolt untersucht wurden. Die Tupferprobenentnahme wurde mit der wöchentlichen Blutprobenentnahme koordiniert, um den Stress für die Tiere möglichst gering zu halten. Sobald bei allen infizierten Tieren PaBV-RNA nachweisbar war, wurden Tupferproben nur noch einmal wöchentlich zusammen mit den Blutproben entnommen.



Abbildung 8: Blutproben- (links) und Tupferprobenentnahme (rechts) in den Isolatoren

Zeigten die Tiere ein mittel- bis hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden oder mittel bis hochgradig schwere allgemeine klinische Symptome (mittel- bis hochgradige Apathie, Anorexie, Kachexie), wurden sie durch Blutentzug aus dem Herzen in tiefer Inhalationsanästhesie euthanasiert.

Verstorbene Tiere wurden gewogen (euthanasierte Tiere in Narkose vor dem Blutentzug) und pathologisch-anatomisch untersucht. Bei jedem Vogel wurden Proben aus Herzblut, Leber und Lunge, sowie ggf. von Organveränderungen für eine bakteriologische und mykologische Untersuchung auf Nährmedien entnommen. Für eine mikroskopische Untersuchung auf Parasitenstadien wurden Abstriche von jeweils drei Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum und Colon) angefertigt. Zur Untersuchung auf Hefepilze mittels Methylenblaufärbung wurden Abstriche von der Mukosa des Kropfes und zur Untersuchung auf *Macrorhabdus ornithogaster* mittels Giemsa-Färbung wurden Abstriche von der Mukosa des Drüsenmagens angefertigt. Für die histologische Untersuchung, den Nachweis von PaBV-RNA und den Nachweis von PaBV-Antigenen wurden folgende Organproben entnommen: Gehirn, Augen, Rückenmark, *Nervi ischiadici*, Nebennieren, Herz, Leber, Nieren, Milz, Pankreas, Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, Darm, Brustmuskulatur und Haut mit Federn. Für die

Virusisolierung wurden Proben von Gehirn und Retina entnommen. Proben für die Untersuchung mittels PCR und für die Virusisolierung wurden direkt bei -80°C gelagert, Proben für die histopathologische und immunhistochemische Untersuchung wurden direkt nach der Entnahme in Gefäße mit 5 %-igem Formalin überführt.

3.2.4 Kontrollgruppe

Eine Kontrollgruppe von vier Nymphensittichen wurde als mockinfizierte Gruppe mit virusfreier CEC-32 Zellsuspension jeweils intravenös (n = 2) und intrazerebral (n = 2) inokuliert. Diese Tiere wurden in einem separaten Raum in einem handelsüblichen Vogelkäfig (Maße 50 x 120 x 50) gehalten und 100 Tage überwacht. Auch ihnen standen Futter (Versele Laga® Großsittichmischung ohne Sonnenblumenkerne) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Einmal wöchentlich wurden Kropf- und Kloakentupferproben für den Nachweis von PaBV-RNA (s. 3.3.3.1) sowie 0,3 ml Blut aus der *Vena jugularis* zum Nachweis PaBV-spezifischer Antikörper (s. 3.3.3.2) entnommen. Euthanasie, Sektion und Probenahmen *post mortem* fanden am Ende der Versuchsperiode in gleicher Weise wie bei den infizierten Tieren statt.

3.3 PaBV-Isolate

3.3.1 Herkunft der PaBV-Isolate

3.3.1.1 PaBV-4-Isolat

Das PaBV-4-Isolat für Versuch I (interne Labornr. 1068/09) wurde aus Gehirnmaterial eines 17 Jahre alten hellroten Ara (*Ara macao*) gewonnen, der zuvor hochgradig abgemagert und verstorben war. Histopathologisch wurde eine Psittazine Drüsenmagendilatation (PDD) diagnostiziert und in Proben aus Gehirn und Drüsenmagen wurde PaBV-4-RNA nachgewiesen.

3.3.1.2 PaBV-2-Isolat

Das PaBV-2-Isolat für Versuch II (interne Labornr. 1371/09) wurde aus Gehirnmaterial eines sechs Monate alten Nymphensittichs (*Nymphicus hollandicus*) gewonnen. Pathologisch-anatomisch fiel ein hochgradig dilatierter Drüsenmagen auf. Das Tier war hochgradig abgemagert und im gesamten Magen-

Darm-Trakt befanden sich unverdaute Körner. Auch bei diesem Tier wurde histopathologisch eine PDD diagnostiziert und PaBV-2-RNA im Organmaterial nachgewiesen.

3.3.2 Virusanzucht, Herstellung der Virusinokulate und Sequenzierung

Die Herstellung der Virusisolate wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sibylle Herzog am Institut für Virologie⁵ durchgeführt.

Für die Gewinnung der Virusisolate wurde das jeweilige Gehirnmateriale in GIBCO Glasgow Minimum Essential Medium BHK-21 1x⁶ mit 2 % fetalem Kälberserum durch Ultraschall zu einer 10 %igen Gehirnsuspension aufgeschlossen und bei 1000g für 10 Minuten zentrifugiert. Mit dem jeweiligen Virusüberstand wurden Zellen der Wachtelzelllinie CEC-32 infiziert und alle vier Tage passagiert. Die persistent PaBV-infizierten Zellen der sechsten Passage wurden gewonnen und in Medium mit 2 % fetalem Kälberserum mit Ultraschall aufgeschlossen. Der durch Zentrifugation bei 1000g für 10 Minuten erhaltene Virusüberstand wurde aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Zur Bestimmung des Virustiters wurde ein Aliquot aufgetaut und eine 10fache Verdünnungsreihe in Medium mit 10 % fetalem Kälberserum hergestellt. Jede Virusverdünnung wurde mit dem entsprechenden Volumen einer CEC-32-Zellsuspension auf Chamberslides⁷ für sechs Tage bei 37°C inkubiert. Die mit Aceton fixierten Zellen wurden mit einem polyklonalen anti-BoDV-Serum von der Ratte inkubiert, das mit PaBV kreuzreagiert (HERZOG et al., 2010). Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde durch einen anti-Spezies-Antikörper, der mit dem Fluorochrom Fluoreszein-Isothiocyanat gekoppelt ist (anti-Ratte-IgG FITC-Konjugat⁸; 1:50 verdünnt in Immunoblockpuffer⁹) nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 492 nm und einer

⁵ Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, BFS Schuberstr. 81, 35392 Gießen

⁶ Invitrogen, Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA49RF, UK

⁷ Nunc A/S, Kamstrupvej 90, Postbox 280, 4000 Roskilde, Dänemark

⁸ Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., 872 West Baltimore Pike West Grove, PA USA, 19390

⁹ Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe

400-fachen Vergrößerung. Als spezifische Reaktion wurde eine brillante granuläre Fluoreszenz im Nukleus angesehen.

Die Virussuspension für die Infektion wurde mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung auf den entsprechenden Infektionstiter verdünnt. Die in den Versuchen verwendeten Infektionstiter wurden in Anlehnung an publizierte Versuche mit BoDV ausgewählt (NARAYAN et al., 1983b). Das Inokulat 1068/09 (PaBV-4, Versuch I) wurde zur Infektion der Tiere mit einem infektiösen Titer von 10^3 ID₅₀/Vogel verwendet. Das Inokulat 1371/09 (PaBV-2, Versuch II) wurde zur Infektion der Tiere mit einem infektiösen Titer von 6×10^2 ID₅₀/Vogel verwendet. Die Unterschiede der Infektionstiter ergaben sich aus Unterschieden hinsichtlich der Wachstumseigenschaften der beiden Isolate in Zellkultur, die im Ergebnisteil (s. 4.1) näher erläutert werden.

Zur Isolierung viraler RNA wurden 200 µl virushaltiger Überstand verwendet. Dazu kam das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)¹⁰ nach genauer Anweisung des Herstellers zur Anwendung. Die RNA wurde mittels Hexamer Primern in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurde nach den Vorgaben von Kistler und Kollegen (KISTLER et al., 2008) eine konventionelle PCR für Sequenzen des L- und des N-Gens von PaBV durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese analysiert und mittels GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)¹¹ für die Sequenzierung aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde dann durch LGC Genomics¹² durchgeführt. Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden mit vorhandenen Daten mittels BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen.

¹⁰ Qiagen GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden

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

¹² LGC Genomics GmbH, Ostendstr. 25, TGS Haus 8, 12459 Berlin

3.3.3 Nachweis von PaBV

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

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) dient der Amplifizierung schon geringer Mengen Genommaterials. Zur Polymerisation wird hier die hitzestabile DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* verwendet, die sogenannte Taq-Polymerase. Bei der TaqMan-PCR handelt es sich um eine real-time-PCR, anhand der es möglich ist, die Menge an viraler Nukleinsäure im Ausgangsmaterial quantitativ mittels Fluoreszenz zu bestimmen. Der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz zum erstenmal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird anhand des Ct - Wertes (Ct = Cycle threshold) beschrieben. Je mehr virales Genommaterial im Ausgangsmaterial ist, desto weniger Zyklen werden benötigt, um eine signifikante Fluoreszenz nachzuweisen. Somit ist der Ct - Wert umso geringer, je mehr virales Genommaterial enthalten ist.

3.3.3.1.1 RNA-Extraktion

Die RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) aus den zu untersuchenden Proben isoliert. Die Kropf- und Kloakentupfer wurden einzeln in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Sie wurden mit 1,0 ml RLT Puffer (Qiagen, Hilden) angerieben um das in der Watte enthaltene Material zu lösen und in die Flüssigkeit auszuschwemmen.

Von jedem zu untersuchenden Organ (s. Kap. 3.2.3) wurde ein ca. 5 x 5 x 5 mm großes Stück in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Hinzugegeben wurde jeweils eine 5 mm Stahlkugel (Stainless Steel Beads, Qiagen, Hilden) sowie 1,0 ml RLT Puffer. Anschließend wurde im Tissue Lyser (Qiagen, Hilden) bei 50 Oszillationen/sec für drei Minuten das Gewebe zerkleinert. Grobe Bestandteile wurden danach mittels Zentrifuge (Modell Universal 32R, Hettich, Mülheim a.d. Ruhr) bei 3000 rpm für drei Minuten herunterzentrifugiert.

Jeweils 0,6 ml der Suspension/des Überstandes wurden anschließend in den Qia-Cube (Qiagen, Hilden) zur RNA-Extraktion überführt. Dabei wurden die Suspensionen der Kropf- und Kloakentupfer je Tier gepoolt untersucht. Hierzu wurde das Protokoll des Herstellers „RNeasy mini, animal tissues and cells, large

samples“ angewandt. Dabei wird die enthaltene RNA mittels Zugabe von 70 %-igem Ethanol vorerst auf die Bindung mit der Membran im *spin column* vorbereitet. Durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte unter Zugabe verschiedener Pufferlösungen (RW1, RPE, Qiagen, Hilden) bindet die RNA spezifisch an die Membran und Kontaminationen werden herausgewaschen. Zuletzt wird die RNA durch Zentrifugation mit RNase freiem Wasser eluiert. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.3.1.2 Reverse Transkription

Zur Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde ein Mastermix aus folgenden Reagenzien¹³ (Mengenangabe pro Probe) hergestellt:

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

Jeweils 10 µl des Mastermixes wurden mit 10 µl RNA in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Transkription erfolgte mittels Thermal Cycler (MJ Research PTC-200 DNA Engine Cycler, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) auf Grundlage folgendes Temperaturprotokolls: Nach einem Vorbereitungsschritt von 10 min bei 25°C erfolgte die Umschreibung in cDNA über 60 min bei 42°C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung auf -4°C gekühlt und anschließend bis zur Verwendung für die PCR bei -20°C gelagert.

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

3.3.3.1.3 Real-time –TaqMan-PCR, Etablierung einer neuen PaBV-2-detektierenden PCR

Folgende Reagenzien¹⁴ (Mengenangabe pro Probe) wurden zur Herstellung des Mastermixes verwendet:

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

Zum Nachweis der PaBV-4-RNA in Versuch I mittels real-time-PCR wurde das bereits publizierte Primerpaar „1034-1322“ und die dazugehörige Sonde verwendet (HONKAUORI et al., 2008). Als Positivkontrolle wurde hier der bereits publizierte Standard 1034 in einer Verdünnung von 10^{-1} bis 10^{-6} verwendet, ein Plasmid, in das das Zielgen einkloniert worden ist (HONKAUORI et al., 2008).

Zum Nachweis von PaBV-2-RNA in Versuch II (PaBV-2) wurden neue Primer und zugehörige Sonde konstruiert, da bislang keines der bekannten Protokolle das hier verwendete PaBV-2-Isolat erfasste. In Anlehnung an publizierte Sequenzen des P-Gens eines PaBV-4 Isolates (FJ169441) und eines PaBV-2-Isolates (EU781967) wurden mittels Software (MegAlign, LaserGene DNASTar, Madison (WI), USA) Primer und Sonde für PaBV-2 modifiziert (Vorwärtsprimer: 5'-CAGACAGCACGTCTCGAATGAGG-3'; Sonde: 6-FAM-5'-AGGTCTCCAAGAAGGAAGCGA-3'-TMR), der Rückwärtsprimer war identisch mit PaBV-4. Zur Überprüfung der Sensitivität diente eine Standardkurve, basierend auf dem Ausgangsmaterial des Inokulates in Verdünnungsschritten 10^{-1} bis 10^{-6} . Dabei wurde in Anlehnung an Honkavouri et al. (2008) davon ausgegangen, dass in der letzten Verdünnung noch 5 Kopien nachweisbar sind (HONKAUORI et al., 2008). Zur Überprüfung der Spezifität wurde die neu etablierte PaBV-2-PCR gegen PaBV-4 getestet.

¹⁴ Thermo Fisher Scientific Inc., 81 Wyman Street, Waltham MA 02454

Jeweils 20 µl Mastermix wurden mit 5 µl cDNA in ein Striptube gegeben. Als Negativkontrollen dienten jeweils ein Striptube mit 25 µl RNase freiem Wasser und ein Striptube mit 20 µl Mastermix und 5 µl RNase freiem Wasser. Anschließend wurden die Tubes in den Rotor des Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden) verbracht und die PCR mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: Nach einem Vorbereitungsschritt über 2 min bei 50°C folgte eine initiale Denaturierung über 10 min bei 95°C. Daraufhin folgten 45 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung über 15 sek bei 95°C und anschließend Anlagerung der Primer und Synthese des DNA-Doppelstranges (Annealing und Elongation) über 1 min bei 60°C. Die Auswertung der PCR-Läufe erfolgte mittels „Rotor-Gene Q Series Software“ der Firma Qiagen.

3.3.3.2 Antikörpernachweis mithilfe des indirekten Immunfluoreszenztests

Zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen PaBV-2 und PaBV-4 wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sibylle Herzog und Frau Dr. Hildburg Lange-Herbst am Institut für Virologie¹⁵ der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) angewandt. Dieser wurde in Anlehnung an bereits für BoDV publizierte Verfahren (NARAYAN et al., 1983b) für aviäre Bornaviren neu etabliert (HERZOG et al., 2010).

Persistent BoDV-1 (H1766 Pferdeisolat) infizierte Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK) Zellen wurden auf Multitest Objektträgern¹⁶ mit Aceton fixiert. Die zu untersuchenden Seren wurden ausgehend von einer 1:10 Verdünnung in Zweierpotenzen verdünnt und auf den Multitest Objektträgern für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Primärantikörper). Die Antikörper-Antigen-Reaktion wurde durch einen zweiten anti-Spezies-Antikörper, der mit dem Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelt ist (anti-bird-IgG FITC-Konjugat¹⁷; 1:50 verdünnt im Immunoblockpuffer), dem Sekundärantikörper, nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 492 nm und

¹⁵ Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, BFS Schuberstr. 81, 35392 Gießen

¹⁶ Dunn Labortechnik GmbH, Thelenberg 6, 53567 Asbach

¹⁷ Bethyl Laboratories, Inc., P.O. Box 850, Montgomery, Texas 77356, USA

bei einer 400-fachen Vergrößerung. Als spezifische Reaktion wurde eine brillante granuläre Fluoreszenz im Nukleus angesehen.

3.3.3.3 Antigennachweis mittels Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis von Virusantigenen mittels spezifischer Antikörper und wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Christiane Herden, Tierärztin Saskia Ressmeyer und Tierarzt Basim Al-Ibadi am Institut für Veterinär-Pathologie¹⁸ durchgeführt.

Es wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Methode angewandt. In dieser Methode wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper verwendet, die gegen das Phosphoprotein p24 oder das X-Protein p14 des BoDV gerichtet sind (HERDEN et al., 1999). Diese stellen sich im Zellkern als dunkelbraune Färbung dar. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die Organproben in 5 % gepufferten Formalin fixiert und anschließend in Paraffinwachs eingebettet. Knochen wurden zunächst einer Entkalkung unterzogen. Anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden unter Verwendung von Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert und entparaffiniert. Endogene Peroxidasen wurden durch Zugabe von Wasserstoffperoxid gehemmt. Es folgte eine Vorbehandlung mit Zitratpuffer zur Antigendemaskierung vor der anschließenden Inkubation mit dem Primärantikörper (polyklonaler Kaninchen-anti-BDV-p24-Antikörper, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Gießen). Nach einer Inkubation über Nacht folgte nach einem Wasch-Schritt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG) sowie nach einem weiteren Wasch-Schritt die Behandlung mittels VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) nach Herstellerangaben. Schließlich wurden die Schnitte zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion mit Chromogen-Diaminobenzidin gefärbt und zuletzt noch einmal dehydriert. Die Schnitte wurden bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet. Da in Versuch I (PaBV-4) bei Vogel iv3 keinerlei Phosphoprotein in den Organen nachgewiesen wurde, wurden die

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

Organe aller Vögel aus Versuch I zusätzlich auf das X-Protein p14 untersucht, nicht jedoch in Versuch II.

Zum Zeitpunkt, als die Ergebnisse aus Versuch I bereits publiziert waren, konnte die Methodik zum Antigennachweis mittels Immunhistochemie verfeinert und optimiert werden. Eine Nachuntersuchung der Organproben aus Versuch I ergab weitaus detailliertere Ergebnisse, die jedoch nicht mehr in der vorliegenden Dissertation berücksichtigt werden. Die aktuellen Ergebnisse werden ausführlich in einer anderen Dissertation (AL-IBADI 2015) dargelegt, sie verändern jedoch in keinsten Weise das Gesamtergebnis der Studie.

3.3.3.4 Virus-Reisolierung in CEC-32-Zellen

Die Reisoierung von infektiösem PaBV-2 oder -4 wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sibylle Herzog am Institut für Virologie¹⁹ durchgeführt.

Für die Reisolierung von PaBV-2 und PaBV-4 aus Organmaterial der Versuchstiere wurde jeweils ein 5 x 5 x 5 mm großes Stück aus Gehirn bzw. Retina verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Anzuchtergebnisse in Versuch II (s. 4.12.2) wurden zusätzlich Gewebeproben der Nieren zur Virusisolierung verwendet. Es wurde jeweils eine 10 %ige Organsuspension in GIBCO Glasgow Minimum Essential Medium BHK-21 1x²⁰ mit 2 % fetalem Kälberserum hergestellt, mit Ultraschall aufgeschlossen und bei 1000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Zellen der Wachtelzelllinie CEC-32 in Chamberslides²¹ für 6 Tage bei 37°C inkubiert. Die Virusreplikation konnte im Anschluss mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (s. 3.3.3.2).

3.3.3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung des aus den Versuchstieren reisolierten Virus erfolgte analog 3.3.2.

¹⁹ Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, BFS Schuberstr. 81, 35392 Gießen

²⁰ Invitrogen, Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA49RF, UK

²¹ Nunc A/S, Kamstrupvej 90, Postbox 280, 4000 Roskilde, Dänemark

3.3.4 Nachweis der Psittazinen Drüsenmagendilatation

3.3.4.1 Histopathologische Untersuchung

Zum Nachweis der lymphoplasmazellulären Infiltrate in Ganglienregion, die eine PDD belegen, wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Christiane Herden, Tierärztin Saskia Ressmeyer und Tierarzt Basim Al-Ibadi am Institut für Veterinär-Pathologie²² eine histopathologische Untersuchung aller entnommenen Organe durchgeführt.

Dazu wurden die Organproben in 5 % gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffinwachs eingebettet. Knochen wurden zunächst einer Entkalkung unterzogen. Anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung beurteilt und ausgewertet.

3.3.5 Bakteriologische und mykologische Untersuchung

Zum Ausschluss bakterieller Infektionen wurden die entnommenen Tupferproben aus Herzblut, Leber und Lunge mittels steriler Impfschlingen (Sarstedt, Nümbrecht²³) auf Colombia-Schafsblut-Agar- und Gassner-Agar-Platten (Oxoid, Wesel²⁴) aufgebracht. Diese Medien wurden für 48 Stunden bei 37°C bebrütet und einmal täglich auf Koloniewachstum überprüft. Gewachsene Kolonien wurden mithilfe bakteriologischer Standardmethoden bestimmt (HOLT et al., 1994).

Zum Ausschluss mykotischer Infektionen wurden jeweils Abklatschräparate eines jeden Drüsenmagens auf Kimmig-Agar-Platten (Oxoid, Wesel) angefertigt sowie von weiteren Organen/Strukturen, wenn diese Hinweise auf eine mykotische Infektion aufwiesen, wie z.B. Luftsackentzündungen. Die Platten wurden für fünf Tage bei Raumtemperatur bebrütet.

²² Institut für Veterinär-Pathologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 96, 35392 Gießen

²³ Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Sarstedtstraße, Postfach 1220, 51588 Nümbrecht

²⁴ Oxoid Deutschland GmbH, Am Lippegelais 4-8, 46483 Wesel

3.3.6 Färbungen

3.3.6.1 Methylenblaufärbung

Die Abstriche von der Mukosa des Kropfes wurden zur Untersuchung auf *Candida* spp. auf Objektträger gebracht und mittels Methylenblaufärbung nach Löffler untersucht. Dazu wurde der Glasobjektträger luftgetrocknet und hitzefixiert, im Anschluss für 3 min mit alkalischem Methylenblau gefärbt und mit *A. dest.* abgespült. Der getrocknete Objektträger wurde dann unter dem Mikroskop mit 1000 facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl untersucht und ausgewertet.

3.3.6.2 Giemsa-Färbung

Die Abstriche von der Mukosa des Drüsenmagens wurden zur Untersuchung auf *Macrorhabdus ornithogaster* auf Glasobjektträger gebracht und mittels Giemsa-Färbung (auch Azur-Eosin-Methylenblaulösung) untersucht. Dazu wurde der luftgetrocknete Objektträger zur Fixierung der Probe 5 min mit Methanol benetzt. Nach weiterer Lufttrocknung wurde der Objektträger mit Giemsa-Lösung mit Puffer Tritisol pH 7,2 (1:10 verdünnt) bedeckt. Diese wurde nach 10 min Einwirkzeit mit *A. dest.* abgespült. Der getrocknete Objektträger wurde bei 1000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl unter dem Mikroskop untersucht und ausgewertet.

3.3.7 Statistische Auswertung

Um Unterschiede zwischen den Inokulations- oder Versuchsgruppen zu untersuchen, wurden der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Als statistisch signifikant galten Werte für $\alpha \leq 0,01$ und als auffällig galten Werte für $\alpha \leq 0,05$. Zusammenhänge in Versuch II wurden mittels Korrelationskoeffizienten ermittelt mit $r = 1$ für einen linearen Zusammenhang auf einer steigenden Geraden und mit $r = -1$ für einen linearen Zusammenhang auf einer fallenden Geraden sowie $r = 0$ für keinen linearen Zusammenhang. Zur Vereinfachung wurden die Ct-Werte als $1/Ct$ dargestellt. Statistische Berechnungen zu Ergebnissen wurden mit Hilfe des Programms „Microsoft Office Excel 2007“ durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumseigenschaften der Isolate in Zellkultur

Bei der Anzucht der Isolate zeigte sich bereits ein Unterschied in der Infektiosität für die Zellen. Während bei Inokulat 1068/09 (PaBV-4) nach der ersten Passage bereits über 90 % der Zellen infiziert waren, ließ sich das Inokulat 1371/09 (PaBV-2) sehr viel schwerer anzüchten. Nach der sechsten Passage waren ca. 70 % der Zellen infiziert und die Virussuspension wies einen Titer von 6×10^3 ID₅₀/ml auf. Dieser Virustiter konnte auch durch weitere Passagen nicht verbessert werden. Inokulat 1068/09 hingegen wies nach 6 Passagen einen Infektiositätstiter von 2×10^7 ID₅₀/ml auf.

4.2 Überprüfung der Isolate mittels Sequenzierung

Mittels BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden die aus den Isolaten gewonnenen Sequenzen für das jeweilige N-Gen und L-Gen mit vorhandenen Sequenzen verglichen.

Bei Inokulat 1068/09 für Versuch I wurde für beide Gensequenzen eine Übereinstimmung von 99 % mit PaBV-4 GenBank-Nr. EU781959.1 (L-Protein) und FJ002323.1 (N-Protein) (KISTLER et al., 2008) nachgewiesen.

Sequenz N-Protein, Inokulat 1068/09, PaBV-4, GenBank-Nr. KU234523:

```
1      ctcaacctg ggttggttcg ttgtacttg ctttattaac tactgacttt gaaagcccg
61     gcaaggagtt tatggaccag atcaaattag tagcaggatt tgcacagatg actactata
121    cgacaattaa ggagtatctt aatgagtga tggacgccac actaacaatt ccggctgtag
181    cacttgagat caaagagttc ttggatacga ccgcaaaact caaggcagaa cacggggaca
241    tgttcaagta cttagtgccc attcgccact ccgatgcaat taaacttgca ccaaggaatt
301    tcccaaaact agcatcagct gctttttatt ggagtaagaa agagaat
```

Sequenz L-Protein, Inokulat 1068/09, PaBV-4, GenBank-Nr. KU234522:

```

1      aataaatcga actgaccagt cctgaagaa tccactctt ggaacagagg ttcatcttg
61     tctccagtcc agatcattac cgcacacgt tcgagcacta cagtatgta agtcttgtaa
121    tctccaatca aaagaatatt ataagattt ccgctcgtgtg tccttcagc ctcaaattta
181    tccaatcggt gtgctgatcc gagcggctga aacaatagtt agagtgtta caatgacttg
241    ggggctcaat gatgtagtag agtcgctatc tctgcgcatc aggtatgcct taacaaatcc
301    gagggctcgg tcttacttag aactgcatac aacgtatcaa agaatacaca aacaagtatc
361    ctattctcgt gaggctgata taggacctaa aagactaggc gattatcaac taatgttctt
421    gcaatctttg gtgattatct ttaacgaaaa tgtgagctgt ctgttcatat ataactatt
481    ttggctgca

```

Bei Inokulat 1371/09 wurde für beide Gensequenzen eine 99% Übereinstimmung mit PaBV-2 (EU781967.1) nachgewiesen.

Sequenz N-Protein, Inokulat 1371/09, PaBV-2, GenBank-Nr. KM053282:

```

1      cgcaaccatg ggttggtca ttgtccttg cttgctaac taccgacttt gaaagccctg
61     gcaaagagtt tatggatcag atcaaaatag tggcagggtt tgcacaaatg accacataca
121    caacaatcaa agagtatctc aacgagtgtg tggatgccac attgacaatc cgggccgtag
181    cacttgaaat taaggagttt ctagtgttaa ctacaaagct aaaggcagag catgggggaca
241    tgtttaataa tcttggtgct attcgtcatt ccgacgcgat caagcttgcg ccaaggaaat
301    ttccaatttt agctcagct gctttttatt ggagtaagaa ggagaat

```

Sequenz L-Protein, Inokulat 1371/09, PaBV-2, GenBank-Nr. KM053283:

```

1      ggaataaatc gtactgatca atccttgaag aaccgcctcc ttggaacgga ggtttcattt
61     tgtcttcagt caagatctct tccgcacatc gtccgagcat tacaatacat tagacctgc
121    aattccaat caagagatta ttataagatt ttccgtcgcg tatctcttcc gcctcagatt
181    tacccaattg gagtgtgat tagagcagcc gagacaataa ttcgagtgat tacactgacc
241    tgggggctca atgatataat agattcactc tcccctgcaa ttcgatatgc tctgacaaac
301    cctagagtta gatcttatct tgaactacac ataacataac agaggattat acaacaagtg
361    tcttattgtc gtgaggctga tataggacca aagaaattag gtgattacca gtaattgttt
421    ttacaatcat tagttgttat ttttgataag aatttaagct gccttgctac gtataatcac
481    ttctagcag cc)

```

4.3 Erfolgskontrolle der PCR

4.3.1 Versuch I (PaBV-4)

Als Positivkontrolle wurde in Versuch I der bereits publizierte Standard 1034 in einer Verdünnung von 10^{-1} bis 10^{-6} (Standard 1034) verwendet (HONKAVUORI et al., 2008). In Versuch I wurde in allen Positivkontrollen PaBV-4-RNA nachgewiesen. In keiner der Negativkontrollen wurde PaBV-RNA nachgewiesen.

4.3.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II diente das Ausgangsmaterial des Inokulates als Positivkontrolle in Verdünnungsschritten 10^{-1} bis 10^{-6} (Standard 1371). In Versuch II waren die RNA-Gehalte der Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} des Standards 1371 sehr gering und nicht immer messbar. In keiner der Negativkontrollen wurde PaBV-RNA nachgewiesen. Die neu etablierte PaBV-2-PCR wies kein PaBV-4 nach. Mithilfe der neu etablierten PaBV-2-PCR war auch in Versuch II eine Quantifizierung des RNA-Gehaltes in den untersuchten Proben möglich (Abbildung 9).

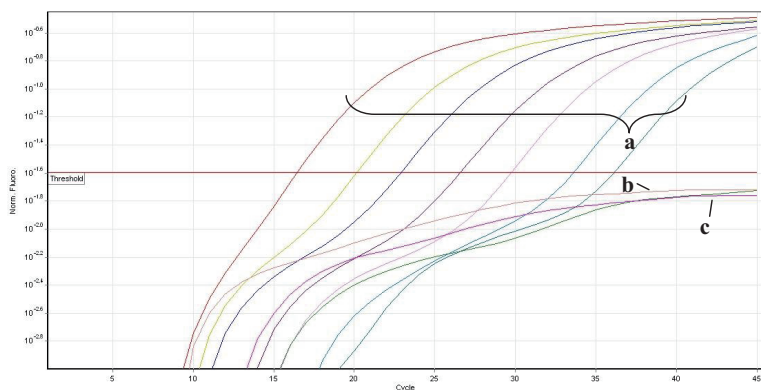


Abbildung 9: Darstellung der Ergebnisse der PaBV-2-real-time PCR

Positiver PaBV-2-RNA-Nachweis in Organmaterial des Nymphensittichs 1371/09 und deren Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} (a, v.l.n.r.), kein PaBV-2-RNA-Nachweis in der Negativkontrolle (RNase freies Wasser, b) sowie im PaBV-4-Isolat und dessen 1. Verdünnungsstufe 10^{-1} (c)

4.3.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II

Bei der Betrachtung der Ct-Werte der Standards in Tabelle 1 fällt auf, dass die Ct-Werte des Standards 1034 stets höher waren als bei Standard 1371 und dass die Werte der letzten beiden Verdünnungsstufen von Standard 1371 über dem publizierten Grenzwert von 36,0 liegen (HONKAVUORI et al., 2008). Aufgrund des Wissens dass die Verdünnung RNA enthalten muss, wurden diese Werte dennoch als positiv gewertet.

Tabelle 4: Vergleich der Ct-Werte der in der real-time-PCR verwendeten Standards (geometrischer Mittelwert von 10 PCRs)

Verdünnungsstufe	Versuch I Standard 1034 (Ct)	Versuch II Standard 1371 (Ct)
10^{-1}	15,24	24,16
10^{-2}	19,11	28,45
10^{-3}	23,59	31,50
10^{-4}	28,66	34,94
10^{-5}	31,85	38,93
10^{-6}	34,91	43,35

4.4 Klinische Beobachtungen

4.4.1 Versuch I (PaBV-4)

In Versuch I zeigten fünf der 18 infizierten Vögel klinische Symptome im Laufe des Versuchs, zwei Vögel starben plötzlich ohne vorangegangene Symptomatik (Tabelle 13). Erste Symptome traten hier 33 Tage pi auf. Hinsichtlich der Inkubationszeiten konnte zwischen den Inokulationsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (für $n_1 = 3$ und $n_2 = 4$ errechneter Wert $U = 4$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 1$ mit $\alpha = 0,2$).

ic2: Besonders auffällig war Vogel ic2 (Abbildung 10). Diese Henne zeigte als erstes Symptome (33 dpi) und den ausgeprägtesten Krankheitsverlauf. An Tag 33 pi erschien das Allgemeinbefinden der Henne zum ersten Mal reduziert. An Tag 37 pi wurden unverdaute Körner in ihrem Kot gefunden, und an Tag 41 pi traten

plötzlich epileptiforme Anfälle auf, die einige Sekunden andauerten. Davon erholte sich die Henne jedoch wieder. In den folgenden Tagen stellte sie aber allmählich die Futter- und Wasseraufnahme ein, verlor an Gewicht und wurde teilnahmslos. Aufgrunddessen wurde ic2 an Tag 60 pi euthanasiert.

iv3: Vogel iv3 wies am Tag 116 pi unverdaute Körner im Kot auf. Er wurde am Tag 116 pi euthanasiert.

iv1: Vogel iv1 zeigte ab Tag 126 pi eine leichte, kontinuierliche Gewichtsabnahme, blieb aber bei gutem Allgemeinbefinden bis zum Ende des Versuchs.

iv5: Vogel iv5 zeigte ab Tag 159 pi geringgradige Ataxien und unkoordinierte Kreisbewegungen. Diese schränkten die Henne jedoch nicht in der Futter- und Wasseraufnahme ein, sodass sie bis zum Versuchsende bei gutem Allgemeinbefinden blieb.

ic1: Vogel ic1 zeigte ab Tag 199 pi mittelgradige Ataxien und unkoordinierte Bewegungen. Diese verstärkten sich weiterhin sodass sich die Henne am Tag 206 pi nicht mehr auf dem Sitzast halten konnte und zu Boden fiel. Sie wurde am Tag 206 pi euthanasiert. **ic6, iv2:** Die Vögel ic6 und iv2 starben plötzlich während des Versuches am Tag 66 und 120 pi ohne vorangegangene Symptomatik. Am Ende des Versuches am Tag 229 und 230 pi wurden die übrigen Vögel sowie das Sentineltier (se1), die alle bei klinisch gutem Allgemeinbefinden waren, euthanasiert. Insgesamt erkrankten im Versuchsverlauf fünf Vögel (2 aus ic, 3 aus iv) und fünf Vögel (3 aus ic und 2 aus iv) starben oder mussten euthanasiert werden. Mittels Chi-Quadrat-Test lässt sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen nachweisen ($\chi^2 = 0,232$ ist kleiner als $\chi^2_{1;1-0,1} = 2,706$).



Abbildung 10: Charakteristische Symptome einer PDD

Henne ic2 in Versuch I: Reduziertes Allgemeinbefinden ab Tag 33 pi (links) und unverdaute Körner im Kot am Tag 37 pi (rechts).

Tabelle 5: Übersicht der klinischen Befunde in Versuch I

Klinische Beobachtungen	ic	iv
Auftreten erster Symptome (dpi)	33	116
Erkrankte insg.	2	3
Allgemeinschwäche	1	-
Gewichtsabnahme	1	1
Unverdaute Körner im Kot	1	1
Diarrhoe	-	-
ZNS-Symptome	2	1
Gestorben/Euthanasiert	3	2

Statistisch lässt sich hinsichtlich Inkubationszeit, Erkrankungs- und Sterberate kein Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen feststellen.

4.4.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II zeigten 12 der 18 inokulierten Vögel klinische Symptome (Tabelle 14). Diese waren zumeist unspezifisch. Erste Anzeichen einer Allgemeinschwäche traten hier bereits 22 Tage pi auf. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Inkubationszeiten zwischen den Inokulationsgruppen konnte auch hier nicht festgestellt werden (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Für $n_{1,2} = 6$ errechneter Wert $U = 17$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 9$ mit $\alpha = 0,2$).

Abhängig von Inkubationszeit und Erkrankungsverlauf bildeten sich in Versuch II drei unterschiedliche klinische Gruppen:

1. Perakuter bis akuter Krankheitsverlauf und Tod oder Euthanasie innerhalb des ersten Versuchsdrittels:

ic14: Bei Vogel ic14 traten am Tag 22 pi erste klinische Symptome in Form von Allgemeinschwäche auf. Diese Henne zeigte desweiteren eine mittelgradige Diarrhoe ab Tag 27 pi und wurde am Tag 32 pi morgens tot im Isolator aufgefunden.

iv13, iv11, iv15 und ic11: Diese Vögel zeigten einen ähnlichen Verlauf wie ic14 und starben (iv11) oder wurden innerhalb des ersten Drittels der Versuchsperiode euthanasiert (iv13, iv15, ic11). Alle vier Tiere zeigten eine Gewichtsabnahme sowie eine Verminderung des Allgemeinbefindens. Die Henne ic11 zeigte zusätzlich leichte Ataxien am Tag 32 pi (Abbildung 11).

2. Subakuter bis protrahierter Verlauf und Tod oder Euthanasie innerhalb des zweiten Versuchsdrittels

ic17: Der Hahn ic17 zeigte am Tag 83 pi eine leichte Allgemeinschwäche nach der Blutentnahme. Am Tag 84 pi lag er morgens tot im Isolator.

ic12, iv10, iv17 und iv18: Diese Vögel zeigten sowohl ein reduziertes Allgemeinbefinden als auch eine Gewichtsabnahme, ic12 war zusätzlich am Tag

85 pi geringgradig ataktisch. Vogel iv17 und iv10 wurden am Tag 88 bzw. 120 pi euthanasiert, Vogel ic12 und iv18 waren am Tag 86 bzw. 137 plötzlich verstorben.

3. Chronischer bis subklinischer Verlauf und Tod oder Euthanasie innerhalb des letzten Versuchsdrittels sowie gesund gebliebene Vögel bis zum Versuchsende.

ic13, ic16: Im letzten Versuchsdrittel wurde ein Versuchstier (ic13) am Tag 172 pi euthanasiert nachdem es ab Tag 139 pi eine allmähliche Reduktion des Allgemeinbefindens aufwies, ein weiterer Nymphensittich (ic16) zeigte ab Tag 85 pi ein reduziertes Allgemeinbefinden, erholte sich aber kurz darauf wieder und blieb bis zum Ende der Versuchsperiode klinisch unauffällig.

Insgesamt starben bis zum Versuchsende fünf Versuchstiere perakut und sechs wurden euthanasiert. Ein Vogel erholte sich wieder von seinen Symptomen. So blieben sechs infizierte Nymphensittiche und das Sentineltier (se2) klinisch symptomfrei. Mittels Chi-Quadrat-Test wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen festgestellt (Sterberate: $\chi^2 = 0,13$ ist kleiner als $\chi^2_{1;1-0,1} = 2,706$).



Abbildung 11: Perakuter bis akuter Krankheitsverlauf

Hochgradig reduziertes Allgemeinbefinden sowie hochgradige Apathie in Versuch II (links: iv13, rechts: ic11).

Tabelle 6: Übersicht der klinischen Befunde in Versuch II

Klinische Beobachtungen	ic	iv
Auftreten erster Symptome (dpi)	22	45
Erkrankte insg.	6	6
Allgemeinschwäche	6	6
Gewichtsabnahme	3	6
Unverdaute Körner im Kot	-	-
Diarrhoe	1	-
ZNS-Symptome	2	-
Gestorben/Euthanasiert	5	6

Inkubationszeit, Erkrankungsrate und Anzahl der gestorbenen/euthanasierten Vögel unterscheiden sich zwischen den Inokulationsgruppen nicht.

4.4.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4)

Erste klinische Symptome konnten nach 33 (Versuch I) bzw. 22 (Versuch II) Tagen pi beobachtet werden. Vergleicht man die Inkubationszeiten aller Vögel aus Versuch I mit denen aus Versuch II ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit $n_1 = 7$ und $n_2 = 12$ errechneter Wert $U = 22$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 21$ mit $\alpha = 0,1$). In Versuch I (PaBV-4) zeigten 5 der 18 inokulierten Vögel klinische Symptome, wohingegen in Versuch II (PaBV-2) 12 Vögel klinisch auffällig waren. Mittels Chi-Quadrat-Test zeigt sich, dass die Erkrankungsrate in Versuch II auffällig höher ist als in Versuch I ($\chi^2 = 5,46$ ist größer als $\chi^2_{1;1-0,02} = 5,41$). In Versuch I wies ein Vogel rein gastrointestinale Symptome in Form von unverdauten Körnern im Kot auf (iv3), zwei Vögel wiesen nur neurologische Symptome auf (iv5, ic1) und ein Vogel zeigte sowohl gastrointestinale als auch neurologische Symptome (ic2). Ein weiterer Vogel (iv1) wies einen starken Gewichtsverlust ohne weitere Symptomatik auf. Zur Hälfte der Versuchslaufzeit war erst ein Tier klinisch auffällig geworden und euthanasiert worden, und ein weiteres war plötzlich gestorben. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Infektion wurden deshalb an Tag 115 und 116 pi je drei Vögel pro Infektionsgruppe zufällig ausgewählt und

euthanasiert. In Versuch II waren die Symptome der Vögel unspezifischer. Alle 12 klinisch auffälligen Vögel wiesen allgemeine klinische Symptome wie Apathie und Schwäche auf. Davon zeigten neun Vögel eine Gewichtsabnahme. Nur ein Vogel zeigte spezifische gastrointestinale Symptome in Form von Diarrhoe (ic14) und zwei Vögel zeigten neurologische Symptome in Form einer leichten Ataxie (ic11, ic12). Einer der 12 klinisch auffälligen Vögel (ic16) erholte sich wieder und blieb bis zum Versuchsende unauffällig. Nach der Hälfte der Versuchslaufzeit waren in Versuch II bereits 10 Vögel klinisch auffällig und acht Vögel euthanasiert worden oder gestorben. Hinsichtlich der Gesamtzahl der euthanasierten bzw. gestorbenen Vögel im Versuchszeitraum lässt sich mittels Chi-Quadrat-Test ein auffälliger Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellen ($\chi^2 = 4,05$ ist größer als $\chi^2_{1;1-0,05} = 3,841$).

Tabelle 7: Übersicht der klinischen Beobachtungen in Versuch I und II

Klinische Beobachtungen	Versuch I (PaBV-4)	Versuch II (PaBV-2)
Auftreten erster Symptome (dpi)	33	22
Erkrankte insg.	5	12
Allgemeinschwäche	2	12
Gewichtsabnahme	2	9
Unverdaute Körner im Kot	2	-
Diarrhoe	-	1
ZNS-Symptome	3	2
Gestorben/Euthanasiert	5	11

Hinsichtlich der Inkubationszeit lässt sich statistisch kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ermitteln. Hinsichtlich der Erkrankungs- und Sterbe-/Euthanasierate aber zeigt sich ein auffälliger Unterschied zwischen PaBV-2 und PaBV-4.

4.4.4 Kontrollgruppen

In den Gruppen der nichtinfizierten sowie in den mockinfizierten Gruppen waren die Vögel während der gesamten Versuchsdauer bei gutem Allgemeinbefinden und guter Kondition.

4.5 Pathologisch-anatomische Veränderungen

4.5.1 Versuch I (PaBV-4)

Sieben der infizierten Vögel wiesen bei der Sektion einen dilatierten Drüsenmagen auf ([Tabelle 13](#)), davon waren drei aus der ic-Gruppe und vier aus der iv-Gruppe. Von denen hatten zuvor vier Vögel Symptome gezeigt (ic1, ic2, iv1 und iv3). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen festgestellt (Chi-Quadrat-Test bzgl. Anzahl der Vögel, die eine Drüsenmagendilatation aufwiesen: $\chi^2 = 0,174$ ist kleiner als $\chi^2_{1;1-0,1} = 2,706$). Drüsenmagen und Kropf von ic2 waren hochgradig dilatiert ([Abbildung 12](#)), ic1, iv1, iv2 und iv3 wiesen einen mittelgradig dilatierten Drüsenmagen auf und ic3 und iv4 einen geringgradig dilatierten Drüsenmagen. Alle anderen Tiere sowie das Sentineltier se1 waren makroskopisch unauffällig.

Tabelle 8: Übersicht über die pathologisch-anatomischen Befunde in Versuch I (PaBV-4)

Pathologisch-anatomische Befunde	ic	iv
Dilatierte Drüsenmägen insg.	3	4
Grad der Dilatation:		
hochgradig	1	-
mittelgradig	1	3
geringgradig	1	1



Abbildung 12: Pathologisch-anatomische Befunde in Versuch I (ic2)

Hochgradig dilatierter und futtergefüllter Kropf (links, Situs ohne Kopf, Haut abgezogen), hochgradig dilatierter Drüsenmagen mit unverdaulichen Körnern im gesamten Magen-Darm-Trakt (rechts).

4.5.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II wiesen 10 der 18 inokulierten Vögel einen dilatierten Drüsenmagen auf (Tabelle 10), davon waren vier aus der ic-Gruppe und sechs aus der iv-Gruppe. Auch in Versuch II wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen festgestellt (Chi-Quadrat-Test bzgl. Anzahl der Vögel, die eine Drüsenmagendilatation aufwiesen: $\chi^2 = 0,554$ ist kleiner als $\chi^2_{1;1-0,1} = 2,706$). Sieben der infizierten Vögel waren zum Zeitpunkt des Todes bzw. der Euthanasie hochgradig abgemagert (Abbildung 13). Dabei war der Drüsenmagen aller Vögel die innerhalb des ersten Drittels starben bzw. euthanasiert wurden, hochgradig dilatiert (ic11, ic14, iv11, iv13 und iv15, Abbildung 14). Zwei Vögel, die im zweiten Drittel des Versuches euthanasiert wurden (iv10 und iv17) sowie ic13 und ic16 (Euthanasie bei Versuchsende), wiesen einen mittelgradig dilatierten Drüsenmagen auf. Vogel iv16 (Euthanasie bei Versuchsende) zeigte eine geringgradige Dilatation des Drüsenmagens (Abbildung 14). Mit Ausnahme des Tieres iv16 zeigten alle Vögel, die eine Dilatation des Drüsenmagens aufwiesen,

zuvor klinische Symptome. Vier Vögel aus dem ersten Versuchsdrittel (alle außer ic14) sowie iv10, iv17 und iv18 aus dem zweiten Versuchsdrittel waren hochgradig abgemagert und wiesen ein Gewicht von 59 - 67 g auf. Vogel iv11 wies zusätzlich zu dem dilatierten Drüsenmagen eine ca. 1 cm große, runde, flache, speckig-gelbliche Auflagerung im linken Abdominalluft sack im Bereich der Nieren auf. Vier Vögel zeigten eine geringgradige follikuläre Hyperplasie der Milz (iv10, iv16, ic10 und ic16). Vogel ic16 wies zudem eine stark hyperplastische, braun-grünlich marmorierte Leber auf. Sieben der inokulierten Vögel und das Sentineltier se2 waren makroskopisch unauffällig.

Tabelle 9: Übersicht über die pathologisch-anatomischen Befunde in Versuch II (PaBV-2)

Pathologisch-anatomische Befunde	ic	iv
Dilatierte Drüsenmägen insg.	4	6
Grad der Dilatation:		
hochgradig	2	3
mittelgradig	2	2
geringgradig	-	1



Abbildung 13: Ernährungszustand der Vögel in Versuch II

Caudo-craniale Aufnahme der abgehäuteten Pectoralismuskulatur. Links: iv13, 59 g KGW 46 dpi; rechts: ic18, 95 g KGW 231 dpi.



Abbildung 14:
Drüsenmagen-
dilatation in
Versuch II

In Versuch II wiesen fünf Vögel einen hochgradig dilatierten Drüsenmagen auf.
(vo.li.n.re.: oben: ic14, iv15, iv13, unten: iv11 und ic11, alle aus Gruppe 1 „perakuter-akuter Verlauf“)

4.5.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4)

In Versuch II wiesen zehn Vögel einen dilatierten Drüsenmagen auf, im Gegensatz zu sieben Vögeln in Versuch I (siehe Tabelle 10). Mittels Chi-Quadrat-Test zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Anzahl der Vögel, die eine Drüsenmagendilatation aufwiesen ($\chi^2 = 1,004$ ist kleiner als $\chi^2_{1;1-0,1} = 2,706$). Auch bezüglich des Grades der Dilatation ist statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellbar (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Für $n_1 = 7$ und $n_2 = 10$ errechneter Wert $U = 20,5$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 17$ mit $\alpha = 0,1$).

Tabelle 10: Übersicht der pathologisch-anatomischen Befunde von Versuch I und II

(Grad der Dilatation subjektiv geschätzt)

Pathologisch-anatomische Befunde	Versuch I (PaBV-4)	Versuch II (PaBV-2)
Dilatierte Drüsenmägen insg.	7	10
Grad der Dilatation:		
hochgradig	1	5
mittelgradig	4	4
geringgradig	2	1

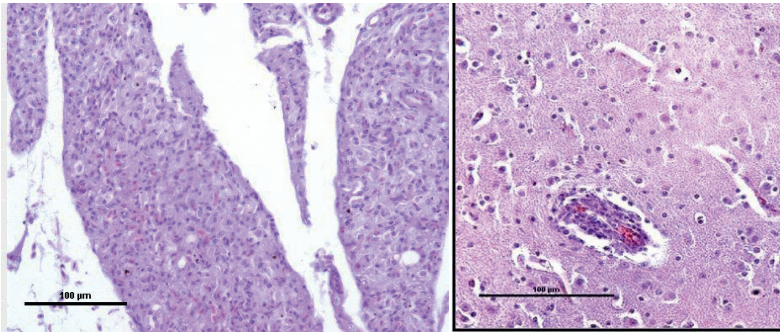
4.5.4 Kontrollgruppen

Alle Vögel der Kontrollgruppen waren makroskopisch unauffällig.

4.6 Histopathologische Untersuchungen

4.6.1 Versuch I (PaBV-4)

Histopathologisch konnte bei allen infizierten Vögeln eine PDD durch den Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Ganglienregionen des ZNS und/oder des oberen Magen-Darm-Traktes (Abbildung 15) bestätigt werden. Dabei fanden sich diese Infiltrate in 83,33 % der Gehirne, in 33,33 % der Rückenmarksproben, in 66,67 % der Kropfgewebe, in 72,22 % der Drüsenmägen, in 44,44 % der Muskelmägen und in 83,33 % der Darmproben. Bei Vogel ic7 wurden diese Infiltrate nicht im Magen-Darm-Trakt gefunden. Alle anderen infizierten Vögel wiesen Infiltrate sowohl im ZNS als auch im Magen-Darm-Trakt auf sowie einige in Niere, Leber, Milz, Pankreas, Herz und Haut mit unterschiedlicher Intensität (Tabelle 11). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen festgestellt hinsichtlich der Anzahl der Organe, in denen PDD-typische histopathologische Veränderungen nachgewiesen wurden (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Für $n_{1,2} = 14$ errechneter Wert für $U = 93$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 61$ mit $\alpha = 0,1$, s. Abbildung 16). Das Sentineltier se1 wies ebenfalls lymphoplasmazelluläre Infiltrate in Gehirn, Darm, Herz und Leber auf. Weitere histopathologische Befunde waren: Hämosiderose der Milz (ic1), granulomatöse Steatitis der Haut (se1), geringgradige Verfettung der Hepatozyten (iv2, ic4, ic8), geringgradige Tubulusverfettung der Niere (iv2, iv7), orthokeratotische Hyperkeratose des Kropfes (iv2) und geringgradige nichteitrigte Konjunktivitis (iv4).



Myenterische Ganglioneuritis im Muskelmagen (links) sowie Ganglioneuritis im Gehirn (rechts) PaBV-4-infizierter Nymphensittiche aus Versuch I nach HE-Färbung (Fotos: Institut für Veterinärpathologie Gießen)

Darstellung sortiert nach Todes-/Euthanasiezeitpunkt, aufsteigend von links nach rechts (+ = Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate, - = kein Infiltratnachweis)

[illegible]

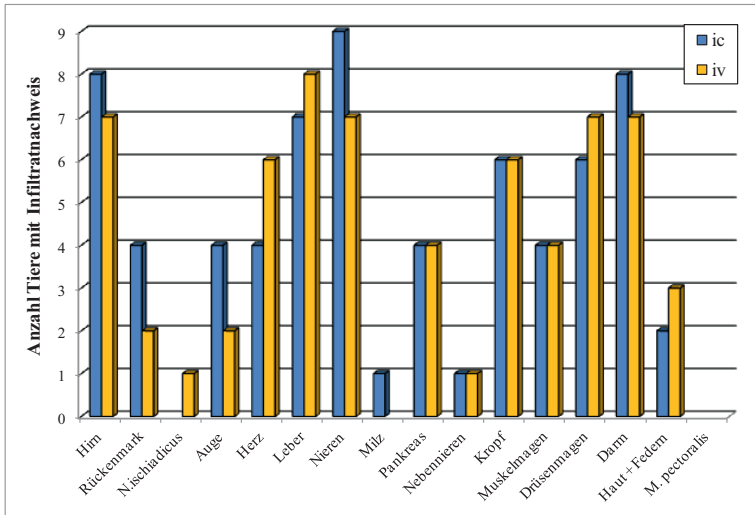


Abbildung 16: Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Organen aus Versuch I (PaBV-4)

Zwischen der ic- und iv-inokulierten Gruppe wurde in Versuch I kein signifikanter Unterschied nachgewiesen

4.6.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II wurden ebenfalls bei allen infizierten Vögeln die charakteristischen mononukleären Infiltrate nachgewiesen. Alle Vögel wiesen diese Infiltrate im Magen-Darm-Trakt auf. Im Gehirn wurden keinerlei lymphoplasmazelluläre Infiltrate in Form einer Ganglioneuritis nachgewiesen. Lediglich eine Gliose war bei allen inokulierten Vögeln bis auf ic12, ic13, ic17 und ic18 im Gehirn präsent. Die typischen Infiltrate fanden sich lediglich in 27,78 % der Rückenmarksproben, jedoch in 83,33 % der untersuchten Kröpfe, in 72,22 % der untersuchten Drüsenmägen, in 88,89 % der Muskelmägen und in 83,33 % der Darmproben. Insgesamt waren die Infiltrate in Geweben des Magen-Darm-Trakts – hier speziell des Drüsenmagens – stärker ausgeprägt als Infiltrate im ZNS. Wie schon in Versuch I fanden sich ähnliche Infiltrate ebenfalls in allen anderen untersuchten Organen, außer in der Brustmuskulatur. Wie in Versuch I wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen hinsichtlich der Organverteilung

festgestellt (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Für $n_{1,2} = 14$ errechneter Wert für $U = 90$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 61$ mit $\alpha = 0,1$, s. [Abbildung 17](#)). Das Sentineltier se2 wies ebenfalls wie se1 Infiltrate in Gewebeanteilen des Magen-Darm-Traktes, der Leber, der Nieren und der Milz auf ([Tabelle 12](#)). Diese Infiltrate waren jedoch nicht wie die für eine PDD charakteristischen Infiltrate in der Nähe von Nerven und Ganglien zu finden, sondern waren als nicht nerven- oder blutgefäßassoziierte Aggregate mononukleärer Zellen in Parenchym und Mucosa zu finden ([Abbildung 19](#)).

Tabelle 12: Histopathologischer Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in den Ganglienregionen verschiedener Organe in Versuch II (PaBV-2)

Darstellung sortiert nach Todes-/Euthanasiezeitpunkt, aufsteigend von links nach rechts (+ = Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate, - = kein Infiltratnachweis)

[illegible]

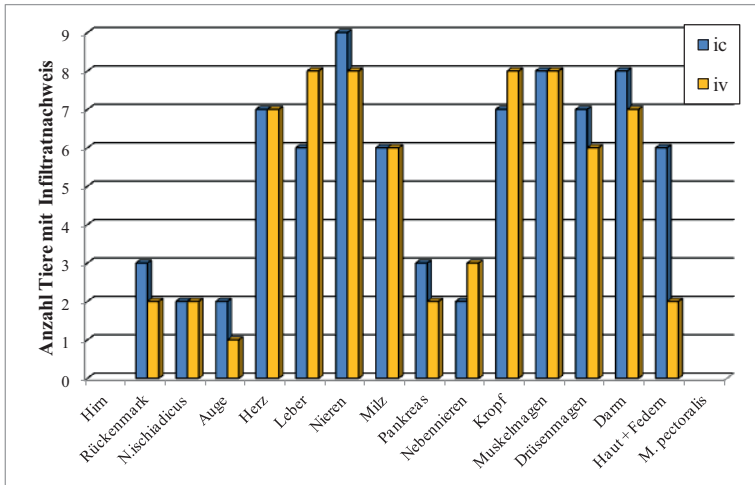


Abbildung 17: Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Organen aus Versuch II (PaBV-2)

Zwischen der ic- und iv-inokulierten Gruppe wurde in Versuch II kein signifikanter Unterschied nachgewiesen

4.6.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II

Statistisch gesehen besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Organverteilung der lymphoplasmazellulären Infiltrate zwischen den Versuchen (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Für $n_1 = 15$ und $n_2 = 14$ errechneter Wert für $U = 90$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 66$ mit $\alpha = 0,1$). Jedoch bei der Betrachtung einzelner Organe fällt auf, dass ein Unterschied bei Hirn, Milz und Muskelmagen zu finden ist. Während im Gehirn bei 15 PaBV-4-infizierten Vögeln PDD-typische Infiltrate nachweisbar waren, war das bei keinem der PaBV-2-infizierten Tiere der Fall. Im Muskelmagen wurden dagegen bei 16 PaBV-2-infizierten Vögeln Infiltrate nachgewiesen, im Gegensatz zu nur 8 PaBV-4-infizierten Vögeln. In der Milz wurden ebenfalls bei mehr PaBV-2-infizierten (12) als bei PaBV-4-infizierten Vögeln (1) Infiltrate gefunden (Abbildung 18).

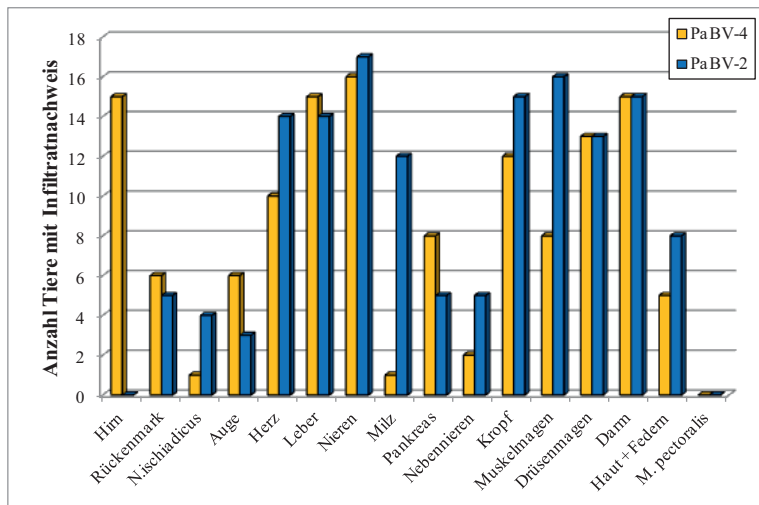


Abbildung 18: Nachweis lymphoplasmazellulärer Infiltrate in Organen aus Versuch I und II

Zwischen den Versuchsgruppen wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen, einzeln betrachtet fallen jedoch Unterschiede bei Hirn, Milz und Muskelmagen auf.

4.6.4 Kontrollgruppen

In der mockinfizierten Gruppe wiesen alle Vögel lymphoplasmazelluläre Infiltrate in folgenden Organen auf: Gehirn (mock3), Rückenmark (mock2), Kropf und Drüsenmagen (mock4), Muskelmagen (mock3 und mock4), Darm (mock1, mock3 und mock4), Leber (mock1 und mock4), Niere (mock1-4), Milz (mock2, 3 und 4) und Haut (mock4). Auch hier wiesen die Infiltrate nicht die PDD-typische Assoziation zu Nerven oder Ganglien auf, sondern bildeten ebenso wie beim Sentineltier se2 Zellaggregate verteilt in Parenchym und Mukosa.

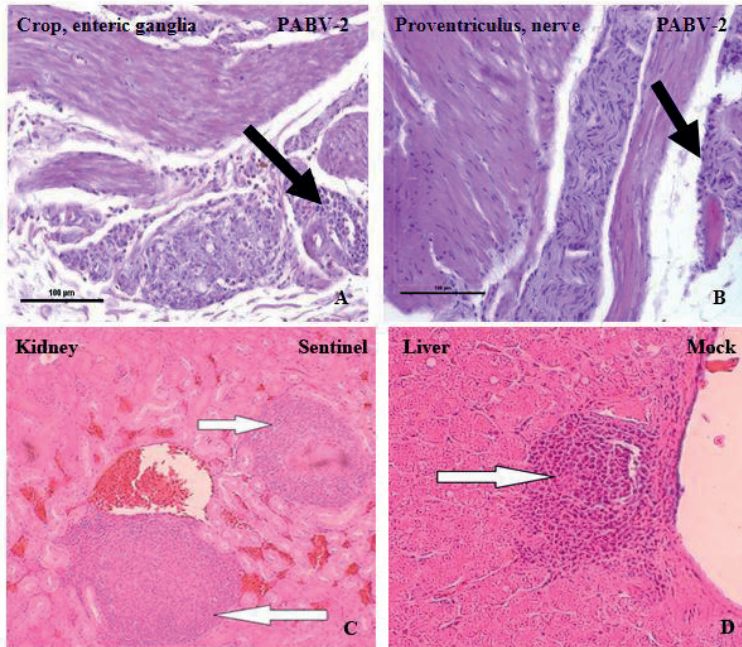


Abbildung 19: Vergleich typischer und atypischer mononukleärer Infiltrate
 PDD-charakteristische Ganglioneuritis und periganglioneuritis in Kropf (A) und Drüsenmagen (B) nach PaBV-2-Infektion, sowie atypische Aggregate mononukleärer Zellen im Nierengewebe des Sentinel se2 (C) und in Lebergewebe eines mock-infizierten Nymphensittichs (D) (Fotos: Institut für Veterinärpathologie Gießen)

4.7 Bakteriologische, mykologische und parasitologische Untersuchungen

4.7.1 Versuch I (PaBV-4)

Bakteriologisch wurde bei den Vögeln iv2 und ic6, die plötzlich gestorben waren, geringgradig *Escherichia coli* in allen Organen nachgewiesen. Bei den euthanasierten Vögeln wurden vereinzelt *Bacillus* spp. (Leber iv13, Lunge ic2), *Lactobacillus* spp. (Herz und Lunge ic2), *Staphylococcus* spp. (Herz und Lunge ic2) und *Streptococcus* spp. (Herz und Lunge ic2, Lunge ic3 und ic4) nachgewiesen. Bei der mykologischen Untersuchung wurde im Drüsenmagen von iv2, iv3 und ic3 *Mucor* spp. nachgewiesen sowie *Candida tropicalis* im Drüsenmagen von iv4. Die parasitologische Untersuchung aller Vögel verlief mit negativem Ergebnis. Bei der Methylenblaufärbung der Kropfabstriche und der Giemsa-Färbung der Drüsenmagenabstriche wurden weder *Candida* spp. noch *Macrorhabdus ornithogaster* nachgewiesen.

4.7.2 Versuch II (PaBV-2)

Bakteriologisch wurden bei drei der gestorbenen Vögel *E. coli* (Leber und Lunge ic12), *Klebsiella* spp. (Herz und Lunge ic11, Lunge ic14) und *Bacillus* spp. (Lunge ic14) nachgewiesen. Vereinzelt wurden weiterhin *Staphylococcus* spp. (Lunge iv16), *Lactobacillus* spp. (Lunge ic11 und iv16) und *Bacillus* spp. (Leber iv17) gefunden. Bei der mykologischen Untersuchung der Auflagerung im linken Abdominalluftsaack von iv11 wurde hochgradig *Mucor* spp. nachgewiesen. Alle parasitologischen Untersuchungen sowie alle Färbungen der Kropf- und Drüsenmagenabstriche verliefen mit negativem Ergebnis.

4.7.3 Kontrollgruppen

Bei der bakteriologischen Untersuchung der mock infizierten Gruppe wurde kein aerobes Keimwachstum festgestellt.

4.8 PaBV-RNA-Nachweis im Versuchsverlauf

4.8.1 Versuch I (PaBV-4)

In Versuch I wurde bei allen infizierten Vögeln und dem Sentineltier se1 PaBV-4-RNA in Kropf- und Kloakentupfern nachgewiesen ([Tabelle 13](#)). Der erste RNA-Nachweis gelang in der ic-Gruppe nach 19 Tagen pi (ic4) bzw. in der iv-Gruppe nach 25 Tagen pi (iv9) ([Abbildung 20](#)). Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zeigt sich, dass der RNA-Nachweis in der ic-Gruppe hoch signifikant früher möglich war als bei den iv-Tieren (es ergibt sich mit n_1 und $n_2 = 9$ ein errechneter Wert für $U = 5,5$ der unter dem kritischen Wert $c_0 = 11$ für $\alpha = 0,005$ liegt und somit hoch signifikant ist). Die RNA-Gehalte in den Tupfern stiegen stetig im Laufe des Versuchs. Zuletzt wurde beim Sentineltier se1 an Tag 76 pi PaBV-4-RNA in den Tupfern nachgewiesen. Hier stieg der PaBV-RNA-Gehalt im Laufe des Versuchs nicht an.

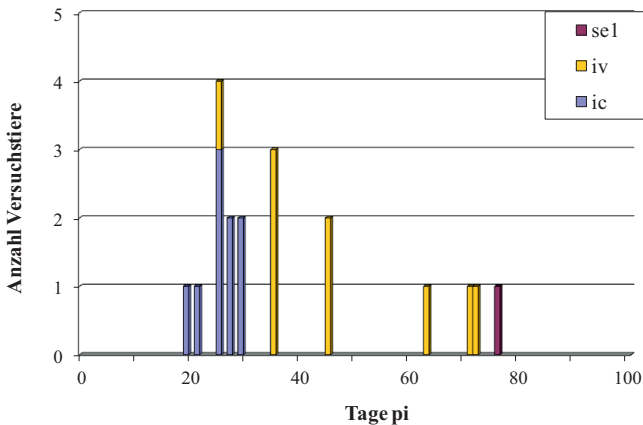


Abbildung 20: Zeitpunkt des ersten PaBV-4-RNA-Nachweises

Erster Nachweis von PaBV-4-RNA in Versuch I zwischen Tag 19 und 76 pi.

4.8.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II wurde bei 15 der 18 infizierten Vögel PaBV-2-RNA in den Tupfern nachgewiesen (Tabelle 14). In den Tupfern der Vögel ic14, iv13 und iv11 wurde keine PaBV-2-RNA nachgewiesen, bevor sie an Tag 32, 46 und 50 *post infectionem* starben oder euthanasiert wurden. Der erste PaBV-2-RNA-Nachweis in der ic-Gruppe gelang nach 27 Tagen pi (ic18) und in der iv-Gruppe nach 43 Tagen pi (iv18). Bei dem Sentineltier se2 wurde ab Tag 64 pi in den Tupfern PaBV-2-RNA detektiert (Abbildung 21). Fünf Vögel waren erst nach dem Sentineltier positiv im RNA-Nachweis. Wie in Versuch I stiegen die RNA-Gehalte in den Tupfern der infizierten Vögel stetig im Versuchsverlauf an, nicht aber beim Sentineltier. Laut Wilcoxon-Mann-Whitney-Test gab es hier keinen signifikanten Unterschied zwischen den Infektionsgruppen in Bezug auf den ersten Ausscheidungstag der RNA (mit $n_1 = 8$ und $n_2 = 7$ errechneter Wert $U = 17$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 13$ mit $\alpha = 0,1$).

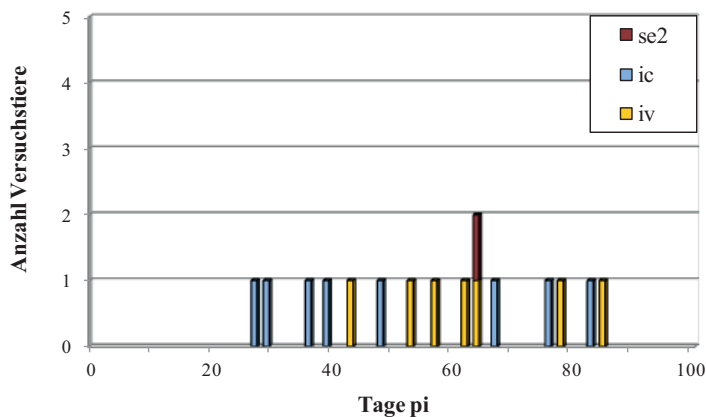


Abbildung 21: Zeitpunkt des ersten PaBV-2-RNA-Nachweises

Erster Nachweis von PaBV-2-RNA in Versuch II zwischen Tag 27 und 85 pi.

4.8.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-4, PaBV-2)

Erstauscheidung von PaBV-RNA wurde in Versuch I zwischen Tag 19 und 72 pi und in Versuch II zwischen Tag 27 und 85 pi nachgewiesen (Abbildung 22). In Versuch II wurde bei den drei Vögeln, die als erste erkrankten und starben oder euthanasiert wurden, keine PaBV-RNA in den Tupfern nachgewiesen. Die Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests zeigt, dass in Versuch I hoch signifikant früher RNA in den Tupfern nachgewiesen wurde als in Versuch II (mit $n_1 = 15$ und $n_2 = 18$ errechneter Wert für $U = 51$ liegt unter dem kritischen Wert $c_0 = 64$ mit $\alpha = 0,005$).

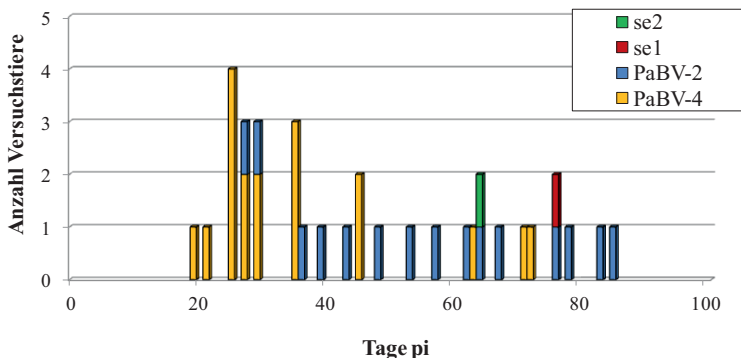


Abbildung 22: Erster Nachweis von PaBV-RNA in Versuch I und Versuch II

4.8.4 Kontrollgruppen

Die Vögel der Kontrollgruppen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine PaBV-RNA-Ausscheidung.

4.9 Nachweis spezifischer Antikörper gegen PaBV

4.9.1 Versuch I (PaBV-4)

In Versuch I wurden spezifische PaBV-Antikörper bei allen infizierten Vögeln nachgewiesen, nicht jedoch beim Sentineltier sel ([Tabelle 13](#)). Erste spezifische PaBV-Antikörper wurden in der ic-Gruppe zwischen dem 7. und 63. Tag pi nachgewiesen, in der iv-Gruppe zwischen dem 29. und 57. Tag pi ([Abbildung 23](#)). Dabei stiegen die Antikörpertiter aller Vögel im Versuchsverlauf stetig an bis sie ein Plateau erreichten (1:10 bei Serokonversion bis zu Titern von 1:20480 zum Zeitpunkt der Euthanasie). Zum Zeitpunkt des Todes/der Euthanasie lag kein Titer unter 1:5120. Bei Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests wurde hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen in Bezug auf den Erstdnachweis von PaBV-Antikörpern festgestellt (mit n_1 und $n_2 = 9$ errechneter Wert $U = 39,5$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 21$ mit $\alpha = 0,05$).

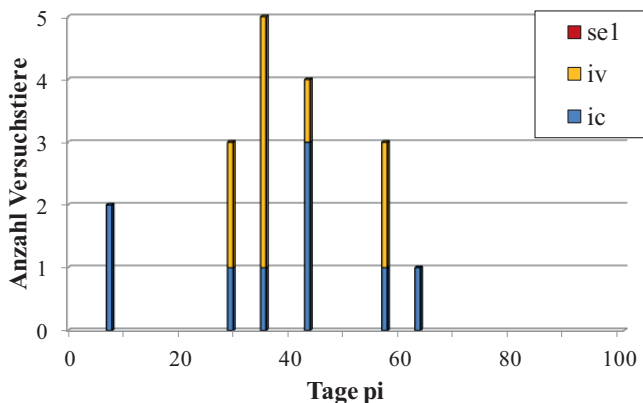


Abbildung 23: Zeitpunkt des ersten Antikörpernachweises Versuch I
Erster Nachweis von PaBV-Antikörpern in Versuch I zwischen Tag 7 und 63 pi.

4.9.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II wurden ebenfalls bei allen infizierten Vögeln spezifische PaBV-Antikörper nachgewiesen (Tabelle 14). Erste Antikörper wurden in der ic-Gruppe zwischen dem 6. und 34. Tag pi und in der iv-Gruppe zwischen dem 20. und 76. Tag pi nachgewiesen (Abbildung 24). Auch hier stiegen die Titer im Versuchsverlauf an, und ein Tier erreichte ebenfalls einen Titer von 1:20480 (ic16). Bei Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests wurde auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen bezüglich des ersten PaBV-Antikörper-Nachweises festgestellt (mit n_1 und $n_2 = 9$ errechneter Wert $U = 25$ liegt über dem kritischen Wert $c_0 = 21$ mit $\alpha = 0,1$). Zu keiner Zeit wurden spezifische PaBV-Antikörper beim Sentineltier se2 nachgewiesen.

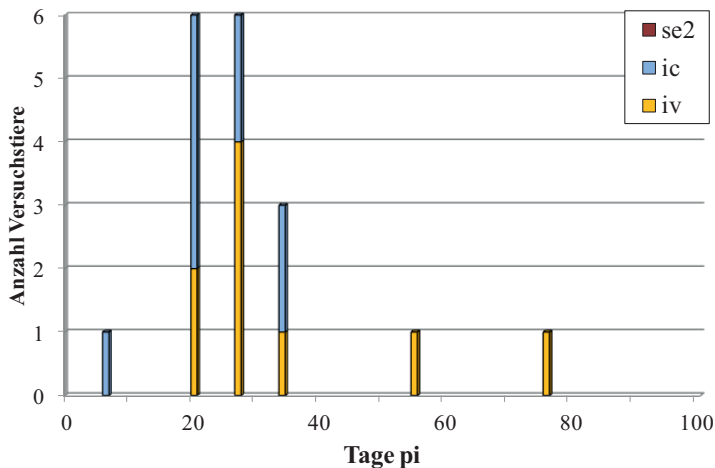


Abbildung 24: Zeitpunkt des ersten Antikörpernachweises Versuch II

Erster Nachweis von PaBV-Antikörpern in Versuch II zwischen Tag 6 und 76 pi.

4.9.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-4, PaBV-2)

In Versuch I wurden die ersten PaBV-Antikörper zwischen Tag sieben und 63 pi und in Versuch II zwischen Tag sechs und 76 pi nachgewiesen. In keinem der Versuche wurde eine Serokonversion beim Sentineltier beobachtet ([Abbildung 25](#)). Bei der Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests stellte sich heraus dass Antikörper hoch signifikant früher in Versuch II nachgewiesen wurden als in Versuch I (mit n_1 und $n_2 = 18$ errechneter Wert für $U = 71$ liegt unter dem kritischen Wert $c_0 = 81$ mit $\alpha = 0.005$). In beiden Versuchen stiegen die Antikörper-Titer im Versuchsverlauf stetig an, insgesamt blieben die Titer in Versuch II aber niedriger als in Versuch I ([Tabelle 14](#)) (PaBV-Antikörpertiterhöhe beim ersten PaBV-Anikörperrnachweis auffälliger Unterschied mit $n_1 = 15$ und $n_2 = 18$, errechneter Wert für $U = 82,5$ liegt unter kritischem Wert $c_0 = 88$ mit $\alpha = 0.02$; PaBV-Antikörpertiterhöhe nach Euthanasie bzw. Tod hoch signifikanter Unterschied mit n_1 und $n_2 = 18$, errechneter Wert für $U = 37,5$ liegt unter kritischem Wert $c_0 = 74$ mit $\alpha = 0.005$).

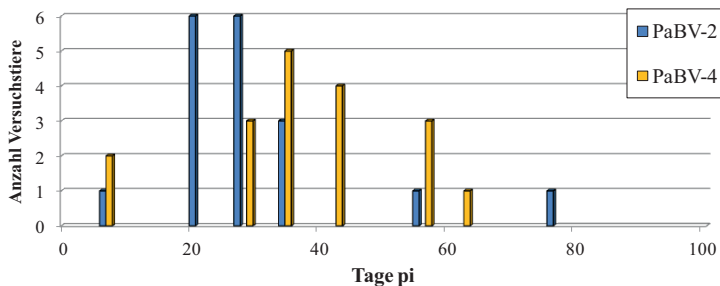


Abbildung 25: Erster Antikörper-Nachweis in Versuch I und Versuch II

4.9.4 Kontrollgruppen

Sowohl in der nichtinfizierten Kontrollgruppe als auch bei den mock-infizierten Vögeln wurden keine spezifischen PaBV-Antikörper nachgewiesen.

Tabelle 13: Übersicht Versuch I (PaBV-4)

ID	Geschl.	Alter (d)	Erster Nachweis von			Erste Symptome					ID	Tod (dpi)	Euthanasie (dpi)	Antikörpertiter p.m.	Dilatation Dm	Histologie: Infiltrate ZNS/MDT
			PaBV-Antikörpern	Tier	PaBV-RNA	red. AB dpi	red. KGW dpi	unverd. Kör. dpi	Ataxie/Dys. dpi	Anfälle dpi						
k2	w	121	29	1:20	21	33	37	37		41	k2		60	1:5120	+++	+/+
k6	m	137	43	1:1280	25						k6	66		1:5120	-	+/+/+
k3	w	137	35	1:320	25						k3		115	1:20480	+	+/+/+
k4	w	137	7	1:20	19						k4		115	1:20480	-	+/+
k8	w	137	43	1:640	27						k8		115	1:10240	-	+/+
k3	m	137	57	1:640	43			116			k3		116	1:10240	++	+/+/+
k4	m	137	29	1:40	63						k4		116	1:5120	+	+/+/+
k7	m	137	35	1:40	35						k7		116	1:10240	-	+/+
k2	w	137	35	1:160	35						k2	120		1:5120	++	+/+
k1	w	137	43	1:160	27				199		k1		206	1:10240	++	+/+
k1	w	137	57	1:320	71		126				k1		229	1:10240	++	+/+
k5	w	121	35	1:640	72				159		k5		229	1:20480	-	+/+
k6	w	121	43	1:640	33						k6		229	1:10240	-	+/+
k8	m	137	35	1:40	43						k8		229	1:5120	-	+/+
k9	w	44	29	1:40	25						k9		229	1:20480	-	+/+
k5	w	121	57	1:320	29						k5		230	1:20480	-	+/+
k7	m	137	63	1:160	29						k7		230	1:10240	-	+/+
k9	m	44	7	1:10	25						k9		230	1:5120	-	+/+/+
se1	m	137	-	-	76						se1		230	<1:10	-	+/+

Erster Antikörper- und RNA-Nachweis, Auftreten erster Symptome, Zeitpunkt Tod/Euthanasie, Dilatation des Drüsenmagens und histologische Befunde

ID = Identifikationsnummer, d = *dies*, dpi = *dies post infectionem*

red. = reduziert, AB = Allergienbefinden, KGW = Körpergewicht

unverd. Kör. = unverdaute Körner im Kot, Dys = Diskoordination

p.m. = *post mortem*, Dm = Drüsenmagen, n = Anzahl positiver Organe

+ = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, - = negativ (Drüsenmagen ohne Befund/ kein Infiltratnachweis)

Tabelle 14: Übersicht Versuch II (PaBV-2)

ID	Geschl.	Alter (d)	Erster Nachweis von		Erste Symptome					ID	Tod (dpi)	Euthanasie (dpi)	Antikörper- titer p.m.	Dilatation Dm	Histologic: Infiltrate ZNS/MDT		
			PaBV-Antikörpern dpi	PaBV RNA	red. AB dpi	red. KGW dpi	Diarrhoe dpi	Ataxie dpi									
ic14	f	168	20	180	-	22	45	43		27	ic14	32		1:640	+++	+++	
iv13	f	196	27	180	-		46	48				iv13	50		1:320	+++	++
iv11	f	212	27	140	-		46					iv11			1:80	+++	++
ic11	f	216	20	120	67		40	42			32	ic11			1:160	+++	++
iv15	f	202	27	120	64		64	57				iv15			1:80	+++	++
ic17	m	164	27	110	36		83					ic17	84		1:320	-	++
ic12	f	212	27	110	29		74	71			85	ic12	86		1:320	-	++
iv17	m	175	20	120	78		81	78				iv17			1:80	+++	++
iv10	m	235	27	140	57		111	104				iv10			1:10240	++	++
iv18	f	133	34	140	43		121	125				iv18	137		1:2560	-	++
ic13	f	196	6	180	83		139					ic13			1:1280	++	+++
ic10	m	233	20	140	39							ic10			231	++	++
ic15	f	182	34	1360	76							ic15			1:10240	-	++
ic18	m	106	20	180	27							ic18			231	++	+++
iv14	m	202	55	140	62							iv14			1:320	-	++
iv16	m	161	20	1320	53							iv16			1:5120	+	++
iv12	m	196	76	110	85							iv12			1:1280	-	++
ic16	f	175	34	120	48		86	85				ic16			1:20480	++	+++
se2	m	196	-	-	64							se2			<1:10	-	(+++)

Erster Antikörper- und RNA-Nachweis, Auftreten erster Symptome, Zeitpunkt Tod/Euthanasie,

Dilatation des Drüsenmagens und histologische Befunde

ID = Identifikationsnummer, d = *ages*, dpi = *days post infectionem*

red. = reduziert, AB = Allgemeinbefinden, KGW = Körpergewicht

unverd. Kör. = unverdaute Körner im Kot, Dis = Diskoordination

p.m. = post mortem, Dm = Drüsenmagens, n = Anzahl positiver Organe

+ = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, - = negativ (Drüsenmagens ohne Befund/ kein Infiltratnachweis)

4.10 PaBV-RNA-Nachweis im Organmaterial

4.10.1 Versuch I (PaBV-4)

In Versuch I wurde in den Organen aller infizierten Vögel PaBV-4-RNA nachgewiesen (Tabelle 15). Dabei wiesen die Organe aller Vögel zumeist sehr hohe PaBV-RNA-Gehalte auf. Die höchsten RNA-Gehalte wurden im ZNS (Hirn, Auge und Rückenmark) nachgewiesen (1/ct 0,08 - 0,09; s. Abbildung 26). Bei 12 Vögeln wiesen nicht alle Organproben PaBV-RNA auf (Tabelle 15). Dies waren sowohl früh gestorbene bzw. euthanasierte Vögel als auch bis zum Versuchsende gesund gebliebene Vögel. Bei vier Vögeln wurde keine PaBV-4-RNA in der Nebenniere nachgewiesen (ic3, ic6, ic8 und iv3), ein Vogel war negativ im Herzmuskel (iv1), bei neun Vögeln wurde keine PaBV-RNA in der Milz nachgewiesen (ic3, 5, 6, 8, 9 und iv 1, 2, 5 und 8), bei drei Vögeln waren die Proben aus dem Drüsenmagen negativ (ic2, 6 und iv8) und bei drei weiteren Vögeln waren Gewebeproben der Pectoralismuskulatur negativ (ic2, 3 und 7). Eine geringe Korrelation des PaBV-RNA-Gehaltes aller Organe eines Vogels (Median 1/Ct) zu seinem Todeszeitpunkt konnte anhand des Korrelationskoeffizienten $r = 0,6$ bestätigt werden. Je später ein Versuchstier starb oder euthanasiert wurde, desto höher war der PaBV-RNA-Gehalt der Organe (Abbildung 27). Hinsichtlich des PaBV-RNA-Gehaltes der Organe wurde mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test kein signifikanter Unterschied zwischen der iv- und der ic-inokulierten Gruppe festgestellt (mit n_1 und $n_2 = 16$ errechneter Wert für $U = 120$ liegt unter dem kritischen Wert $c_0 = 93$ mit $\alpha = 0.2$). Das Sentineltier se1 wies lediglich in der Gewebeprobe von Haut mit Federn eine geringe PaBV-RNA-Menge auf (1/ct 0,03; Abbildung 26, Tabelle 15).

Tabelle 15: PaBV-4-RNA-Gehalte im Organmaterial (Versuch I)

ID Organ	ic2	ic6	ic3	ic4	ic8	iv3	iv4	iv7	iv2	ic1	iv1	iv5	iv6	iv8	iv9	ic5	ic7	ic9	se1
Hirn	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Auge	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Rückenmark	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
N. ischiadicus	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	-
Nebenniere	++	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Herz	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	-
Leber	+	+	+	++	++	+	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	-
Niere	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Milz	++	++	-	++	-	++	++	+++	-	+++	-	-	++	-	+++	-	++	-	-
Pankreas	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	-
Kropf	++	++	++	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Drüsenmagen	-	-	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-
Muskelmagen	++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	-
Darm	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	-
M. pectoralis	-	++	-	++	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++	++	-	+	-
Haut + Federn	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+

Darstellung sortiert nach Todes-/Euthanasiezeitpunkt aufsteigend von links nach rechts

+ = geringer PaBV-RNA-Gehalt (1/Ct 0,01-0,03)

++ = mittlerer PaBV-RNA-Gehalt (1/Ct 0,04-0,06)

+++ = hoher PaBV-RNA-Gehalt (1/Ct 0,07-0,1)

- = negativ

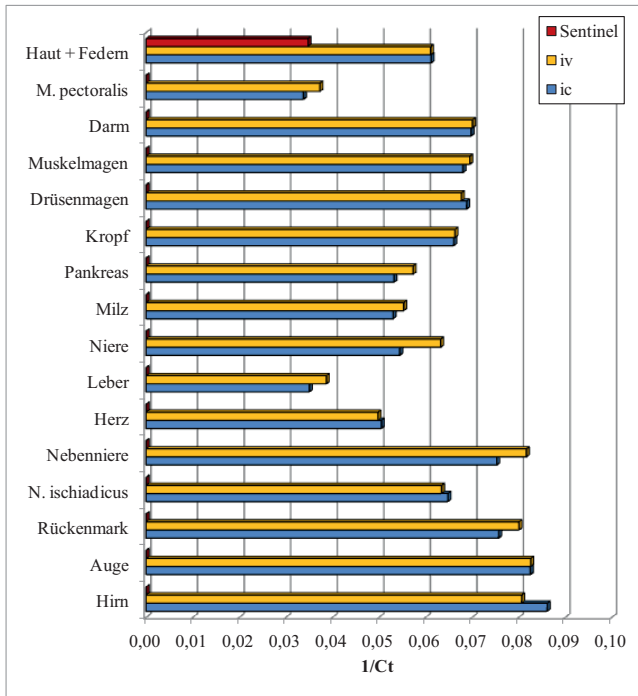


Abbildung 26: PaBV-4-RNA-Nachweis in den Organen

Dargestellt ist der Median der 1/Ct-Werte des jeweiligen Organes aller Tiere

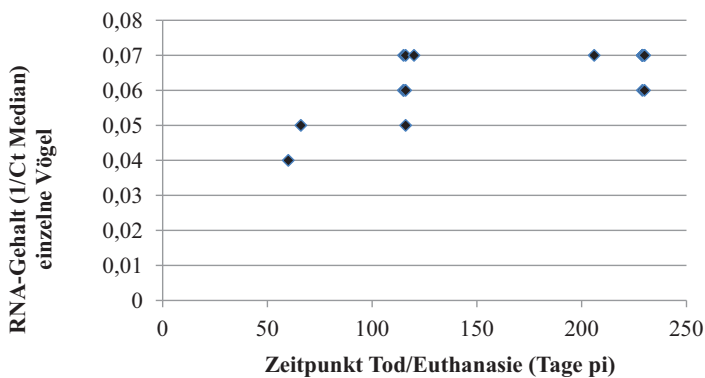


Abbildung 27: Korrelation des PaBV-RNA-Gehaltes (1/Ct Median) eines Vogels zu seinem jeweiligen Todeszeitpunkt

4.10.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II konnte ebenfalls bei allen infizierten Vögeln PaBV-RNA in den Organen nachgewiesen werden (Tabelle 16). Die Mediane der 1/Ct-Werte der Organe überstiegen 0,06 jedoch nicht (Abbildung 28). In Versuch II hing der RNA-Gehalt der Organe zumeist davon ab, ob der Vogel früh erkrankte und starb oder ob er bis zum Versuchsende klinisch gesund blieb. Mittels des Korrelationskoeffizienten $r = 0,51$ wurde eine geringe Korrelation festgestellt zwischen dem RNA-Gehalt der Organe eines Tieres und dessen Überlebensdauer im Versuch (Abbildung 29). Die Vögel, die innerhalb des ersten Drittels des Versuches erkrankten und starben oder euthanasiert wurden (Gruppe 1), wiesen durchweg einen geringeren PaBV-RNA-Gehalt in ihren Organen auf als die meisten Vögel die bis zum Schluss klinisch unauffällig blieben (Gruppe 3). Früh gestorbene oder euthanasierte Vögel zeigten zudem auch nicht in allen Organen einen positiven PaBV-RNA-Nachweis. Vor allem in Herz, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Kropf und Brustmuskulatur wurde bei einigen dieser Tiere keine PaBV-RNA nachgewiesen. Fünf der sieben Vögel, die bis zum Schluss überlebten, waren in allen untersuchten Organen positiv (Tabelle 16). Die Werte lagen hier überwiegend bei 1/Ct 0,06 und 0,08. Die zwei anderen Vögel (iv12 und ic15) waren nicht in allen Organen positiv (iv12 Organe ohne PaBV-RNA-Nachweis: Hirn, N. ischiadicus, Herz, Leber, Pankreas, Drüsenamngen, Darm, Brustmuskulatur; ic15 negative Organe: N. ischiadicus, Nebenniere, Pankreas, Brustmuskel) und wiesen überwiegend niedrige Werte auf (1/Ct 0,03-0,06). Hinsichtlich des RNA-Gehaltes der Organe (Median 1/Ct) wurde ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der ic- und iv-Gruppe nachgewiesen. In der ic-Gruppe wiesen die Organe höhere PaBV-RNA-Gehalte auf als in der iv-Gruppe (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Mit der Anzahl untersuchter Organe n_1 und $n_2 = 16$ errechneter Wert für $U = 34$ liegt unter dem kritischen Wert $c_0 = 54$ mit $\alpha = 0.005$). Das Sentineltier se2 wies in Versuch II ebenfalls einen RNA-Gehalt in der Haut auf (1/Ct 0,03). Die restlichen untersuchten Organe dieses Vogels waren negativ (Abbildung 28).

Tabelle 16: PaBV-2-RNA-Gehalte im Organmaterial (Versuch II)

ID Organ	ic14	iv13	iv11	ic11	iv15	ic17	ic12	iv17	iv10	iv18	ic13	ic10	ic15	ic18	iv14	iv16	iv12	ic16	se2
Hirn	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	+++	-
Auge	+		+	+	++	++	++	+	++	++	++	+++	++	++	++	++	+	++	-
Rückenmark	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+++	+	++	++	++	+	++	-
N. ischiadicus	+	+	+	+	+	++	++	+	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	-
Nebenniere	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	-	+++	+++	+++	++	+++	-
Herz	-	-	-	+	+	++	++	+	++	++	-	++	+	++	++	++	-	++	-
Leber	+	-	-	+	+	++	++	-	+	++	+	++	+	++	++	++	-	++	-
Niere	-		+	-	-	++	++	-	++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+	+++	-
Milz	-	-	-	-	+	++	++	-	++	++	+	++	+	++	+++	++	+	+++	-
Pankreas	-	-	-	+	+	++	++	+	++	++	-	++	-	++	++	++	-	+++	-
Kropf	-	+	-	-	++	++	++	+	++	++	++	+++	+	++	+++	++	+	+++	-
Drüsenmagen	+	+	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	+++	+++	-	+++	-
Muskelmagen	+	++	+	++	++	+++	+++	+	++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+	+++	-
Darm	+	+	+	++	+	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+	++	+++	+++	-	+++	-
M. pectoralis	++	-	-	-	-	++	++	-	++	++	-	++	-	++	++	++	-	+	-
Haut + Federn	+	+	-	+	-	++	++	+	++	++	+	+++	++	+++	++	++	+	++	+

Darstellung sortiert nach Todes-/Euthanasiezeitpunkt aufsteigend von links nach rechts

+ = geringer PaBV-RNA-Gehalt (1/Ct 0,01-0,03),

++ = mittlerer PaBV-RNA-Gehalt (1/Ct 0,04-0,06)

+++ = hoher PaBV-RNA-Gehalt (1/Ct 0,07-0,1)

- = negativ

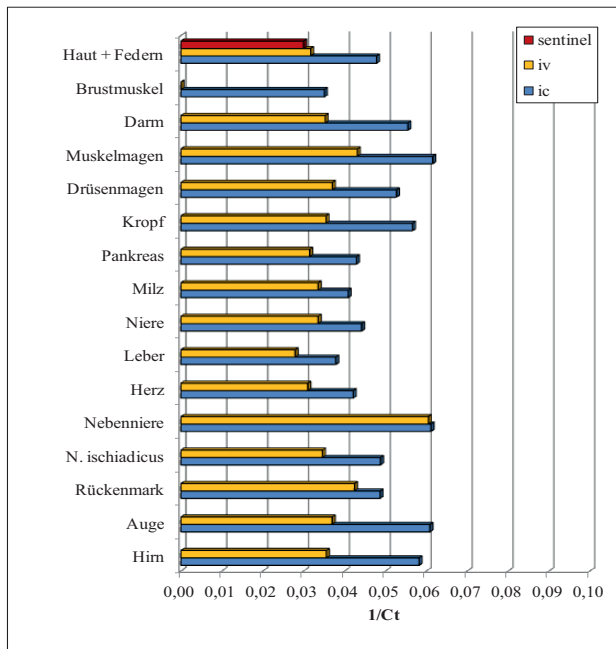


Abbildung 28: PaBV-2-RNA-Nachweis in den Organen

Dargestellt ist der Median der 1/Ct-Werte des jeweiligen Organes aller Tiere

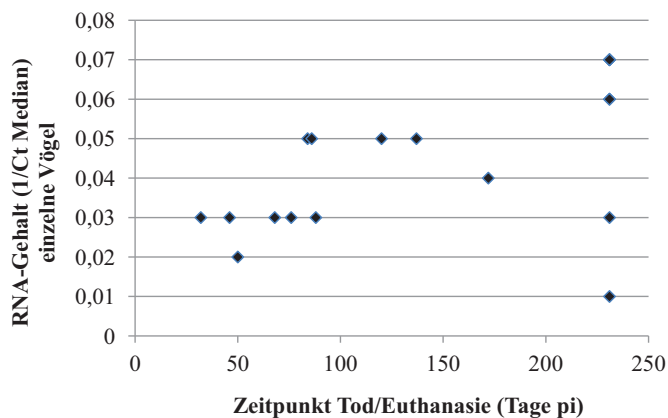


Abbildung 29: Abhängigkeit des RNA-Gehaltes (1/Ct Median) eines Vogels von seinem jeweiligen Todeszeitpunkt

4.10.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-4, PaBV-2)

Im Gegensatz zu Versuch I (PaBV-4) waren die PaBV-RNA-Gehalte (1/Ct) der Organe in Versuch II (PaBV-2) hochsignifikant niedriger (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Mit n_1 und $n_2 = 16$ errechneter Wert für $U = 31$ liegt unter dem kritischen Wert $c_0 = 54$ mit $\alpha = 0.005$). In Versuch II (PaBV-2) wurde ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen bzgl. der PaBV-RNA-Gehalte festgestellt. Die Vögel der ic-Gruppe wiesen höhere PaBV-RNA-Gehalte in den Organproben auf als die Vögel der iv-Gruppe. Dieser Unterschied wurde in Versuch I (PaBV-4) nicht beobachtet. In beiden Versuchsgruppen konnte aber eine geringe Korrelation ($r = 0,6$ bzw. $r = 0,51$) zwischen dem Zeitpunkt des Todes oder der Euthanasie und dem Gesamt-PaBV-RNA-Gehalt eines Vogels festgestellt werden.

4.10.4 Kontrollgruppen

In den Kontrollgruppen wurde bei keinem der Vögel PaBV-RNA in den Organen nachgewiesen

4.11 PaBV-Antigennachweis im Organmaterial mittels Immunhistochemie

4.11.1 Versuch I (PaBV-4)

Mittels Immunhistochemie wurde in den *post mortem* gewonnenen Organproben aller infizierten Vögel PaBV-Antigen nachgewiesen, jedoch nicht beim Sentineltier se1 (Tabelle 17). Hierbei fiel auf, dass der Antigennachweis sich überwiegend auf das ZNS und das periphere Nervensystem sowie die Reizleitungsfasern des Herzens beschränkte. Mit Ausnahme von iv3 wurde bei allen infizierten Vögeln im Gehirn Phosphoprotein p24 und X-Protein p14 nachgewiesen. Bei iv3 wurde nur p14 im Gehirn nachgewiesen. Lediglich bei vier Vögeln wurde PaBV-Antigen im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen (ic3, iv7, iv5 und ic9). Es wurde kein PaBV-Antigen in Gewebeproben von Leber, Nieren, Milz, Pankreas, Nebennieren, Haut und Brustmuskulatur nachgewiesen.

Tabelle 17: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch I (PaBV-4)

Darstellung sortiert nach Todes-/Euthanasiezeitpunkt aufsteigend von links nach rechts

ID	ic2	ic6	ic3	ic4	ic8	iv3	iv4	iv7	iv2	ic1	iv1	iv5	iv6	iv8	iv9	ic5	ic7	ic9	se1
Tod/Euthanasie dpi	60	66	115	115	115	115	116	116	120	206	229	229	229	229	229	230	230	230	230
Organe	Hirn	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	-
	Rückenmark	p14	-	p24	p24/ p14	p24	p14	p24	p24	p24/ p14	p24/ p14	p14	p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	p24/ p14	-	p24/ p14
	<i>N.ischiadicus</i>	p14	-	p24	p24/ p14	p24	-	p24	p24	p24/ p14	p24/ p14	-	p14	-	-	-	p14	-	-
	Auge	-	p14	p14	p14	-	p14	-	p14	p14	p24/ p14	-	p14	p14	p14	p24	-	p14	-
	Herz	p24/ p14	-	p24/ p14	p24/ p14	p14	p14	-	-	p14	p24/ p14	p14	p24/ p14	p24/ p14	p24	p14	-	p14	-
	Leber	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nieren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Milz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pankreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nebennieren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kropf	-	-	p14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	p14	-
	Muskelmagen	-	-	-	-	-	-	p14	-	-	-	p14	-	-	-	-	-	-	-
	Drüsenmagen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Darm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	p14	-	-	-	-	-	-	-
	Haut + Federn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>M. pectoralis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

p14 = Nachweis von X-Protein, p24 = Nachweis von Phosphoprotein, - = kein Antigennachweis

4.11.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II wurde PaBV-Phosphoprotein bei allen infizierten Vögeln nachgewiesen. Hier lag bei der Antigenverteilung eine Betonung auf ZNS und Magen-Darm-Trakt. Wie schon im PaBV-RNA-Nachweis festgestellt, existierte eine geringe Korrelation zwischen der Überlebensdauer eines Vogels und der Verteilung des Antigens im Organismus. Je länger ein Vogel lebte, desto mehr Organe waren positiv im Antigennachweis und desto mehr Antigen wurde in den einzelnen Organen nachgewiesen (Korrelationskoeffizient $r = 0,52$ (Korrelation Todes-/Euthanasiezeitpunkt - Antigenverteilung in die Peripherie) und $r = 0,58$ (Korrelation Todes-/Euthanasiezeitpunkt - Antigenmenge)). Bei vier infizierten Vögeln wurde kein Antigen im ZNS nachgewiesen (iv14, iv17, ic17 und ic18), Vogel iv12 wies kein Antigen im Magen-Darm-Trakt auf. Sentinelvogel se2 wies in keinem der untersuchten Organe PaBV-Antigen auf (Tabelle 18).

Tabelle 18: Nachweis von PaBV-Antigen in Versuch II (PaBV-2)

ID	ic14	iv13	iv11	ic11	iv15	ic17	ic12	iv17	iv10	iv18	ic13	iv14	iv16	iv12	ic10	ic15	ic16	ic18	se2
Tod/Euthanasie dpi	32	46	50	68	76	84	86	88	120	137	172	231	231	231	231	231	231	231	231
Organe	Hirn	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	Rückenmark	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	<i>N. ischiadicus</i>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-
	Auge	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
	Herz	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	auto	+	+	+	+
	Leber	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	auto	-	-	+	-
	Nieren	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	auto	+	+	+	+
	Milz	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	+	+	+	n.u.	-
	Pankreas	+	+	n.u.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	n.u.	+	+	+	n.u.
	Nebennieren	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	Kropf	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	auto	+	+	+	+
	Muskelmagen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	auto	+	+	+	+
	Drüsenmagen	+	+	n.u.	+	+	+	+	+	-	+	n.u.	+	auto	+	+	+	+	+
	Darm	auto	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	auto	+	+	+	+
	Haut + Federn	n.u.	+	-	+	-	-	n.u.	-	+	-	+	n.u.	-	+	+	+	+	+
	<i>M. pectoralis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

+ = Nachweis von Phosphoprotein p24, - = kein Antigennachweis, n.u. = nicht untersucht aufgrund zu geringer Probenmenge, auto = Autolyse

4.11.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4)

In beiden Versuchen wurde PaBV-Antigen im Organmaterial der infizierten Nymphensittiche nachgewiesen. Hierbei wurde in Versuch I (PaBV-4) PaBV-Antigen hauptsächlich im ZNS und peripheren Nervensystem nachgewiesen und nur bei vier infizierten Vögeln in Kropf, Muskelmagen und Darm. In Versuch II (PaBV-2) wurde PaBV-Antigen sowohl im ZNS (außer bei iv14, iv17, ic17 und ic18) als auch im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen. Die nachgewiesene Antigenmenge war bei den Vögeln in Versuch I insbesondere im ZNS wesentlich höher als in Versuch II. Hingegen war die Verteilung von PaBV-Antigen bei den Vögeln in Versuch II wesentlich breiter als in Versuch I. Während sich der Antigennachweis in Versuch I zumeist auf das zentrale und periphere Nervensystem beschränkte, war in Versuch II auch Antigen in Leber, Nieren, Milz, Pankreas, Haut und Muskulatur nachweisbar. Zudem konnte in Versuch II umso mehr Antigen nachgewiesen werden, je länger ein Vogel im Versuch lebte.

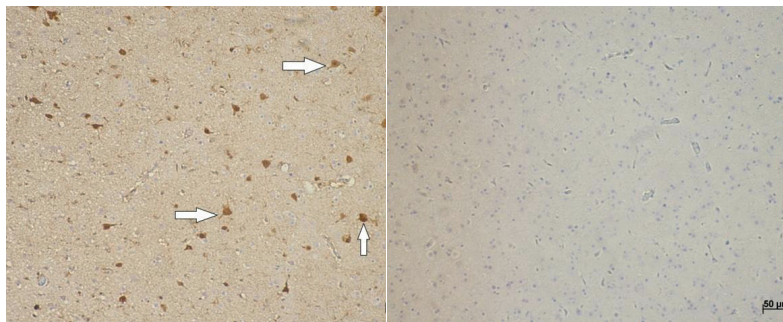


Abbildung 30: Nachweis des Phosphoproteins p24 in PaBV-2-inokulierten Nymphensittichen

als braune Färbung der Zellkerne der Axone im Gehirn (links), rechts: Negativkontrolle

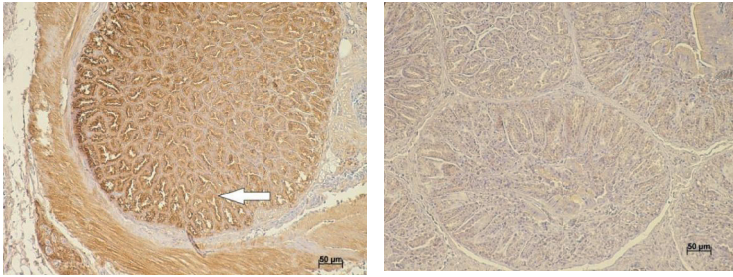


Abbildung 31: Nachweis des Phosphoproteins p24 in PaBV-2-inokulierten Nymphensittichen

als braune Färbung der Zellkerne der Drüsenzellen des Drüsenmagens (links),
recht: Negativkontrolle (Fotos: Institut für Veterinärpathologie, JLU Gießen)

4.11.4 Kontrollgruppen

In den Kontrollgruppen wurde bei keinem der Vögel PaBV-Antigen in den untersuchten Organen nachgewiesen.

4.12 Virus-Reisolierung und Sequenzierung der Reisolat

4.12.1 Versuch I (PaBV-4)

In Versuch I wurde aus Gehirn- und Retinaproben aller infizierter Vögel infektiöses Virus reisoliert, nicht jedoch beim Sentineltier se1 ([Tabelle 13](#)). Bei allen infizierten Vögeln war bereits fünf Tage pi auf CEC-Zellen infektiöses Virus nachweisbar und mehr als 90% der CEC-Zellen waren infiziert. Die Sequenzierung der Reisolat ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Inokulat.

4.12.2 Versuch II (PaBV-2)

In Versuch II konnte infektiöses Virus aus allen infizierten Vögeln reisoliert werden, nicht jedoch aus dem Sentineltier se2 ([Tabelle 14](#)). Auch bei der Reisolierung gab es einen Unterschied zwischen den Vögeln, die früh gestorben sind oder euthanasiert wurden, und denen, die bis zum Versuchsende klinisch unauffällig waren. Bei Vögeln die innerhalb des ersten Versuchsdrittels starben bzw. euthanasiert wurden (Gruppe 1), konnte infektiöses Virus erst nach der dritten Passage der mit der Organsuspension infizierten CEC-Zellen

nachgewiesen werden. Aus zusätzlich untersuchten Gewebeproben der Nieren dieser Vögel konnte kein infektiöses Virus reisoliert werden. Bei den restlichen Vögeln außer iv17, iv12 und ic15 konnte infektiöses Virus aus Hirn- und Retinagewebe bereits fünf Tage nach Infektion der CEC-Zellen nachgewiesen werden. Bei fünf dieser Vögel wurde außerdem infektiöses Virus aus Gewebeproben der Nieren erfolgreich angezüchtet (ic10, ic16, ic18, iv14 und iv16). Die Sequenzierung der Reisolat ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Inokulat.

4.12.3 Vergleich Versuch I mit Versuch II (PaBV-2, PaBV-4)

Während in Versuch I (PaBV-4) bei allen infizierten Versuchstieren aus Gehirn- und Retinaproben infektiöses PaBV bereits fünf Tage pi auf CEC-Zellen nachgewiesen werden konnte, hing das Ergebnis der Reisolierung in Versuch II (PaBV-2) deutlich von der Überlebensdauer eines Vogels im Versuch, also von der Dauer der PaBV-Infektion ab.

4.12.4 Kontrollgruppen

Bei der Untersuchung von Gewebeproben von Gehirn und Retina der Kontrolltiere auf CEC-32-Zellen konnte kein infektiöses Virus nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Zusammenstellung der Befunde *post mortem* Versuch I (PaBV-4)

ID	Tod (dpi)	Euthanasie (dpi)	Antikörper- titer p.m.	Dilatation Dm	Histologie:	PaBV-RNA	n	IHC*				Reisolierung PaBV [#]
					Infiltrate ZNS/MDT	Organe Median 1/Ct		p14	n	p24	n	
ic2		60	1:5120	+++	+++	0,04	15	+	4	+	2	+++
ic6	66		1:5120	-	++/++	0,05	13	+	2	+	1	+++
ic3		115	1:20480	+	++/++	0,06	14	+	4	+	4	+++
ic4		115	1:20480	-	+/++	0,06	16	+	5	+	4	+++
ic8		115	1:10240	-	+/++	0,07	14	+	2	+	4	+++
iv3		116	1:10240	++	++/++	0,06	15	+	4	-	-	+++
iv4		116	1:5120	+	++/++	0,05	16	+	2	+	3	+++
iv7		116	1:10240	-	+/+	0,07	16	+	3	+	3	+++
iv2	120		1:5120	++	+/+	0,07	15	+	4	+	3	+++
ic1		206	1:10240	++	+/++	0,07	16	+	5	+	3	+++
iv1		229	1:10240	++	-/++	0,07	14	+	4	+	3	+++
iv5		229	1:20480	-	+/++	0,07	15	+	6	+	1	+++
iv6		229	1:10240	-	+/++	0,07	16	+	4	+	3	+++
iv8		229	1:5120	-	-/++	0,06	15	+	4	+	3	+++
iv9		229	1:20480	-	+/++	0,07	16	+	3	+	3	+++
ic5		230	1:20480	-	-/++	0,07	15	+	4	+	3	+++
ic7		230	1:10240	-	+/-	0,07	16	+	5	+	1	+++
ic9		230	1:5120	-	++/++	0,06	15	+	5	+	2	+++
se1		230	< 1:10	-	+/+	0,03	1	-	-	-	-	-

dpi = *dies post infectionem*, p.m. = *post mortem*,

+ = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, - = Dm ohne Befund/kein PaBV-Nachweis

n = Anzahl positiver Organe

* Untersuchung auf PaBV-Antigen in Hirn, Auge, Rückenmark, *N. ischiadicus*, Nebenniere, Herz, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, Darm, *M. pectoralis*, Haut + Federn

[#]Reisolierung PaBV aus Hirn- und Retina-Gewebeproben: Abstufung der Infektionsgeschwindigkeit auf CEC-32-Zellen: + = langsam (Nachweis von infektiösem Virus nach 3 Passagen in CEC-Zellen), +++ = schnell (Nachweis von infektiösem Virus fünf Tage pi von CEC-Zellen)

Tabelle 20: Zusammenstellung der Befunde *post mortem* Versuch II (PaBV-2)

ID	Tod (dpi)	Euthanasie (dpi)	Antikörper- titer p.m.	Dilatation Dm	Histologie:	PaBV-RNA	n	IHC*	n	Reisolierung PaBV [#]
					Infiltrate ZNS/MDT	Organe Median 1/Ct		p24		
ic14	32		1:640	+++	++/+	0,03	11	+	4	+
iv13		46	1:320	+++	++/+	0,03	11	+	8	+
iv11	50		1:80	+++	++/+	0,02	8	+	5	+
ic11		68	1:160	+++	++/+	0,03	13	+	8	+
iv15		76	1:80	+++	++/+	0,03	13	+	8	+
ic17	84		1:320	-	++/+	0,05	16	+	7	+++
ic12	86		1:320	-	++/+	0,05	16	+	9	+++
iv17		88	1:80	++	++/+	0,03	12	+	7	+
iv10		120	1:10240	++	++/+	0,05	16	+	12	+++
iv18	137		1:2560	-	++/+	0,05	16	+	7	+++
ic13		172	1:1280	++	++/+	0,04	13	+	10	+++
ic10		231	1:10240	-	++/+	0,07	16	+	12	+++
ic15		231	1:1280	-	++/+	0,03	12	+	12	+
ic18		231	1:640	-	++/+	0,06	16	+	8	+++
iv14		231	1:320	-	++/+	0,07	16	+	6	+++
iv16		231	1:5120	+	++/+	0,06	16	+	12	+++
iv12		231	1:1280	-	++/+	0,01	8	+	2	+
ic16		231	1:20480	++	++/+	0,07	16	+	12	+++
se2		231	< 1:10	-	(+/-)	0,00	1	-	-	-

dpi = *dies post infectionem*, p.m. = *post mortem*,

+ = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, - = Dm ohne Befund/kein PaBV-Nachweis

n = Anzahl positiver Organe

* Untersuchung auf PaBV-Antigen in Hirn, Auge, Rückenmark, *N. ischiadicus*, Nebenniere, Herz, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, Darm, *M. pectoralis*, Haut + Federn

[#]Reisolierung PaBV aus Hirn- und Retina-Gewebeproben: Abstufung der Infektionsgeschwindigkeit auf CEC-32-Zellen: + = langsam (Nachweis von infektiösem Virus nach 3 Passagen in CEC-Zellen), +++ = schnell (Nachweis von infektiösem Virus fünf Tage pi von CEC-Zellen)

4.13 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine PaBV-4- als auch eine PaBV-2-Infektion die für eine PDD charakteristische klinische Symptomatik als auch nichteitrige mononukleäre Ganglioneuritis im zentralen und peripheren Nervensystem und im Magen-Darm-Trakt induziert. Durch den Nachweis einer persistierenden PaBV-Infektion aller infizierten Versuchstiere konnten die Henle-Koch'schen Postulate erfüllt werden. Eine Übertragung des Virus auf die nichtinfizierten Sentineltiere wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt sicher nachgewiesen. Hinsichtlich des Erkrankungsverlaufs traten deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. In Versuch II (PaBV-2) erkrankten insgesamt 12 Tiere im Versuchszeitraum, wovon 11 Tiere starben/euthanasiert wurden. Dagegen erkrankten in Versuch I (PaBV-4) im Versuchszeitraum nur fünf Tiere, von denen drei euthanasiert wurden. Zwei weitere Vögel starben plötzlich ohne vorherige Symptomatik. In Versuch II ließen sich die Versuchstiere abhängig vom Erkrankungsverlauf in drei Gruppen unterteilen, die einen 1. perakuten bis akuten Verlauf zeigten und innerhalb des ersten Versuchsdrittels starben/euthanasiert wurden, 2. einen subakut bis protrahierten Verlauf zeigten und im zweiten Drittel des Versuchs starben/euthanasiert wurden und 3. einen chronischen bis subklinischen Verlauf aufwiesen. Dies korreliert mit dem PaBV-2-RNA-Gehalt in den Organen sowie dem Wachstum in Zellkultur. In beiden Versuchsgruppen blieb ein Teil der infizierten Vögel bis zum Versuchsende symptomfrei trotz hoher Antikörpertiter und PaBV-RNA-Gehalte in den Organen. Je länger ein Vogel im Versuchszeitraum überlebte, desto höher stiegen Antikörpertiter und RNA-Gehalte der Organe, desto mehr Organe waren positiv im RNA- und Antigennachweis und desto schneller gelang die Reisolierung von PaBV aus Organmaterial.

5 Diskussion

Die psittazine Drüsenmagendilatation (PDD) wurde erstmals in den späten 1970er Jahren beschrieben (RIDGWAY et al., 1983; GRAHAM 1984; BUSCHE et al., 1985). Lange Zeit konnte die Ätiologie der Erkrankung nicht geklärt werden, bis 2008 das aviäre Bornavirus als potentieller Erreger identifiziert wurde (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). Es folgten zahlreiche Studien an natürlich infizierten Vögeln, die den engen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit aviären Bornaviren und der Erkrankung an PDD weiter bekräftigten. Dieser Zusammenhang wurde daraufhin durch mehrere Tierversuche mit verschiedenen Vogelspezies bestätigt (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010; MIRHOSSEINI et al., 2011). Diese Studien wurden jedoch mit nur zwei (GRAY et al., 2010; MIRHOSSEINI et al., 2011) oder drei (GANCZ et al., 2009) Versuchstieren durchgeführt. Diese wiesen zudem eine Infektion mit psittazinem Herpesvirus (GRAY et al., 2010) oder mit anderen aviären Bornaviren als den zur Infektion verwendeten auf (MIRHOSSEINI et al., 2011). In dem Versuch von Gancz et al. (2009) enthielt das verwendete Inokulat neben PaBV auch Retro- und Astroviren (GANCZ et al., 2009). Da es in diesen Studien um die Fragestellung ging, ob es überhaupt möglich ist, Psittaziden mit aviären Bornaviren zu infizieren und klinische Symptome auszulösen, wurden die Versuchstiere zumeist auf vielen verschiedenen Routen gleichzeitig infiziert (GANCZ et al., 2009; MIRHOSSEINI et al., 2011). Detaillierte Informationen über Erkrankungsverlauf, Serokonversion, histologische Läsionen, Virusausscheidung und Reisolierung, die anhand einer statistisch adäquaten Tier- und Probenanzahl bezogen wurden, fehlten jedoch, um somit letztendlich den Beweis einer ätiologischen Rolle der aviären Bornaviren bezüglich PDD zu liefern. Die vorliegende Studie arbeitet diese Details erstmalig anhand einer statistisch berechneten Tierzahl zuverlässig und in einem zweiten Versuch reproduzierbar heraus. Die unterschiedlichen Infektionsverläufe und typischen Symptome, wie sie in der Praxis beobachtet werden, konnten hierbei reproduziert werden. Es wurde eine Infektionsrate von 100% sowie eine persistierende PaBV-Infektion bei allen infizierten Tieren erreicht. Dies wird durch den konstanten und kontinuierlichen Nachweis von PaBV-RNA, PaBV-Antigen, infektiösem Virus und spezifischen anti-PaBV-Antikörpern belegt.

Somit ist diese Studie die weltweit erste, die die Henle-Koch'schen Postulate zu PaBV-2 und PaBV-4 als Ursache der PDD statistisch belegbar erfüllt. Des Weiteren handelt es sich um die erste Untersuchung zweier unterschiedlicher Varianten des *Psittaciform 1 bornavirus*, die anhand eines identischen Versuchsaufbaus einen statistisch untermauerten Vergleich der Infektionsverläufe erlaubt.

5.1 Eignung der gewählten Inokulate

In Versuch I wurde ein PaBV-4-Isolat verwendet, welches aus einem an PDD erkrankten hellroten Ara (*Ara macao*) isoliert wurde. In Versuch II wurde ein PaBV-2-Isolat eines an PDD erkrankten Nymphensittichs (*Nymphicus hollandicus*) verwendet. Beide Vögel, von denen das jeweilige Isolat stammt, hatten zuvor einen hochgradig progressiven Krankheitsverlauf gezeigt. Dies lässt vorerst auf eine grundsätzlich vorhandene Pathogenität bei beiden Isolaten schließen. Da mit beiden Isolaten sowohl bei allen infizierten Versuchstieren als auch in CEC-32-Zellen eine persistierende PaBV-Infektion induziert werden konnte, sind sie hinsichtlich der Untersuchung des Infektionsverlaufs grundsätzlich geeignet. Ebenso wurden in allen infizierten Vögeln charakteristische, PDD-assoziierte histopathologische Veränderungen identifiziert, und in beiden Versuchen wurden klassische klinische Symptome ausgelöst, sodass beide Isolate auch zur Untersuchung eines Zusammenhangs mit PDD geeignet waren. Dennoch wurden hinsichtlich der Infektions- und Erkrankungsverläufe Unterschiede zwischen den Versuchen festgestellt. Das PaBV-4-Isolat zeigte schon in der Zellkultur eine wesentlich schnellere und höhere Replikationsrate als das PaBV-2-Isolat. Die Ausscheidung von PaBV-4-RNA erfolgte früher als bei PaBV-2, die Antikörpertiter und der RNA-Gehalt der Organe waren höher als bei PaBV-2. Dies lässt zunächst eine höhere Virulenz des PaBV-4-Isolates für die Versuchstiere vermuten. Hinsichtlich der klinischen Ausprägung aber ergeben sich andere Unterschiede. In beiden Tierversuchen konnten zwar klinische Symptome beobachtet werden. In Versuch I (PaBV-4) erkrankten jedoch nur fünf Tiere im Gegensatz zu 12 Tieren in Versuch II (PaBV-2). Vom psittazinen Herpesvirus Typ 1 (PsHV-1) beispielsweise ist bekannt, dass es pathogen für alle Genera der Familie *Psittacidae* ist, die verschiedenen Genera

aber unterschiedliche Erkrankungsverläufe aufweisen. Verlauf und Ausgang einer Infektion sind hier abhängig vom Serotyp und von der betroffenen Psittazidenspezies (KALETA et al., 2011). Beim aviären Paramyxovirus, (PMV) neben den *Bornaviridae* ein Vertreter der Ordnung *Mononegavirales*, ist es ähnlich. Die unterschiedlichen Serotypen des aviären Paramyxovirus weisen für verschiedene Wirte eine unterschiedliche Pathogenität auf. Für PMV-1 sind Hühner am empfindlichsten, dann folgen Puten, Tauben und zuletzt Wassergeflügel, Finkenvögel und Psittaziden (ALEXANDER 1998). PMV-2-, 3- 6- und -7 sind eher für Puten pathogen (SIEGMANN et al., 2012), wobei PMV-2 auch für Finkenvögel und PMV-3 und -5 für Psittaziden pathogen sind (KALETA et al., 2011). Darüber hinaus gibt es innerhalb der Serotypen unterschiedlich virulente Stämme, die durch den intrazerebralen Pathogenitätsindex ICPI charakterisiert sind (ALEXANDER 1998; ALEXANDER 2009; KALETA et al., 2011; SIEGMANN et al., 2012). Für das verwendete PaBV-4-Isolat, das beim Ara zu einem progressiven Krankheitsverlauf geführt hat, ist der Nymphensittich zwar empfänglich, möglicherweise aber weniger empfindlich. Für das verwendete PaBV-2-Isolat aus einem Nymphensittich schienen die Versuchstiere umso empfindlicher. Da aviäre Bornaviren im Gegensatz zu den Bornaviren der Säugetiere eine hohe genetische Heterogenität aufweisen (RUBBENSTROTH et al., 2012), ist durchaus vorstellbar, dass die unterschiedlichen Spezies und Virusvarianten jeweils verschiedene Eigenschaften in verschiedenen Papageienspezies zeigen. Speziesübergreifende Infektionen mit dem gleichen PaBV-Stamm wurden jedoch schon von Kistler et al. (2010), belegt. Hier infizierten sich Jendayasittiche (*Aratinga jendaya*) bei einem Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus erithacus*) mit einem PaBV-2-Stamm und starben infolge der Erkrankung (KISTLER et al., 2010). In den bislang publizierten Infektionsversuchen wurden ebenfalls PaBV-Isolate verwendet, die nicht aus der gleichen Papageienspezies isoliert worden waren. Auch in diesen Studien konnte eine erfolgreiche Infektion der Versuchstiere nachgewiesen sowie klinische Symptome beobachtet werden (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010; MIRHOSSEINI et al., 2011). Die Daten in der Literatur geben bislang unzureichend Aufschluss über etwaige Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies der aviären Bornaviren genauso wie zwischen den verschiedenen Varianten einer

Spezies, da sowohl Berichte über erkrankte Tiere als auch klinisch gesunde Träger, z.T. in der gleichen Voliere, existieren. Die Unterschiede zwischen Versuch I und II in Verbindung mit der Vorgeschichte der Isolate und der bisherigen Literatur deuten vielmehr auf ein Zusammenwirken von mehreren Faktoren hin, wie z.B. Virulenz des Erregers, Empfänglichkeit bzw. Empfindlichkeit der betreffenden Wirtsspezies oder Immunstatus des Wirtes, die letztendlich den Ausbruch der Erkrankung zu beeinflussen scheinen. Zudem wurden die verwendeten Inokulate nicht auf weitere Viren untersucht, die das Krankheitsgeschehen beeinflusst haben könnten. Da die Isolate jedoch mehrfach in Zellkultur passagiert wurden, können Viren mit einem ausgeprägten zytopathischen Effekt, wie z.B. Paramyxoviren oder psittazine Herpesviren, ausgeschlossen werden. Durch die Sequenzierung der Isolate kann darüber hinaus ausgeschlossen werden, dass die Inokulate andere PaBV-Varianten enthielten. Eine Beeinflussung der Infektions- und Erkrankungsverläufe durch andere Viren als PaBV-4 bzw. PaBV-2 ist somit unwahrscheinlich.

Schließlich stellt sich die Frage, ob ein PaBV-Isolat aus einem Ara pathogen für den Nymphensittich sein kann, ob es sich in diesem genauso verhält wie im Ara und ob PaBV-2 grundsätzlich virulenter ist als PaBV-4. Der Verlauf der Erkrankung mit wenigen klinisch erkrankten Fällen könnte aber für PaBV-4 der Normalfall sein. Grundsätzlich beziehen sich die Ergebnisse auf die hier verwendeten Isolate. Eine generelle Übertragung der Schlussfolgerungen auf PaBV-2 oder -4 sollte nur unter Vorbehalt erfolgen.

5.2 Eignung der Versuchstiere

Der Nymphensittich wurde als Versuchstier ausgewählt, da er sich erfahrungsgemäß durch eine einfache Handhabung hinsichtlich Haltung, Vermehrung und Aufzucht auszeichnet. Zwar scheinen Großpapageien empfänglicher für PDD zu sein (GREGORY et al., 1994), doch ist aus der Literatur bekannt, dass sich Nymphensittiche erfolgreich mit aviären Bornaviren infizieren lassen und an PDD erkranken können (GANCZ et al., 2009; MIRHOSSEINI et al., 2011; PAYNE et al., 2011). Inwiefern die Ergebnisse sich auf andere Psittazidenspezies, insbesondere der Familie der *Psittacidae*, übertragen lassen

bleibt unklar. Ein Tierversuch mit einer Großpapageienspezies hätte möglicherweise eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere *Psittacidae* erlaubt. Doch da die Versuche eine solide, statistische Auswertbarkeit liefern sollten, wären insgesamt 42 Großpapageien der gleichen Spezies nötig gewesen. Dies wäre artenschutzrechtlich nicht vertretbar gewesen, da viele der Großpapageien laut IUCN Red List bereits gefährdet sind. Darüber hinaus wären die Haltungsansprüche um ein Vielfaches höher und somit aus Platzgründen nicht realisierbar gewesen.

Doch nicht nur die Spezies spielt eine Rolle bei der Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf andere Papageienspezies. Obwohl der Nymphensittichbestand der Klinik aus nur einigen wenigen Großelternpaaren aufgebaut wurde, und innerhalb von 3 Jahren bis zum Versuchsbeginn eine gewisse Inzucht stattfand, bleibt ein hohes Maß an genetischer Variabilität innerhalb der Versuchsgruppen erhalten. Dadurch sind individuelle Faktoren nicht auszuschließen. Diese Faktoren rücken aber in der Literatur immer weiter in den Focus und gelten als immer wahrscheinlicher, bezüglich aviärer Bornaviren eine große Rolle bei Infektions- und Krankheitsverlauf zu spielen (KISTLER et al., 2010; MIRHOSSEINI et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Eine Übertragung der Ergebnisse selbst auf andere Nymphensittiche sollte also vorerst nur unter Vorbehalt geschehen, bis weitere Erkenntnisse zur Pathogenese einer Infektion mit aviären Bornaviren vorliegen. Um aber grundsätzliche Kenntnisse zu aviären Bornaviren als Ursache der PDD sowie Infektionsverläufe, Serokonversion und Ausscheidung zu erhalten erscheint der Nymphensittich als sehr gut geeignet.

5.3 Versuchstierhaltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Isolatoren. In Versuch I befanden sich je drei Käfige mit jeweils drei bis vier Vögeln in einem Isolator. Der Untergrund bestand aus einem Gitter, durch das Exkremente auf den Isolatorboden fielen. Dadurch war der Kot der Tiere gut beurteilbar und zumeist zuordenbar, jedoch sammelte sich auf diesem Wege schnell Feuchtigkeit auf dem Isolatorboden an, was möglicherweise den Nachweis von *Mucor* spp. im Drüsenmagen von iv2, iv3

und ic3 sowie den Nachweis von *Candida tropicalis* im Drüsenmagen von iv4 in Versuch I erklärt. In Versuch II wurden die Isolatoren so ausgestaltet, dass sich eine ganze Versuchsgruppe dort frei bewegen konnte. Dadurch wurde die Haltung verbessert, da den Versuchstieren auf diese Weise mehr Bewegung und soziale Interaktion ermöglicht wurde. Jedoch konnten Exkremente nun schwieriger den einzelnen Vögeln zugeordnet werden. Um Feuchtigkeitsansammlungen durch Urin zu verringern, wurde der Gitterboden mit Zellstoff ausgelegt, der mehrmals wöchentlich gewechselt wurde. Dies erschwerte jedoch zusätzlich die Kotbeurteilung, da sich auch Spelzen auf dem Zellstoff ansammelten und mit dem Kot vermengten, was augenscheinlich leichter mit unverdauten Körnern im Kot und so mit einem klinischen Symptom der PDD (RIDGWAY et al., 1983; WOERPEL et al., 1984a; MANNL et al., 1987) verwechselt werden konnte. In Versuch I wurde bei der Einrichtung der Isolatoren Wert darauf gelegt, dieses Symptom frühzeitig erkennen zu können. Durch den Nachweis von Schimmel- und Hefepilzen bei vier der Versuchstiere musste in Versuch II jedoch zwingend eine Änderung der Isolatoreinrichtung vorgenommen werden, um die Hygiene zu verbessern. Somit wurde in Kauf genommen, unverdaute Körner möglicherweise zu übersehen, um eine Beeinflussung des Versuches durch andere Pathogene zu minimieren. Trotz der Auslegung des Gitterbodens mit Zellstoff wurde in Versuch II bei iv11 *Mucor* spp. im Adbominalluftsack nachgewiesen. Infektionen mit Hefepilzen, wie *Candida* spp., und Schimmelpilzen, wie *Mucor* spp., können durch haltungsbedingte Exposition hervorgerufen werden (MCKINNEY 2008; REDIG 2008; SILVANOSE 2008). Daher ist es insbesondere in Versuch I wahrscheinlich, dass der Nachweis von *Mucor* und *Candida* spp. durch die nicht optimale Hygiene und Belüftung verursacht wurde. Eine reine Kausalität der Symptome durch die Pilzinfektion ist unwahrscheinlich, da der Erkrankungsverlauf der Versuchstiere mit *Mucor*- oder *Candida*-Nachweis sehr unterschiedlich war. Zwei Tiere (iv2 und iv11) waren perakut verstorben und drei Tiere (ic3, iv3 und iv4) gehörten zu der Gruppe in Versuch I, die nach 115/116 Tagen pi euthanasiert wurde, und zeigten keine Symptomatik einer *Candida*- oder *Mucor*-Infektion. Eine Beeinflussung des Erkrankungsverlaufs bei iv2 und iv11 durch die Pilzinfektionen ist aber durchaus denkbar.

5.4 Inokulationsrouten

Als Inokulationsrouten für die Nymphensittiche wurden der intravenöse und der intrazerebrale Weg gewählt. In der Literatur über das *Mammalian 1 bornavirus (ehemals BDV)* wurden experimentelle Infektionen an Lewis Ratten durchgeführt, die intranasal, peroral, subcutan, intracerebral, intramuskulär und intravenös mit BoDV infiziert wurden. Während durch perorale und intravenöse Inokulation keine persistierende Infektion und keine Erkrankung ausgelöst werden konnte, wurden nach intrazerebraler, intranasaler, subkutaner und intramuskulärer Applikation sowohl klinische Symptome der Bornaschen Krankheit als auch eine persistierende BoDV-Infektion der Versuchstiere beobachtet. Am schnellsten breitete sich das Virus in intracerebral und intranasal infizierten Ratten aus. Hier war auch der schwerwiegendste Krankheitsverlauf festzustellen. (NARAYAN et al., 1983a; CARBONE et al., 1987; MORALES et al., 1988; CARBONE et al., 1989; DESCHL et al., 1990). Da der natürliche Infektionsweg der aviären Bornaviren noch nicht geklärt ist und somit im Vorhinein unklar war, ob und wie die Versuchstiere mit aviären Bornaviren infiziert werden können, sollten in Anlehnung an die BoDV-Literatur zwei Inokulationsrouten ausgewählt werden, von denen der größtmögliche Unterschied zu erwarten war. Daher wurden die intrazerebrale und die intravenöse Inokulationsroute für diesen Versuch ausgewählt.

In Versuch I wurde zwar in der ic-Gruppe eine frühere PaBV-RNA-Ausscheidung als in der iv-Gruppe festgestellt, und in Versuch II ein höherer PaBV-RNA-Gehalt in den Organen. Trotzdem konnten die Versuchstiere in beiden Versuchen sowohl per intrazerebraler als auch per intravenöser Inokulation persistent infiziert werden. Hinsichtlich des Krankheitsverlaufes wurden keine Unterschiede zwischen den Inokulationsgruppen beobachtet. Hier wurde also ein deutlicher Unterschied zu BoDV aufgezeigt. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei beiden Infektionsrouten nicht um den natürlichen Infektionsweg von aviären Bornaviren handeln kann. In dieser Studie ging es allein um die Fragestellung, ob mit dem jeweils gewählten PaBV-Isolat überhaupt eine erfolgreiche, persistierende Infektion der Versuchstiere erfolgen kann und ob klinische Symptome hervorgerufen werden können. Zur Untersuchung der natürlichen Infektionsroute

sind weitere Versuche notwendig. Insgesamt gelang es aber, mit dem gewählten Versuchsaufbau und den gewählten Versuchstieren ein valides Infektionsmodell für aviäre Bornaviren zu etablieren, welches es zuvor noch nicht gab.

5.5 Untersuchungen zum Krankheitsverlauf

5.5.1 Erstes Auftreten klinischer Symptome - Inkubationszeit

Erste Symptome traten in Versuch I (PaBV-4) 33 Tage pi auf (ic2) und in Versuch II (PaBV-2) 22 Tage pi (ic14). In bislang publizierten experimentellen Infektionen mit aviären Bornaviren wird eine Inkubationszeit von 21 (GANCZ et al., 2009), 33 (MIRHOSSEINI et al., 2011) und 66 Tagen beschrieben (GRAY et al., 2010). Diese Angaben decken sich sehr gut mit der vorliegenden Studie. Bei den bisher beschriebenen natürlichen Infektionen mit aviären Bornaviren ist eine Inkubationszeit schwer zu bestimmen, da der Infektionszeitpunkt nicht exakt definiert werden kann. Bei der Beobachtung eines PDD-Ausbruchs durch eine PaBV-2-Infektion bei einem Züchter durch Kistler et al. (2010) kann die Inkubationszeit aber auf ca. drei Wochen eingegrenzt werden (KISTLER et al., 2010). Auch diese Angaben decken sich mit denen der vorliegenden Untersuchungen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit die unterschiedlich lange Inkubationszeit, die in der Literatur für PDD beschrieben ist, ebenfalls beobachtet werden. Da in der Literatur Inkubationszeiten von bis zu 10 Jahren angegeben werden (SUEDEMEYER 1992; HOPPES et al., 2009), ist es vorstellbar, dass bei einer längeren Versuchsdauer noch weitere Vögel erkrankt wären, insbesondere in Versuch I. Für die Bornasche Krankheit ist bei experimentellen BoDV-Infektionen ebenfalls eine sehr variable Inkubationszeit zwischen 17 und 92 Tagen beschrieben, die abhängig von der Inokulationsroute ist. Die kürzeste Inkubationszeit bei Ratten zeigte sich in einer Studie von Carbone et al. (1987) nach intrazerebraler Inokulation, die längste nach subkutaner Inokulation. Zudem war die Inkubationszeit abhängig von der applizierten Virusmenge. Je höher der Virustiter des Inokulums war, desto früher wurden klinische Symptome beobachtet (CARBONE et al., 1987). Auch in einer Studie an intrazerebral infizierten Ponies wurde eine variable Inkubationszeit, abhängig von der applizierten Virusmenge, beobachtet. Diese betrug bei einem Infektionstiter von 2×10^4 ID₅₀ 15 Tage, bei 5×10^3 ID₅₀ 18 Tage und bei 1×10^3 ID₅₀ 26 Tage (KATZ et

al., 1998). Bei der natürlichen BoDV-Infektion wird von einer ebenfalls variablen Inkubationszeit zwischen zwei Wochen und mehreren Monaten ausgegangen (SCHMIDT 1952). In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Inokulationsgruppen hinsichtlich der Inkubationszeit festgestellt werden. Vor dem Hintergrund, dass, im Gegensatz zu BoDV, die iv-Inokulation bei PaBV eine ebenso persistierende Infektion wie die ic-Inokulation induziert, ist diese Tatsache nicht überraschend. Eine Abhängigkeit der Inkubationszeit von der Inokulationsroute kann anhand der vorliegenden Ergebnisse noch nicht bestätigt werden. Zu einer vollständigen Aussage diesbezüglich wäre es nötig, noch weitere Inokulationsrouten zu untersuchen.

5.5.2 Krankheitsbilder und -verläufe

Die Versuche zeigten hinsichtlich der Erkrankungsverläufe deutliche Unterschiede auf. In Versuch II formten sich abhängig von Inkubationszeit und Todes-/Euthanasiezeitpunkt drei verschiedene Verlaufgruppen mit einem perkuten-akuten Verlauf, mit einem subakuten-protrahierten Verlauf sowie mit einem chronischen-subklinischen Verlauf. In Versuch I hingegen waren die Verläufe, womöglich auch aufgrund der geringen Anzahl erkrankter Versuchstiere, nicht so eindeutig. Die Ausprägung der beobachteten Symptome unterschied sich ebenfalls deutlich zwischen den Versuchen. In Versuch I wiesen zwei Vögel die typischen unverdauten Körner im Kot auf, in Versuch II trat dieses Phänomen nicht auf. Hier zeigten die Tiere überwiegend unspezifische Symptome wie starken Gewichtsverlust und ein reduziertes Allgemeinbefinden. Während in Versuch I drei Vögel (ic1, ic2 und iv5) neurologische Symptome in Form von Ataxie und Diskoordination bis hin zu epileptiformen Anfällen aufwiesen, zeigten in Versuch II zwei Vögel (ic11 und ic12) lediglich eine leichte Ataxie. Diese Unterschiede in den klinischen Symptomen spiegeln die Beobachtungen in der Literatur wieder. Zum einen konnten die typischen gastrointestinalen und neurologischen Symptome reproduziert werden, wie unverdaute Körner im Kot (WOERPEL et al., 1984a), Ataxie, Diskoordination (PHALEN 1986) und anfallsartige Erscheinungen (TURNER 1984). Zum anderen wurden, wie in der Literatur, auch unspezifische Symptome, wie reduziertes Allgemeinbefinden, Gewichtsverlust (RIDGWAY et al., 1983; CLARK 1984; TURNER 1984) und

plötzliche Todesfälle (GRUND et al., 2004; LUBLIN et al., 2006) beobachtet. Gastrointestinale und allgemeine Symptome wurden auch in den bislang publizierten experimentellen Infektionen beobachtet. Gancz et al. (2009) stellten bei zwei ihrer mit PaBV-4 infizierten Nymphensittiche eine Gewichtsabnahme sowie unverdaute Körner im Kot fest. Das dritte Versuchstier blieb bis zum Versuchsende symptomlos (GANCZ et al., 2009). Gray et al. (2010) beschreiben nur bei einem der zwei infizierten Felsensittiche (PaBV-4) eine Gewichtsabnahme und sprechen sonst bei beiden Tieren nur von „PDD-typischen“ Symptomen (GRAY et al., 2010). Im Versuch von Mirhosseini et al. (2011) wurde bei beiden mit PaBV-2 infizierten Nymphensittichen Apathie und Gewichtsabnahme beobachtet (MIRHOSSEINI et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden also erstmalig neurologische Symptome durch die experimentelle Infektion mit PaBV ausgelöst. Dies kann entweder durch die höhere Tierzahl bedingt sein, oder es handelt sich um einen weiteren Hinweis, dass individuelle Faktoren den Erkrankungsverlauf beeinflussen könnten. Darüber hinaus könnte es eine Rolle gespielt haben, dass in dieser Studie eine Versuchsgruppe jeweils intrazerebral inokuliert wurde, da vier der fünf Nymphensittiche mit neurologischer Symptomatik aus der jeweiligen ic-Gruppe stammten. In keinem der publizierten Infektionsversuche mit aviären Bornaviren wurden die Vögel intrazerebral infiziert. Die intrazerebrale Inokulation ist aber eine etablierte Methode, um anhand von Eintagsküken den intrazerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) von Paramyxovirus-1-Stämmen zu untersuchen (ALEXANDER 1998). Zudem zeigte keins der mock-ic-inokulierten Versuchstiere neurologische Symptome. Daher ist ein Auslösen von neurologischen Symptomen durch diese Inokulationsmethode nahezu ausgeschlossen.

5.5.3 Anzahl der erkrankten Versuchstiere

In Versuch I (PaBV-4) wiesen fünf Versuchstiere klinische Symptome auf, in Versuch II (PaBV-2) hingegen 12 Vögel. Schon zur Hälfte der Versuchslaufzeit (115/116 dpi) waren in Versuch II 10 Nymphensittiche erkrankt und acht davon euthanasiert worden oder gestorben. In Versuch I war zu diesem Zeitpunkt erst ein Nymphensittich klinisch erkrankt und euthanasiert worden, ein weiterer war perakut verstorben. Diese Unterschiede deuten erstmals auf einen Zusammenhang

zwischen dem verwendeten Isolat und dem Erkrankungsverlauf hin, also auf das Vorhandensein einer unterschiedlichen Virulenz. Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben ist dies insbesondere schon bei PMV bekannt. Hier werden innerhalb der einzelnen Serotypen unterschiedlich virulente Stämme in lentogen, mesogen und velogen eingeteilt (SIEGMANN et al., 2012). Die Literatur zu aviären Bornaviren liefert bisher kaum Informationen zu den einzelnen Spezies und Virusvarianten hinsichtlich des Erkrankungsverlaufs. Die einzige größere Untersuchung wurde von Kistler et al. (2010) publiziert. Hier wird ein PDD-Ausbruch bei einem Züchter beschrieben, nachdem ein PaBV-2-positiver Graupapagei in den Bestand integriert wurde. Innerhalb von drei Monaten starben 11 der 46 Papageien im Bestand, nachdem sie sowohl gastrointestinale als auch neurologische Symptome gezeigt hatten (KISTLER et al., 2010). Einzelfallberichte existieren sowohl über PaBV-1 (WÜNSCHMANN et al., 2011), als auch PaBV-2 (OGAWA et al., 2011) und PaBV-4 (NEDOROST et al., 2012) sowie Erwähnungen zu Infektionen mit den verschiedenen PaBV-Varianten ohne ausführliche Symptombeschreibungen. Dabei findet man insbesondere zu PaBV-2 und PaBV-4 sowohl akute als auch protrahierte und subklinische Verläufe. Dies bestätigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche ebenso wie auch große Unterschiede im Infektionsverlauf innerhalb von PaBV-2 oder PaBV-4. Eine allgemeingültige Aussage zu Virulenz und Pathogenität der verschiedenen Spezies und Virusvarianten ist somit auch in Verbindung mit den in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnissen nicht möglich. Es ist aber vorstellbar, dass der Erkrankungsverlauf wie bei PMV abhängig von einem Zusammenspiel von Wirtsempfänglichkeit und Virulenz des Erregers ist, und nicht generell durch das jeweilige PaBV bestimmt wird. Dies setzt voraus, dass innerhalb der verschiedenen Spezies und Varianten analog zu PMV unterschiedlich virulente Stämme existieren. Diesbezüglich liegen aber noch keine Untersuchungen vor.

5.5.4 Geschlechtsspezifische Prädisposition

Ein neuer, bislang in der Literatur nicht untersuchter Aspekt stellt sich bei der näheren Betrachtung der Geschlechterverteilung der erkrankten Vögel heraus. In Versuch I waren vier der fünf Vögel die klinische Symptome zeigten, weiblich. In Versuch II waren neun der 12 klinisch erkrankten Vögel weiblich. Dies ist sehr

wahrscheinlich rein zufallsbasiert, da der Anteil der weiblichen Tiere in Versuch I 10 von 18 inokulierten Tieren betrug und in Versuch II 11 von 18 inokulierten Tieren. Untersuchungen hinsichtlich einer geschlechtsspezifischen Prädisposition sind bislang nicht vorhanden und in der Literatur kaum erwähnt. Angaben zum Geschlecht fehlen in den meisten Fallberichten zu aviären Bornaviren. In den Untersuchungen von Lierz et al. (2009) wurden 100 Papageien auf aviäre Bornaviren untersucht. Hier wurde kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von aviären Bornaviren und dem jeweiligen Geschlecht des Vogels gesehen (LIERZ et al., 2009). Auch in einer Studie von Heffels-Redmann et al. (2012), in der 63 Papageien auf PaBV untersucht wurden konnte kein Einfluss des Geschlechts festgestellt werden (HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Desweiteren ist eine geschlechtsspezifische Prädisposition eher unwahrscheinlich, da bislang keine geschlechtsgebundene Symptomatik durch eine Infektion mit aviären Bornaviren beschrieben wurde.

5.6 Pathologisch-anatomische Befunde

In Versuch I (PaBV-4) wiesen sieben Nymphensittiche einen dilatierten Drüsenmagen auf, wobei ein Vogel (ic2) einen hochgradig, vier Vögel (ic1, iv1, iv2, iv3) einen mittelgradig und zwei Vögel (iv4, ic3) einen geringgradig dilatierten Drüsenmagen zeigten. Im Gegensatz dazu wiesen 10 Nymphensittiche in Versuch II einen dilatierten Drüsenmagen auf. Dieser war bei fünf Vögeln (iv11, iv13, iv15, ic11, ic14, alle zur Gruppe der perakut-akut erkrankten Vögel gehörend) hochgradig, bei vier Vögeln (iv10, iv17, ic16, ic13) mittelgradig und bei einem Vogel (iv16) geringgradig dilatiert. In der Literatur wird ein dilatiertes Drüsenmagen und unverdaute Futterbestandteile im Magen-Darm-Trakt als pathologisch-anatomischer Leitbefund bei der PDD beschrieben (HUGHES 1984; TURNER 1984). Auch bei den bereits publizierten experimentellen PaBV-Infektionen wiesen alle infizierten Versuchstiere einen dilatierten Drüsenmagen auf. Mirhosseini et al. (2011) beschreiben bei beiden Nymphensittichen eine geringgradige Dilatation des Drüsenmagens (MIRHOSSEINI et al., 2011), Gancz et al. (2009) und Gray et al. (2010) geben keinen Grad der Dilatation an (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010). In der Literatur werden bezüglich natürlich PaBV-infizierter Psittaziden mit PDD alle Grade der Dilatation beobachtet, von gering-

über mittel- bis hochgradig (KISTLER et al., 2008; KISTLER et al., 2010; OGAWA et al., 2011; PAYNE et al., 2011; WÜNSCHMANN et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Interessant ist, dass bei Gancz et al. (2009) auch das symptomfreie Versuchstier einen dilatierten Drüsenmagen aufzeigte (GANCZ et al., 2009). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden. In Versuch I (PaBV-4) hatten zwei der sieben Versuchstiere, die in der Sektion einen dilatierten Drüsenmagen aufwiesen, vorher keine klinischen Symptome gezeigt. Ein weiterer Vogel war plötzlich verstorben. In Versuch II (PaBV-2) war von zehn Vögeln mit einer Drüsenmagendilatation nur einer ohne vorherige Symptomatik. Es ist wahrscheinlich, dass diese Vögel zum Euthanasie- oder Todeszeitpunkt durch die pathologischen Veränderungen am Gastrointestinaltrakt noch nicht in dem Maße beeinträchtigt waren, dass es sich klinisch äußerte. Möglicherweise hätten sie aber bei einer längeren Versuchslaufzeit noch erkennbare Symptome entwickelt. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Vögel als Schwarmtiere instinktiv ihre Symptome sehr lange zu verbergen versuchen (KUMMERFELD 2011).

5.7 Histopathologische Befunde

Histopathologisch konnte eine PDD anhand von lymphoplasmazellulären Infiltraten in Ganglien des ZNS und des oberen Magen-Darm-Trakts (BOUTETTE et al., 2004) bei allen inokulierten Vögeln in Versuch I und II nachgewiesen werden. So wurden das *Parrot bornavirus 2* und *4* als Vertreter der aviären Bornaviren als auslösendes Agens für die PDD in dieser Studie bestätigt. Auffällig war, dass bei einigen Vögeln keine Infiltrate im ZNS und bei einem Vogel (ic7) keine Infiltrate im Magen-Darm-Trakt gefunden wurden. Dies könnte durch die beim Nymphensittich teilweise nur geringe Größe der Organe bedingt sein. Zumal die Organe für den RNA-Nachweis, für die Virusisolierung und die histopathologische/immunhistochemische Untersuchung aufgeteilt werden mussten. Somit konnte nicht gewährleistet werden, dass immer ein infiltrathaltiges Gewebestück in Formalin gebracht wurde. In der Literatur ist angegeben, dass falsch-negative Ergebnisse entstehen können, wenn in der entnommenen Probe kein Nervengewebe enthalten ist, oder wenn gerade an der beprobten Stelle keine Infiltrate auftreten (GERLACH 1994; GREGORY et al., 1996).

Auch die Studien von Berhane et al. (2001) und von Grund et al. (2004) untermauern, dass der Anteil der Organe mit einem positiven Infiltratnachweis sehr unterschiedlich ausfallen kann. In der Studie von Berhane et al. (2001) konnten bei 14 PDD-erkrankten Vögeln in 46 % der Fälle lymphoplasmazelluläre Infiltrate im Gehirn und in 69% der Fälle im Rückenmark nachgewiesen werden. Weiterhin wurden diese Infiltrate in 43 % der untersuchten Kröpfe, in 36 % der Drüsenmägen, in 93 % der Muskelmägen und in 21 % der untersuchten Darmgewebeproben nachgewiesen werden (BERHANE et al., 2001). In der Studie von Grund et al. (2004) wurden bei 73 PDD-erkrankten Vögeln die charakteristischen mononukleären Infiltrate in 41,1 % der untersuchten Gehirne nachgewiesen, sowie in 28 % der Kröpfe, in 59,6 % der Drüsenmägen und in 68,6 % der untersuchten Muskelmägen (GRUND et al., 2004). Beide Studien kommen zu dem Schluss, dass in vielen Fällen nur die Untersuchung aller Organe eines verstorbenen Vogels eine sichere Diagnose liefert. Auch in der vorliegenden Arbeit waren die Anteile der pathohistologisch positiven Organe sehr unterschiedlich. Die Organe, die am häufigsten eine Ganglioneuritis non-purulenta aufwiesen, waren in Versuch I Gehirn und Darm (83,33 %) und in Versuch II der Muskelmägen (88,89 %).

Die Befunde einer granulomatösen Steatitis der Haut (se1), einer geringgradigen Verfettung der Hepatozyten (iv2, ic4, ic8) und einer geringgradigen Tubulusverfettung (iv2, iv7) in Versuch I sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die mangelnde Bewegungsfreiheit der Vögel in den Käfigen zurückzuführen. In Versuch II traten diese Befunde daher möglicherweise nicht auf, welches vermutlich ein Beleg für die verbesserte Haltung der Tiere in Versuch II ist.

5.8 Bakteriologische und mykologische Befunde

Bei den Vögeln, die morgens verstorben im Isolator aufgefunden wurden und somit dort eine unbestimmte Zeit bei Raumtemperatur lagen, wurden *E. coli* sowie *Klebsiella* spp. nachgewiesen. Beide gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*, die pathogene Keime bei Psittaziden darstellen können (RAE 2006). Die betroffenen Nymphensittiche hatten jedoch vor ihrem Tod weder Symptome gezeigt, die mit einer katarrhalischen Enteritis nach *E.coli*-Infektion

(SCOPE 2011) einhergehen, noch Symptome, die mit einer Nephritis nach *Klebsiella*-Infektion (SCOPE 2011) einhergehen. Wahrscheinlicher ist, dass sich diese Keime aufgrund der Fäulnis im Tierkadaver vermehren konnten, da sowohl pathologisch-anatomisch als auch histologisch keinerlei Hinweise auf eine Sekundärinfektion vorlagen.

Weitere nachgewiesene Keime wie *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. und *Staphylococcus* spp. gehören zur physiologischen bakteriellen Flora der Psittaziden (SCOPE 2011).

5.9 Untersuchungen zum Infektionsverlauf

In beiden Versuchen konnten bei allen infizierten Vögeln anti-PaBV-Antikörper, PaBV-RNA, PaBV-Antigen und infektiöses Virus nachgewiesen werden.

5.9.1 Nachweis von PaBV-Antikörpern

In Versuch II wurden die ersten anti-PaBV-Antikörper signifikant früher (zwischen Tag sechs und 76 pi) als in Versuch I (zwischen Tag sieben und 63 pi) nachgewiesen. In beiden Versuchen stiegen die Antikörper-Titer im Versuchsverlauf stetig an, insgesamt blieben die Titer in Versuch II aber niedriger als in Versuch I. In Versuch I wiesen alle Vögel zum Zeitpunkt des Todes bzw. der Euthanasie einen Antikörpertiter von mindestens 1:5120 auf. Sieben Vögel wiesen einen Titer von 1:10240 und fünf einen Titer von 1:20480 auf. In Versuch II hingegen wiesen nur vier Vögel einen Antikörpertiter von 1:5120 oder höher auf. Die Antikörpertiter der restlichen Vögel waren niedriger. Insbesondere die Vögel der Gruppe mit perakutem Krankheitsverlauf (Tod oder Euthanasie im ersten Versuchsdrittel) wiesen sehr niedrige Antikörpertiter von höchstens 1:640 auf. Von den bislang publizierten experimentellen Infektionen mit aviären Bornaviren wurden nur die Versuchstiere von Gray et al. (2010) auf Antikörper untersucht. Diese wurden ab Tag 33 pi in beiden Felsensittichen nachgewiesen (GRAY et al., 2010). In den Bestandsuntersuchungen von Heffels-Redmann et al. (2012) wurde auch bei natürlich PaBV-infizierten Papageien gezeigt, dass die anti-PaBV-Antikörpertiter bei einigen Tieren im Beobachtungszeitraum anstiegen und dass Tiere trotz hoher anti-PaBV-Antikörpertiter an PDD erkrankten

(HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Antikörper-Titer und dem Ausbruch der Erkrankung wurde weder in der Literatur noch in der vorliegenden Studie festgestellt. Da die Titer im Laufe des Versuchs kontinuierlich anstiegen, scheint aber ein Zusammenhang zwischen der Titerhöhe und der Dauer der PaBV-Infektion zu bestehen. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern auch bei den erkrankten Tieren und der stetige Titeranstieg im Versuchsverlauf deuten darauf hin, dass die anti-PaBV-Antikörper keine schützenden Eigenschaften besitzen. Dies wurde hinsichtlich aviärer Bornaviren auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (PAYNE et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Auch für BoDV ist beschrieben, dass antivirale Antikörper keine Rolle in der Immunpathogenese spielen (NARAYAN et al., 1983b) und dass Antikörpertiter im Infektionsverlauf stetig ansteigen (NARAYAN et al., 1983a).

5.9.2 Nachweis von PaBV-RNA in Kropf- und Kloakentupfern

Eine Erstausscheidung von PaBV-RNA wurde in Versuch I signifikant früher (zwischen Tag 19 und 72 pi) nachgewiesen als in Versuch II (zwischen Tag 27 und 85 pi). Dies korreliert mit der schnelleren Anzucht von PaBV-4 in Zellkultur im Vergleich zu PaBV-2 (s. 4.1). Die RNA-Gehalte der Tupfer stiegen in beiden Versuchen im Versuchsverlauf kontinuierlich an. In Versuch I wurde bei allen Vögeln PaBV-RNA in den Tupfern nachgewiesen. In Versuch II hingegen wurde bei den drei Vögeln, die als erstes erkrankten, starben oder euthanasiert wurden, keine PaBV-RNA im Tupfer nachgewiesen. In der Studie von Gancz et al. (2009) wurde in den Rachen- und Kloakentupfern des zuerst erkrankten Vogels ebenfalls keine PaBV-RNA nachgewiesen. Bei den anderen zwei Versuchstieren war der PaBV-Nachweis in den Tupfern ab Tag 85 pi positiv (GANCZ et al., 2009). In den experimentellen Infektionsstudien von Gray et al. (2010) und Mirhosseini et al. (2011) wurden Kotproben auf PaBV-RNA untersucht. Diese waren bei Gray et al. (2010) ab Tag 60/62 pi positiv im PaBV-RNA-Nachweis, bei Mirhosseini et al. (2011) waren die Kotproben während des gesamten Versuches negativ (GRAY et al., 2010; MIRHOSSEINI et al., 2011). In der Studie zum PaBV-Infektionsverlauf in drei Zuchtbeständen von Heffels-Redmann et al. (2012) werden ebenfalls zwei Papageien erwähnt, die zum Zeitpunkt der Probenahme keine PaBV-RNA

ausschieden, dann aber innerhalb von drei Monaten an PDD verstarben und *post mortem* PaBV-RNA in den Organen aufwiesen (HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Auffallend ist, dass sowohl in den genannten Studien als auch in der vorliegenden Arbeit in Versuch II die Versuchstiere, die zuerst klinisch erkrankten und euthanasiert wurden bzw. verstarben, negativ in der PaBV-PCR der Kropf- und Kloakentupfer waren. Dies stellt einen bedeutenden Unterschied zu Versuch I mit PaBV-4 dar. Aviäre Bornaviren scheinen also in manchen Fällen sehr plötzlich zum Auftreten klinischer Symptome zu führen, ohne dass sie vorher in Tupferproben nachweisbar sind. Für die Bornaviren der Säugetiere ist bekannt, dass die Pathogenese der Erkrankung immunvermittelt ist. Bei experimenteller Infektion immunkompetenter Ratten mit BoDV konnten klinische Symptome nach ca. zwei Wochen beobachtet werden. Bei der Infektion junger, immuninkompetenter oder athymisch gezüchteter Ratten wurde die Erkrankung hingegen nicht ausgelöst, obwohl eine deutliche Virusvermehrung und –ausbreitung im Organismus sowie spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten. Ebenso blieb die Erkrankung bei immunkompetenten BoDV-infizierten Ratten aus, wenn sie 24 Stunden nach Infektion mit Cyclophosphamid behandelt wurden (NARAYAN et al., 1983a; NARAYAN et al., 1983b; HERZOG et al., 1985). Nimmt man für aviäre Bornaviren ebenfalls eine immunvermittelte Pathogenese an, so hätte also in dem Fall der drei Vögel aus Versuch II (ohne PaBV-RNA-Nachweis im Tupfer vor Tod bzw. Euthanasie) eine überschießende Immunreaktion zu einer frühen Erkrankung geführt, ohne dass das Virus sich bis in den Magen-Darm-Trakt ausgebreitet hätte. Diese Hypothese ist aufgrund mangelnder Untersuchungen zur Pathogenese der Infektion mit aviären Bornaviren noch rein spekulativ, erscheint aber durchaus plausibel.

5.9.3 Nachweis von PaBV-RNA in Organproben

PaBV-RNA konnte in allen Organen der infizierten Vögel nachgewiesen werden. Dies stellt einen bedeutenden Unterschied zu BoDV dar. Die Bornaviren der Säugetiere weisen einen strikten Neurotropismus auf. Eine Verbreitung des Virus in andere Organe ist nur bei immuninkompetenten Ratten beobachtet worden (NARAYAN et al., 1983a; HERZOG et al., 1984; HERZOG et al., 1985; ROTT et al., 1995). Für aviäre Bornaviren kann durch die vorliegende Studie zwar eine

Affinität, aber kein strikter Tropismus sowohl zum ZNS als auch zum Nervensystem des Magen-Darm-Trakts festgestellt werden. Auch in anderen Studien wurde bereits eine breite Verteilung von aviären Bornaviren in die unterschiedlichen Gewebe nachgewiesen (GANCZ et al., 2009; LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; ENDERLEIN et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010).

In beiden Versuchsgruppen konnte anhand einer geringen Korrelation festgestellt werden, dass je länger die Lebensdauer eines Vogels im Versuch war, also je länger die Infektion andauerte, desto höher war der PaBV-RNA-Gehalt seiner Organe. Dadurch kann womöglich erklärt werden, warum die PaBV-RNA-Gehalte der Organe der Vögel in Versuch II (PaBV-2) insgesamt niedriger waren als in Versuch I (PaBV-4), da in Versuch II schon bis zur Hälfte der Versuchszeit acht Tiere gestorben waren bzw. euthanasiert worden waren, im Gegensatz zu zwei Tieren in Versuch I. Das Phänomen einer steigenden Viruslast mit Dauer der Infektion ist von den Bornaviren der Säugetiere ebenfalls bekannt (NARAYAN et al., 1983a). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die PaBV-RNA-Gehalte in Kropf- und Kloakentupfern im Versuchszeitraum von 230 und 231 Tagen stetig zunahmen. Des Weiteren war bei der Mehrzahl der Versuchstiere der Virusgehalt der Organe umso höher, je länger die Tiere im Versuch überlebten. Ausnahmen bilden in Versuch II die Vögel ic15 und iv12, bei denen geringe RNA-Gehalte in den Organen nachgewiesen wurden, obwohl sie erst am Versuchsende euthanasiert wurden. Dies zeigt erneut, dass individuelle Faktoren im Krankheits- und Infektionsverlauf bei einer PaBV-Infektion eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen, wie dies von verschiedenen Autoren vermutet wird (KISTLER et al., 2010; MIRHOSSEINI et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2012).

In Versuch II (PaBV-2) wiesen die Vögel der ic-Gruppe höhere PaBV-RNA-Gehalte in den Organproben auf als die Vögel der iv-Gruppe. Dieser Unterschied wurde in Versuch I (PaBV-4) nicht beobachtet. Für das verwendete PaBV-2-Isolat könnte es also zutreffen, dass es sich nach intracerebraler Infektion schneller vermehrt, wie es für die Bornaviren der Säugetiere bekannt ist (NARAYAN et al., 1983a; CARBONE et al., 1987).

5.9.4 Nachweis von PaBV-Antigen

In beiden Versuchen wurde PaBV-Antigen im Organmaterial der inokulierten Nymphensittiche nachgewiesen. Während sich aber der Antigennachweis in Versuch I zumeist auf das zentrale und periphere Nervensystem beschränkte, war in Versuch II auch Antigen in Leber, Nieren, Milz, Pankreas, Haut und Muskulatur nachweisbar. Der Nachweis von PaBV-Antigen in allen Organen der infizierten Vögel untermauert den bereits in Kapitel 5.9.3 aufgezeigten Unterschied zu BoDV hinsichtlich der breiten Verbreitung des Virus im Organismus, die nur bei immuninkompetenten Ratten nachgewiesen wurde (ROTT et al., 1995). Auch den PaBV-Antigennachweis betreffend kann durch die vorliegende Studie lediglich eine Affinität des Virus sowohl zum ZNS als auch zum Magen-Darm-Trakt aufgezeigt werden. Auffällig ist, dass in Versuch II vier Vögel kein Antigen im ZNS aufweisen, obwohl zwei davon intrazerebral infiziert wurden (iv14, iv17, ic17 und ic18). Dies könnte abermals durch die geringe Organ- und somit Probengröße bedingt sein, da bei keinem dieser Vögel das Probenmaterial des Rückenmarks für die immunhistochemische Untersuchung ausreichte. Das Vorliegen eines falsch-negativen Befundes ist hier also nicht ausgeschlossen.

Wie in Kapitel 3.3.3.3 bereits erwähnt konnte die Methodik zum Antigennachweis mittels Immunhistochemie nach Publikation der Ergebnisse aus Versuch I verfeinert und optimiert werden. Dadurch stellte sich in Nachuntersuchungen heraus, dass PaBV-4-Antigen bei mehr Versuchstieren im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen wurde als in der vorherigen Untersuchung, insbesondere bei den früh erkrankten Vögeln. Bei den bis zum Versuchsende überlebenden Vögeln wurde weniger PaBV-Antigen in Organen des Magen-Darm-Trakts nachgewiesen. Hier wird vermutet, dass PaBV-4 im Magen-Darm-Trakt nach einiger Zeit durch das Immunsystem eliminiert wird. Anders als in der Erstuntersuchung (Ergebnisse der vorliegenden Arbeit) wurde in der Nachuntersuchung PaBV-4-Antigen auch in Leber, Nieren und Milz nachgewiesen. Somit liegt auch für PaBV-4 der Nachweis eines breiten Organspektrums vor wie für PaBV-2 (AL-IBADI 2015).

5.9.5 PaBV-Reisolierung

Während in Versuch I (PaBV-4) bei allen infizierten Versuchstieren aus Gehirn- und Retinaprobe infektiöses PaBV direkt auf CEC-32-Zellen nachgewiesen wurde, hing das Ergebnis der Reisolierung in Versuch II (PaBV-2) deutlich von der Überlebensdauer eines Vogels im Versuch, also von der Dauer der Infektion ab. Aviäre Bornaviren wurden bereits in unterschiedlichen Studien mit Hilfe verschiedener Zelllinien isoliert (RINDER et al., 2009; GRAY et al., 2010; HERZOG et al., 2010; MIRHOSSEINI et al., 2011; RUBBENSTROTH et al., 2012). Dabei wurde schon früh in einer Studie von Rinder et al. (2009) beschrieben, dass sich ein untersuchtes PaBV-2-Isolat einer Amazone langsamer in Zellkultur vermehrte, als ein untersuchtes PaBV-4-Isolat eines Aras (RINDER et al., 2009). Unterschiede bezüglich der Wachstumseigenschaften verschiedener PaBV-Varianten in Zellkultur wurden später auch von Rubbenstroth et al. (2012) untermauert. Hier wurde beobachtet, dass das neu entdeckte PaBV-7 langsamer in Zellkultur wuchs als die ebenfalls in der Studie untersuchten PaBV-1-, -2- und -4-Isolate. Es wurde darüber hinaus sogar von dem ebenfalls im untersuchten Organmaterial vorhandenen PaBV-4-Isolat verdrängt. Die Arbeitsgruppe schloss aus ihren Beobachtungen, dass sich die Isolate der verschiedenen PaBV-Varianten hinsichtlich ihrer Replikationseigenschaften in Zellkultur unterscheiden (RUBBENSTROTH et al., 2012). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Unklar bleibt aber, warum mehr Vögel in Versuch II (PaBV-2) erkrankten und starben bzw. euthanasiert wurden als in Versuch I (PaBV-4), obwohl das PaBV-4-Isolat eine höhere Infektiosität in Zellkultur aufwies. Beide Isolate wurden sechsmal in Zellkultur passagiert, bevor sie für die Inokulation verwendet wurden. Daher ist eine unterschiedliche Beeinflussung der Virulenz der verwendeten PaBV-Isolate durch die vorherige Passagierung, wie sie z.B. zur Attenuierung von Virusstämmen zur Herstellung von Impfstoffen angewandt wird (GRAHAM et al., 2007), unwahrscheinlich. Bei Infektionsversuchen mit BoDV an Ratten wurde gezeigt, dass schon eine geringe Virusmenge ausreicht, um klinische Symptome hervorzurufen und dass zu hohe Virusmengen sogar zum Ausbleiben klinischer Symptome führen (OLDACH et al., 1995). Übertragen auf PaBV hieße es, dass PaBV-2 womöglich aufgrund seiner

langsamen Wachstumseigenschaften eher zur Entstehung klinischer Symptome führen würde als PaBV-4. Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass eine frühe Hochregulierung von BoDV-spezifischen CD4⁺-T-Zellen effektiv gegen eine Infektion schützen kann (RICHT et al., 1994b). Sollte dies für PaBV ebenfalls zutreffen, könnte es eine Erklärung für die geringere Anzahl erkrankter Vögel in Versuch I sein. Die schnelle Replikation von PaBV-4 könnte eine erhebliche Hochregulierung von CD4⁺-T-Zellen induziert haben wodurch die Erkrankung zumeist nicht ausbrach. Diese Annahmen bleiben jedoch bis zum Vorliegen eingehender Studien zur Immunpathogenese von PaBV spekulativ.

5.10 Sentineltiere

Bei den Sentineltieren beider Versuche konnte keine persistierende Infektion trotz dauerhaften Kontaktes zu den infizierten Vögeln beobachtet werden. Zwar wurde bei beiden PaBV-RNA in den Tupfern ab Tag 76 pi (se1) und 64 pi (se2) kontinuierlich bis zum Versuchsende nachgewiesen. Jedoch konnte weder eine Serokonversion in diesen Tieren beobachtet werden, noch wurde infektiöses Virus aus den Organen isoliert oder PaBV-Antigen immunhistochemisch nachgewiesen. Lediglich in Haut und Federn wurde bei beiden Sentineltieren ein geringer PaBV-RNA-Gehalt nachgewiesen, wobei es sich um eine Kontamination durch die anderen Vögel handeln könnte. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine Ansteckung nicht ohne weiteres möglich ist und dass nicht-infizierte Tiere mit direktem Kontakt zu infizierten Tieren sich über einen langen Zeitraum nicht anstecken (LIERZ et al., 2009; KISTLER et al., 2010; HEFFELS-REDMANN et al., 2012). Dies stimmt mit den Beobachtungen in der vorliegenden Studie überein. Zudem sprechen die Beobachtungen gegen einen einfachen fäko-oralen Übertragungsweg, der zumeist vermutet wird (GREGORY 1998; RINDER et al., 2009; KISTLER et al., 2010; HOPPES et al., 2013). Insbesondere der stetige, aber nicht steigende PaBV-RNA-Nachweis in den Tupfern der Sentineltiere ohne die Induktion einer belastbaren Infektion spricht gegen die fäko-orale Infektionsroute. Es könnte also sein, dass oral aufgenommene aviäre Bornaviren den Wirtsorganismus lediglich passagieren. Für BoDV ist beschrieben, dass es von der jeweiligen Infektionsroute abhängt, ob eine Infektion des Organismus stattfindet (CARBONE et al., 1987). Es wäre demzufolge also möglich, dass aviäre Bornaviren

nach oraler Aufnahme früh vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden, bevor sie sich im Organismus replizieren können. So z.B. ist es für die intravenöse Inokulationsroute bei BoDV beschrieben (CARBONE et al., 1987). Die lymphoplasmazellulären Infiltrate, die beide Sentineltiere in geringerem Ausmaß aufwiesen als die inokulierten Vögel, könnten somit durch die Reaktion des Immunsystems hervorgerufen worden sein, durch die der Erreger eliminiert wurde. Zur Klärung sind eingehende Studien zu den verschiedenen Infektionswegen einschließlich kinetischer Untersuchungen notwendig.

5.11 Kontrolltiere

Bei der mock-infizierten Kontrollgruppe, die mit Suspension nichtinfizierter CEC-Zellen inokuliert wurde, konnte zu keiner Zeit eine PaBV-Infektion oder Erkrankungsanzeichen nachgewiesen werden. Bei keinem der vier Vögel wurde PaBV-Genom in den Tupfern oder in Organmaterial *post mortem* nachgewiesen. Ebenso wurde kein PaBV-Antigen in den Organen nachgewiesen und kein infektiöses Virus aus den Organen isoliert. Bei keinem der vier Vögel wurden anti-PaBV-Antikörper nachgewiesen. In der histopathologischen Untersuchung wurden zwar in geringem Ausmaß lymphoplasmazelluläre Infiltrate in verschiedenen Organen nachgewiesen. Diese zeigten jedoch in keinem der untersuchten Organe die PDD-typische Assoziation zu Nerven und Ganglien, sondern bildeten lediglich Zellaggregate in Parenchym und Mukosa. Die Angaben in der Literatur über Infektionsversuche mit aviären Bornaviren bezüglich Kontrolltieren sind sehr unterschiedlich. Allen ist aber gemeinsam, dass keine Infektion mit aviären Bornaviren nachgewiesen wurde. Mirhosseini et al. (2011) inokulierten ihr Kontrolltier zwar nicht. Es zeigte *post mortem* aber leichte lymphozytäre Infiltrate in Leber, Pankreas und Milz. Eine Begründung für die Infiltrate wird hier nicht angeführt (MIRHOSSEINI et al., 2011). Es ist anzunehmen, dass die nachgewiesenen Infiltrate in der vorliegenden Arbeit lediglich eine Gewebereaktion auf die inokulierte Zellsuspension darstellen. Denkbar ist auch, dass diese Infiltrate noch von einer früheren Noxe herrühren, die vor Versuchsbeginn auf die Tiere eingewirkt hat. Da die Nymphensittiche nicht spezifisch pathogenfrei waren, sind vorherige Erkrankungen nicht auszuschließen.

Alle Befunde der mock-infizierten Gruppe zusammenfassend, konnten keine bedeutenden Effekte der Zellsuspension nachgewiesen werden

5.12 Übergreifende Betrachtung und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, erstmalig die Henle-Koch'schen Postulate für PaBV als Ursache der PDD anhand einer statistisch evaluierbaren Tierzahl zu erfüllen. In beiden Versuchen konnten alle infizierten Vögel persistent mit PaBV infiziert werden. Dies zeigt der kontinuierliche Nachweis von anti-PaBV-Antikörpern im Serum, PaBV-RNA, PaBV-Antigen und infektiösem Virus in allen infizierten Vögeln. Des Weiteren wurden bei allen infizierten Nymphensittichen PDD-typische lymphoplasmazelluläre Infiltrate, jedoch nicht nur im oberen Verdauungstrakt, sondern insbesondere auch im ZNS und vielen parenchymatösen Organen nachgewiesen. Zusammenfassend können Erkrankungs- und Infektionsverlauf nach einer Infektion mit aviären Bornaviren sehr heterogen sein. Dies wird auch bei den unterschiedlichen Symptomausprägungen sowie bei den unterschiedlichen Zeitpunkten der Serokonversion und des ersten Genomnachweises deutlich, die in den Versuchsgruppen weit gestreut sind. Gerade die namensgebende Drüsenmagendilatation war nicht immer vorhanden bzw. sehr unterschiedlich stark ausgeprägt. So erscheint der Name PDD in Zusammenhang mit der aktuellen Literatur und den Ergebnissen der vorliegenden Studie eher irreführend und mit der jetzigen Kenntnis des Erregers nicht mehr zeitgemäß. Die Drüsenmagendilatation scheint ein Symptom in einem sehr vielfältigen Krankheitskomplex darzustellen, in dem aviäre Bornaviren eine ausschlaggebende Rolle spielen. Eine treffendere Bezeichnung, wie z.B. „Aviäre Bornaganglioneuritis“ wurde durch Korbelt et al., 2011 vorgeschlagen (KORBEL et al., 2011). Wie bei der Infektion mit BoDV ist auch für aviäre Bornaviren denkbar, dass viele verschiedene Faktoren in der Wirt-Virus-Interaktion, wie z.B. Immunstatus, Infektionsroute, betroffene Wirtsspezies, Virusvariante, eine bedeutende Rolle für Infektions- und Erkrankungsverlauf spielen könnten. Dies zeigen auch die Befunde der Sentineltiere, die über mehrere Monate engen Kontakt zu den infizierten Nymphensittichen hatten, sich aber trotzdem nicht mit PaBV infizierten.

Unterschiede zwischen Versuch I und Versuch II bestanden vor allem hinsichtlich der Höhe der Antikörpertiter und der nachgewiesenen RNA-Gehalte in den Organen und der daraus resultierenden Dauer für die Reisolierung. In den Organen der Vögel in Versuch I wurden höhere RNA-Gehalte als in Versuch II nachgewiesen und die Reisolierung von infektiösem Virus gelang in Versuch I sehr viel schneller und bei allen Tieren gleich gut. Diese Fakten lassen zunächst vermuten, dass sich das PaBV-4-Isolat schneller im Organismus repliziert hat als das PaBV-2-Isolat. Dies scheint jedoch nicht mit der Virulenz in Zusammenhang zu stehen, da in Versuch II mehr Tiere erkrankten und die Krankheitsverläufe schwerwiegender waren. Folglich wäre das PaBV-2-Isolat für die Nymphensittiche im Versuch virulenter als das PaBV-4-Isolat. Die hier festgestellten Unterschiede beziehen sich jedoch ausschließlich auf die hier untersuchten PaBV-Isolate. Eine generelle Aussage über Virulenz und Pathogenität von PaBV-2 oder PaBV-4 ist durch die Versuche nicht zu treffen. Die vorliegende Studie belegt erstmalig die Henle-Koch'schen Postulate für PaBV als Ursache der PDD und zeigt unterschiedliche Verlaufsformen sowohl der Erkrankung als auch der PaBV-Infektion. Die Versuche zeigen deutlich, dass eine PaBV-Variante sich in derselben Vogelspezies in jedem Individuum anders verhalten kann. Es bleibt unklar, inwieweit die Ergebnisse auf andere Papageienspezies und andere Isolate der gleichen Variante einer Virusspezies übertragen werden können. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht aber, dass die Wirt-Virus-Interaktionen eine wichtige Rolle in der Immunpathogenese einer PaBV-Infektion zu spielen scheinen.

6 Zusammenfassung

Das *Psittaciform 1 bornavirus* wurde als neues Mitglied der Familie *Bornaviridae* im Jahr 2008 bei Papageien entdeckt, die an der Psittazinen Drüsenmagendilatation (PDD) erkrankt waren. Die PDD ist durch eine nichteitrige Ganglioneuritis gekennzeichnet und endet in der Regel tödlich. Erste Infektionsversuche bekräftigten den engen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit aviären Bornaviren und der Erkrankung an PDD. Diese wurden jedoch mit nur wenigen Versuchstieren durchgeführt, die zudem mit weiteren Viren infiziert waren. Die vorliegende Arbeit soll erstmalig den detaillierten Infektions- und Erkrankungsverlauf zweier unterschiedlicher Isolate der *Psittaciform 1 bornavirus*-Varianten *Parrot bornavirus* (PaBV)-2 und PaBV-4 nach experimenteller Infektion untersuchen. Dies erfolgte anhand von Serokonversion, Nachweis von PaBV-RNA, klinischer Symptome, histologische Gewebeeränderungen und Antigenverteilung sowie Reisolierung von infektiösem Virus bei einer statistisch relevanten Tierzahl über einen Beobachtungszeitraum von 33 Wochen. Dazu wurden je Isolat neun Nymphensittiche intrazerebral (ic) und neun Nymphensittiche intravenös (iv) infiziert. Zusätzlich wurde jeweils ein Sentineltier in die ic-Gruppe integriert. In beiden Versuchen konnte bei allen inokulierten Tieren eine persistierende PaBV-Infektion induziert werden. Erste anti-PaBV-Antikörper wurden sechs bzw. sieben Tage pi nachgewiesen (signifikant früher bei PaBV-2), erste PaBV-RNA in Kropf- und Kloakentupfern wurde ab Tag 19 bzw. 27 pi nachgewiesen (signifikant früher bei PaBV-4), wobei Antikörpertiter und RNA-Gehalt stetig im Versuchsverlauf anstiegen. Klinische Symptome traten ab Tag 22 bzw. 33 pi auf mit einer signifikant höheren Erkrankungsrate bei PaBV-2 (12 Vögel) im Vergleich zu PaBV-4 (fünf Vögel). Einen dilatierten Drüsenmagen wiesen in Versuch I (PaBV-4) sieben Tiere auf - zumeist gering- bis mittelgradig dilatiert. In Versuch II (PaBV-2) zeigten 10 Tiere eine zumeist mittel- bis hochgradige Drüsenmagendilatation. In allen infizierten Vögeln gelang der histopathologische Nachweis der für eine PDD charakteristischen lymphoplasmazellulären Infiltrate. PaBV-RNA und -Antigen wurde ebenfalls in den Organen aller infizierter Nymphensittiche nachgewiesen. Hier zeigten die untersuchten PaBV-Isolate nicht

den für BoDV charakteristischen strikten Neurotropismus, sondern eine breite Verteilung in unterschiedliche Organe mit Betonung auf den Verdauungstrakt (PaBV-2) und das Nervensystem (PaBV-4). Mit der erfolgreichen Reisolierung von infektiösem Virus aus allen infizierten Vögeln wurden die Henle-Koch'schen Postulate erfüllt. Dabei zeigte sich in Versuch II (PaBV-2), dass der PaBV-RNA- und -Antigengehalt in den Organen sowie die Replikationsgeschwindigkeit bei Reisolierung von der Überlebensdauer eines Vogels im Versuch abhängt. Somit zeigt diese Studie deutliche Unterschiede zwischen den zwei verwendeten PaBV-Isolaten im Nymphensittich auf. Sie zeigt aber auch, dass ein Isolat sich in verschiedenen Individuen derselben Spezies unterschiedlich verhalten kann. Zudem besaßen hohe Antikörpertiter keine schützenden Eigenschaften und früh erkrankte und gestorbene/euthanasierte Tiere wiesen, insbesondere in Versuch II (PaBV-2), zumeist einen geringen Virusgehalt auf. Zieht man Parallelen zu BoDV, so ist anzunehmen, dass geringe Virusmengen ausreichen um klinische Symptome hervorzurufen und dass eine frühe Hochregulation von CD-4+-T-Zellen durch eine hohe Replikationsrate des Virus eher vor dem Ausbruch der Erkrankung schützt. Neben dem Einfluss der PaBV-Variante scheinen viele weitere Faktoren, wie z.B. Immunstatus und Spezies des Wirtes oder der Infektionsweg, eine bedeutende Rolle für den Infektions- und Erkrankungsverlauf zu spielen. Dies wird auch durch die Sentineltiere deutlich, die über einen Zeitraum von 33 Wochen hinweg dauerhaften und engen Kontakt zu den infizierten Vögeln hatten, sich jedoch nicht mit PaBV infizierten.

7 Summary

Psittaciform 1 bornavirus is a new member of the family *Bornaviridae* and was first discovered in 2008 in psittacines suffering from Proventricular Dilatation Disease (PDD). PDD is characterized by a nonpurulent ganglioneuritis and is nearly always fatal. Subsequent experimental infections confirmed a correlation between avian bornaviruses and PDD using a small sample size, and the birds were chronic carriers of other viruses. Aim of this study was to investigate in detail the course of infection and disease of two different isolates of the *Psittaciform 1 bornavirus* variants *Parrot bornavirus* (PaBV)-2 and -4 on the basis of seroconversion, PaBV-RNA and clinical signs, and, after necropsy, histopathological alterations as well as PaBV antigen distribution and virus reisolation over 33 weeks using a statistically applicable sample size. Therefore, nine cockatiels each were inoculated intracerebrally (ic) and intravenously (iv) with a PaBV-4-isolate and a PaBV-2-isolate. In addition, one uninfected bird was placed as a sentinel bird in each ic group. In both trials, a persistent PaBV-infection could be induced in 100% of the inoculated birds. First anti-PaBV-antibodies were detected on day six and seven pi (significantly earlier within the PaBV-2 group) and PaBV-RNA in crop and cloacal swabs were detected from day 19 and 27 pi onwards (significantly earlier within the PaBV-4 group) with a constant increase of antibody levels and PaBV-RNA load until the end of the trial. First clinical signs were observed on day 22 and 33 pi with a higher morbidity within the PaBV-2-trial (12 birds) than within the PaBV-4-trial (five birds). A dilated proventriculus was found in seven birds in trial I (PaBV-4) – in most cases mildly to moderately dilated. In trial II (PaBV-2) 10 birds revealed a dilated proventriculus – in most cases moderately to severely dilated. Lymphoplasmocytic infiltrates characteristic for PDD were identified in all infected birds. PaBV-RNA and antigen were also detected in all infected cockatiels. PaBV did not show a strict neurotropism which is characteristic for BoDV, but rather reveals a broad distribution in numerous tissues with an affinity to the digestive tract (PaBV-2) and nervous tissue (PaBV-4). Finally, Koch's postulates were fulfilled by the successful re-isolation of infectious PaBV from all infected birds. Amount of PaBV-RNA and antigen in Organs as well as replication

rate in cell culture depended in the PaBV-2-group on the timespan of infection of the respective bird. Consequently, this study reveals considerable differences between the two isolates in the cockatiel. However, the investigations also demonstrate that one isolate causes different infection and disease patterns in different individuals of one host species. All inoculated birds were persistently infected with PaBV-4 and -2. Nevertheless, the courses of infection and disease differed markedly. High antibody titres did not indicate immunity and early diseased/euthanised birds revealed, especially in trial II, low viral loads. Considering immunopathogenesis of BoDV, it is assumed that low viral replication is sufficient to trigger disease and that an early upregulation of specific CD4⁺-T-cells, induced by a high viral replication, rather protects against disease onset. Besides the influence of the PaBV variant on the course of infection and disease, many other factors, like e.g. the immune status or species of the host or the route of infection seem to play an important role. This is supported by the sentinel birds, which did not become persistently infected although they were in close contact with the inoculated birds for 33 weeks.

8 Literaturverzeichnis

AL-IBADI, B. (2015): Avian Borna Virus in Psittacine Birds - Viral distribution, tropism and immune response. Gießen, VVB Lauferweiler Verlag.

ALEXANDER, D. J. (1998): Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. In: SWAYNE, D. E., GLISSON, J. R., JACKWOOD, M. W., PEARSON, J. E. und REED, W. M., (Hrsg.): A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, Kennett Square, Pennsylvania, USA 1998. 156–163.

ALEXANDER, D. J. (2009): Ecology and Epidemiology of Newcastle Disease. In: CAPUA, I. und ALEXANDER, D. J., (Hrsg.): Avian Influenza and Newcastle Disease - A field and laboratory manual. Springer-Verlag, Mailand, Italien 2009. 19-26.

BECHT, H. und RICHT, J. A. (1996): Borna Disease. In: STUDDERT, M. J., (Hrsg.): Virus diseases of equines. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam 1996. 235-244.

BERHANE, Y., SMITH, D. A., NEWMAN, S., TAYLOR, M., NAGY, E., BINNINGTON, B. und HUNTER, B. (2001): Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology* **30**(5): 563-570.

BILZER, T. und STITZ, L. (1994): Immune-mediated brain atrophy. CD8+ T cells contribute to tissue destruction during borna disease. *Journal of Immunology* **153**(2): 818-823.

BOUTETTE, J. B. und TAYLOR, M. (2004): Proventricular Dilatation Disease: A Review of Research, Literature, Species Differences, Diagnostics, Prognosis, and Treatment. Conference of the Association of Avian Veterinarians, New Orleans, Louisiana, USA, 175-181.

BRIESE, T., SCHNEEMANN, A., LEWIS, A. J., PARK, Y. S., KIM, S., LUDWIG, H. und LIPKIN, W. I. (1994): Genomic organization of Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(10): 4362-4366.

- BUSCHE, R., K., F. und WEINGARTEN, M. (1985): Zur Pathologie des Macaw Wasting-Syndrom. Verhandlungsbericht 27. Symposium über Erkrankungen der Zootiere, St. Vincent/Toronto, 325-329.
- CARBONE, K. M., DUCHALA, C. S., GRIFFIN, J. W., KINCAID, A. L. und NARAYAN, O. (1987): Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *Journal of Virology* **61**(11): 3431-3440.
- CARBONE, K. M., TRAPP, B. D., GRIFFIN, J. W., DUCHALA, C. S. und NARAYAN, O. (1989): Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **48**(6): 631-644.
- CLARK, F. D. (1984): Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. *Avian Diseases* **28**(3): 813-815.
- CUBITT, B., OLDSTONE, C. und DE LA TORRE, J. C. (1994): Sequence and genome organization of Borna disease virus. *Journal of Virology* **68**(3): 1382-1396.
- DAHLHAUSEN, B., ALDRED, S. und COLAIZZI, E. (2002): Resolution of Clinical Proventricular Dilatation Disease by Cyclooxygenase 2 Inhibition. 23rd Conference of the Association of Avian Veterinarians, Monterey, California, USA, 9-12.
- DAOUST, P. Y., JULIAN, R. J., YASON, C. V. und ARTSOB, H. (1991): Proventricular impaction associated with nonsuppurative encephalomyelitis and ganglioneuritis in two Canada geese. *Journal of Wildlife Diseases* **27**(3): 513-517.
- DE KLOET, A. H., KERSKI, A. und DE KLOET, S. R. (2011): Diagnosis of Avian bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **23**(3): 421-429.
- DE KLOET, S. R. und DORRESTEIN, G. M. (2009): Presence of avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws. *Avian Diseases* **53**(4): 568-573.

- DE LA TORRE, J. C. (1994): Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *Journal of Virology* **68**(12): 7669-7675.
- DELNATTE, P., BERKVEN, C., KUMMROW, M., SMITH, D. A., CAMPBELL, D., CRAWSHAW, G., OJKIC, D. und DELAY, J. (2011): New genotype of avian bornavirus in wild geese and trumpeter swans in Canada. *Veterinary Record* **169**(4): 108.
- DELNATTE, P., OJKIC, D., DELAY, J., CAMPBELL, D., CRAWSHAW, G. und SMITH, D. A. (2013): Pathology and diagnosis of avian bornavirus infection in wild Canada geese (*Branta canadensis*), trumpeter swans (*Cygnus buccinator*) and mute swans (*Cygnus olor*) in Canada: a retrospective study. *Avian Pathology* **42**(2): 114-128.
- DESCHL, U., STITZ, L., HERZOG, S., FRESE, K. und ROTT, R. (1990): Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathologica* **81**(1): 41-50.
- DOOLEN, M. (1994): Crop Biopsy - A Low Risk Diagnosis for Neuropathic Gastric Dilatation. Conference of the Association of Avian Veterinarians, Reno, Nevada, USA, 193-196.
- ENDERLEIN, D., HEFFELS-REDMANN, U., KALETA, E. F., MÜLLER, H., HERZOG, S., HERDEN, C., PIEPENBRING, A., NEUMANN, D. und LIERZ, M. (2010): Neue Erkenntnisse zur Rolle des aviären Bornavirus bei der Drüsenmagenerweiterung der Psittaziden. 16.DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, München, Deutschland. ISBN 978-3-941703-60-5, 15-20.
- ENDERLEIN, D., HERZOG, S., HERDEN, C., NEUMANN, D., BRIESE, T., KALETA, E. F., LIERZ, M., HEFFELS-REDMANN, U. und MÜLLER, H. (2009): Antikörper- und Genomnachweis in PDD-positiven Vögeln. 1.DVG-Tagung über Vogel- und Reptilienkrankheiten, Leipzig, Germany. 9783941703308, 18-20.
- ENDERLEIN, D., PIEPENBRING, A., HERZOG, S., HERDEN, C., CROSTA, L., OBERHÄUSER, K., MÜLLER, H., HEBEL, C., HAMMER, S., KALETA, E. F., GERLACH, H., HEFFELS-REDMANN, U. und LIERZ, M. (2011): The situation of ABV in endangered psittacines like the Spix's macaw. 11th European AAV Conference 2011, Madrid, Spanien, 228-229.

- GANCZ, A., ELBAZ, D., FARNOUSHI, Y. und LUBLIN, A. (2012): Clinical Recovery from Proventricular Dilatation Disease following treatment with Cyclosporine-A in an African Grey Parrot (*Psittacus erithacus*). 17. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, München. ISBN 978-3-86345-062-5, 130-133.
- GANCZ, A. Y., CLUBB, S. und SHIVAPRASAD, H. L. (2010): Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **13**(3): 471-494.
- GANCZ, A. Y., KISTLER, A. L., GRENINGER, A. L., FARNOUSHI, Y., MECHANI, S., PERL, S., BERKOWITZ, A., PEREZ, N., CLUBB, S., DERISI, J. L., GANEM, D. und LUBLIN, A. (2009): Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Virology Journal* **6**: 100.
- GASKIN, J., HOMER, B. und ESKELEND, K. (1991): Preliminary findings in avian viral serositis. A newly recognized syndrome of psittacine birds. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* **5**: 27-34.
- GERLACH, H. (1994): Neuropathic Gastric Dilatation. In: RITCHIE, B. W., HARRISON, G. J. und HARRISON, L., (Hrsg.): *Avian Medicine - Principles and Application*. Wingers Publishing, Lake Worth 1994. 940-941.
- GERLACH, S. (1991): Macaw wasting disease - a 4 year study in clinical case history, epizootiology, analysis of species, diagnosis, microbiological and virological results. European chapter of the Association of Avian Veterinarians, Wien, Österreich, 273-281.
- GOUGH, R. E., DRURY, S. E., CULVER, F., BRITTON, P. und CAVANAGH, D. (2006): Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazona viridigenalis* Cassin). *Avian Pathology* **35**(2): 122-126.
- GOUGH, R. E., DRURY, S. E., HARCOURT-BROWN, N. H. und HIGGINS, R. J. (1996): Virus-like particles associated with macaw wasting disease. *Veterinary Record* **139**(1): 24.

- GRAHAM, B. S. und CROWE, J. E. (2007): Immunization against viral diseases. In: KNIPE, D. M. und HOWLEY, P. M., (Hrsg.): *Fields Virology*. Lippinkott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA 2007. 488-538.
- GRAHAM, D. L. (1984): An Update on Selected Petbird Virus Infections: Infiltrative splanchnic Neuropathy - A Component of the "Wasting Macaw" Complex? Conference of the Association of Avian Veterinarians, Toronto, Canada, 275-280.
- GRAHAM, D. L. (1991): Wasting/Proventricular Dilatation Disease - A pathologist's view. Conference of the Association of Avian Veterinarians, Chicago, USA, 43-44.
- GRAY, P., HOPPES, S., SUCHODOLSKI, P., MIRHOSSEINI, N., PAYNE, S., VILLANUEVA, I., SHIVAPRASAD, H. L., HONKAUURI, K., BRIESE, T., REDDY, S. M. und TIZARD, I. (2010): Use of Avian Bornavirus Isolates to Induce Proventricular Dilatation Disease in Conures. *Emerging Infectious Diseases* **16**(3): 473-479.
- GREGORY, C. R. (1995): Proventricular Dilatation Disease. In: RITCHIE, B. W., (Hrsg.): *Avian Viruses, Function and Control*. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida 1995. 439-448.
- GREGORY, C. R., LATIMER, K. S., CAMPAGNOLI, R. P. und RITCHIE, B. W. (1996): Histologic evaluation of the crop for diagnosis of proventricular dilatation syndrome in psittacine birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **8**(1): 76-80.
- GREGORY, C. R., LATIMER, K. S., NIAGRO, F. D., RITCHIE, B. W., CAMPAGNOLI, R. P., NORTON, T. M., McMANAMON, R. und GREENACRE, C. B. (1994): Review of Proventricular Dilatation Syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* **8**(2): 69-75.
- GREGORY, C. R., LATIMER, K. S., NIAGRO, F. D., ROBERTS, A. W., CAMPAGNOLI, R. P., PESTI, D. A., RITCHIE, B. W. und LUKERT, P. D. (1997a): Investigations of Eastern Equine Encephalomyelitis Virus as the causative agent of Psittacine Proventricular Dilatation Syndrome. *Journal of Avian Medicine and Surgery* **11**(3): 187-193.

- GREGORY, C. R., RITCHIE, B. W., LATIMER, K. S., STEFFENS, W., CAMPAGNOLI, R. P., PESTI, D. A. und LUKERT, P. D. (1997b): Proventricular Dilatation: A Viral Epornitic. Association of Avian Veterinarians, 43-52.
- GREGORY, C. R. R., B.W.; LATIMER,K.S.; STEFFENS,W.L.; CAMPAGNOLI,R.P.; PESTI,D.; LUKERT,P.D. (1998): Experimental Transmission of Psittacine Proventricular Dilatation Disease (PDD) and Preliminary Characterization of a Virus Recovered from Birds with Naturally Occurring and Experimentally Induced PDD. Proceedings of International Virtual Conferences in Veterinary Medicine: Diseases of Psittacine Birds.
- GRIMM, F. (1991): Der klinische Fall. Tierärztliche Praxis **19**: 21; 111-112.
- GRUND, C. H. und RITTER, H. (2004): Retrospektive feingewebliche Untersuchung von Psittaziden mit der Verdachtsdiagnose Neuropathische Magendilatation. 14. Tagung über Vogelkrankheiten, München, 147-153.
- GRUND, C. H., WERNER, O., GELDERBLOM, H. R., GRIMM, F. und KOSTERS, J. (2002): Avian paramyxovirus serotype 1 isolates from the spinal cord of parrots display a very low virulence. Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health **49**(9): 445-451.
- GUO, J., COVALEDA, L., HEATLEY, J., BAROCH, J., TIZARD, I. und PAYNE, S. (2012): Widespread avian bornavirus infection in mute swans in the Northeast United States. Veterinary Medicine: Research and Reports **3**: 49-52.
- GUO, J., SHIVAPRASAD, H. L., RECH, R. R., HEATLEY, J. J., TIZARD, I. und PAYNE, S. (2014): Characterization of a new genotype of avian bornavirus from wild ducks. Virology Journal **11**: 197.
- GUO, J., TIZARD, I., BAROCH, J., SHIVAPRASAD, H. L. und PAYNE, S. L. (2015): Avian Bornaviruses in North American Gulls. Journal of Wildlife Diseases **51**(3): 754-758.
- HAAS, L. (2011): Familie Bornaviridae. In: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U. und VALENTIN-WEIGAND, P., (Hrsg.): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart 2011. 531-534.

- HECKMANN, J., ENDERLEIN, D., PIEPENBRING, A., HERZOG, S., HEFFELS-REDMANN, U., MALBERG, S., HERDEN, C. und LIERZ, M. (2015): Investigation on different routes of transmission of avian bornavirus in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). 2nd International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine, Paris.
- HEFFELS-REDMANN, U., ENDERLEIN, D., HERZOG, S., HERDEN, C., PIEPENBRING, A., NEUMANN, D., MÜLLER, H., CAPELLI, S., OBERHAUSER, K., GERLACH, H., KALETA, E. F. und LIERZ, M. (2011): Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology* **40**(4): 419-426.
- HEFFELS-REDMANN, U., ENDERLEIN, D., HERZOG, S., PIEPENBRING, A., BURKLE, M., NEUMANN, D., HERDEN, C. und LIERZ, M. (2012): Follow-up investigations on different courses of natural avian bornavirus infections in psittacines. *Avian Diseases* **56**(1): 153-159.
- HEINIG, A. (1969): Die Borna'sche Krankheit der Pferde und Schafe. In: ROEHRER, H., (Hrsg.): *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren*. VEB Fischer Verlag, Jena 1969. 83-148.
- HELDSTAB, A., MORGENSTERN, D., RUEDI, A., ALBEK, A. und ALBEK, M. (1985): Pathologie einer endemieartig verlaufenden Neuritis im Magen-Darmbereich bei Grosspapageien Wasting Macaw Complex, infiltrative splanchnic neuropathy. *Int Symp Zoo Animal*: 317-324.
- HERDEN, C., HERZOG, S., WEHNER, T., ZINK, C., RICHT, J. und FRESE, K. (1999): Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. In: WERNERY, U., WADE, J., MUMFORD, J. und KAADEN, O., (Hrsg.): *Equine infectious diseases VIII*. R&W Publications, Newmarket, UK 1999. 286-290.
- HERZOG, S., ENDERLEIN, D., HEFFELS-REDMANN, U., PIEPENBRING, A., NEUMANN, D., KALETA, E. F., MÜLLER, H., LIERZ, M. und HERDEN, C. (2010): Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian bornavirus infection in psittacine birds. *Journal of Clinical Microbiology* **48**(6): 2282-2284.
- HERZOG, S., FRESE, K., RICHT, J. und ROTT, R. (1994): Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit des Pferdes. *Wien. Tierärztl. Wschr.*(81): 374-379.

- HERZOG, S., FRESE, K. und ROTT, R. (1991): Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *Journal of General Virology* **72** (Pt 3): 535-540.
- HERZOG, S., KOMPETER, C., FRESE, K. und 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., PFEUFFER, I., HABERZETTL, K., FELDMANN, H., FRESE, K., BECHTER, K. und RICHT, J. A. (1997): Molecular characterization of Borna disease virus from naturally infected animals and possible links to human disorders. *Archives of Virology. Supplementum* **13**: 183-190.
- HERZOG, S., WONIGEIT, K., FRESE, K., HEDRICH, H. J. und ROTT, R. (1985): Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. *Journal of General Virology* **66** (Pt 3): 503-508.
- HILBE, M., HERRSCHE, R., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., ZLINSZKY, K. und EHRENSPERGER, F. (2006): Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerging Infectious Diseases* **12**(4): 675-677.
- 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, J. P., CADAR, D., SCHMIDT-CHANASIT, J., ULRICH, R. G. und BEER, M. (2015): A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *New England Journal of Medicine* **373**(2): 154-162.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T. und WILLIAMS, S. T. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, USA, Williams & Wilkins.
- HONKAVUORI, K. S., SHIVAPRASAD, H. L., WILLIAMS, B. L., QUAN, P. L., HORNIG, M., STREET, C., PALACIOS, G., HUTCHISON, S. K., FRANCA, M., EGHOLM, M., BRIESE, T. und LIPKIN, W. I. (2008): Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases* **14**(12): 1883-1886.
- HOPPE, S. und GRAY, P. (2009): Update on Proventricular Dilatation Disease. Conference on Avian Medicine and Surgery, EAAV, Antwerp, Belgium, 141-146.

- HOPPES, S., GRAY, P. L., PAYNE, S., SHIVAPRASAD, H. L. und TIZARD, I. (2010): The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* **13**(3): 495-508.
- HOPPES, S. M., TIZARD, I. und SHIVAPRASAD, H. L. (2013): Avian bornavirus and proventricular dilatation disease: diagnostics, pathology, prevalence, and control. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* **16**(2): 339-355.
- HUGHES, P. E. (1984): The pathology of myenteric ganglioneuritis, psittacine encephalomyelitis, proventricular dilatation of psittacines, and macaw wasting syndrome. 33rd Western Poultry Disease Conference, Davis, California, USA, 85-87.
- JOEST, S. W. (1911): Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung (Borna'sche Krankheit) des Pferdes mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsweges und der Kereinschlüsse. *Z Inf Krkh Haustiere*(10): 293.
- KALETA, E. F. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E. H. (2011): Kompendium der Ziervogelkrankheiten. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft.
- KATZ, J. B., ALSTAD, D., JENNY, A. L., CARBONE, K. M., RUBIN, S. A. und WALTRIP, R. W., 2ND (1998): Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **10**(4): 338-343.
- KERSKI, A., DE KLOET, A. H. und DE KLOET, S. R. (2012): Vertical transmission of avian bornavirus in Psittaciformes: avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in eggs, embryos, and hatchlings obtained from infected sun conures (*Aratinga solstitialis*). *Avian Diseases* **56**(3): 471-478.
- KISTLER, A. L., GANCZ, A., CLUBB, S., SKEWES-COX, P., FISCHER, K., SORBER, K., CHIU, C. Y., LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, Y., GRENINGER, A., WEN, C. C., KARLENE, S. B., GANEM, D. und DERISI, J. L. (2008): Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology Journal* **5**: 88.

- KISTLER, A. L., SMITH, J. M., GRENINGER, A. L., DERISI, J. L. und GANEM, D. (2010): Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *Journal of Virology* **84**(4): 2176-2179.
- KOHNO, T., GOTO, T., TAKASAKI, T., MORITA, C., NAKAYA, T., IKUTA, K., KURANE, I., SANO, K. und NAKAI, M. (1999): Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *Journal of Virology* **73**(1): 760-766.
- KORBEL, R. und RINDER, M. (2011): Ocular Findings in Psittacine Birds infected with Avian Bornavirus (ABV). Conference of the Association of Avian Veterinarians, Seattle, USA, 21.
- KUHN, J. H., BAO, Y., BAVARI, S., BECKER, S., BRADFUTE, S., BRAUBURGER, K., RODNEY BRISTER, J., BUKREYEV, A. A., CAI, Y., CHANDRAN, K., DAVEY, R. A., DOLNIK, O., DYE, J. M., ENTERLEIN, S., GONZALEZ, J. P., FORMENTY, P., FREIBERG, A. N., HENSLEY, L. E., HOENEN, T., HONKO, A. N., IGNATYEV, G. M., JAHRLING, P. B., JOHNSON, K. M., KLENK, H. D., KOBINGER, G., LACKEMEYER, M. G., LEROY, E. M., LEVER, M. S., MUHLBERGER, E., NETESOV, S. V., OLINGER, G. G., PALACIOS, G., PATTERSON, J. L., PAWESKA, J. T., PITT, L., RADOSHITZKY, S. R., RYABCHIKOVA, E. I., SAPHIRE, E. O., SHESTOPALOV, A. M., SMITHER, S. J., SULLIVAN, N. J., SWANEPOEL, R., TAKADA, A., TOWNER, J. S., VAN DER GROEN, G., VOLCHKOV, V. E., VOLCHKOVA, V. A., WAHL-JENSEN, V., WARREN, T. K., WARFIELD, K. L., WEIDMANN, M. und NICHOL, S. T. (2014): Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Archives of Virology* **159**(5): 1229-1237.
- KUHN, J. H., DURRWALD, R., BAO, Y., BRIESE, T., CARBONE, K., CLAWSON, A. N., DERISI, J. L., GARTEN, W., JAHRLING, P. B., KOLODZIEJEK, J., RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., STENGLEIN, M., TOMONAGA, K., WEISSENBOCK, H. und NOWOTNY, N. (2015): Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Archives of Virology* **160**(2): 621-632.
- KUMMERFELD, N. (2011): Allgemeine klinische Anamnese. In: KALETA, E. F. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E., (Hrsg.): *Kompandium der Ziervogelkrankheiten*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, Hannover 2011. 43-44.

- LIERZ, M. (2005): Proventricular Dilatation Disease. In: HARCOURT-BROWN, N. und CHITTY, J., (Hrsg.): BSAVA Manual of Psittacine Birds. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester 2005. 161-163.
- LIERZ, M., HAFEZ, H. M., HONKAVUORI, K. S., GRUBER, A. D., OLIAS, P., ABDELWHAB, E. M., KOHLS, A., LIPKIN, W. I., BRIESE, T. und HAUCK, R. (2009): Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathology* **38**(6): 491-496.
- LIERZ, M., HERDEN, C., HERZOG, S. und PIEPENBRING, A. (2010): [Proventricular dilatation disease and Avian Bornavirus as a possible cause]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* **38**(2): 87-94.
- LIERZ, M., PIEPENBRING, A., HERDEN, C., OBERHAUSER, K., HEFFELS-REDMANN, U. und ENDERLEIN, D. (2011): Vertical transmission of avian bornavirus in psittacines. *Emerging Infectious Diseases* **17**(12): 2390-2391.
- LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, Y., PERL, S. und BENDHEIM, U. (2006): An outbreak of proventricular dilatation disease in psittacine breeding farm in israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **61**(1): 16-18.
- LUDWIG, H., BODE, L. und GOSZTONYI, G. (1988): Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Progress in Medical Virology* **35**: 107-151.
- LUDWIG, H., KRAFT, W., KAO, M., GOSZTONYI, G., DAHME, E. und KREY, H. (1985): [Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice]. *Tierärztliche Praxis* **13**(4): 421-453.
- LUTZ, M. E. und WILSON, R. B. (1991): Psittacine proventricular dilatation syndrome in an umbrella cockatoo. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **198**(11): 1962-1964.
- MANNL, A., GERLACH, H. und LEIPOLD, R. (1987): Neuropathic Gastric Dilatation in Psittaciformes. *Avian Diseases* **31**(1): 214-221.
- MCKINNEY, P. (2008): Cage and Environment. In: SAMOUR, J., (Hrsg.): *Avian Medicine*. Elsevier, Edinburgh 2008. 26-30.

- MIRHOSSEINI, N., GRAY, P. L., HOPPES, S., TIZARD, I., SHIVAPRASAD, H. L. und PAYNE, S. (2011): Proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) after infection with a genotype 2 avian bornavirus. *Journal of Avian Medicine and Surgery* **25**(3): 199-204.
- MONACO, E., HOPPES, S., GUO, J. und TIZARD, I. (2012): The detection of avian bornavirus within psittacine eggs. *J Avian Med Surg* **26**(3): 144-148.
- MORALES, J. A., HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K. und 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.
- NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H. und ROTT, R. (1983a): Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science* **220**(4604): 1401-1403.
- NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H. und ROTT, R. (1983b): Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoecephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *Journal of Infectious Diseases* **148**(2): 305-315.
- NEDOROST, N., MADERNER, C. A., KOLODZIEJEK, J., LUSSY, H., NOWOTNY, N. und WEISSENBOCK, H. (2012): Identification of mixed infections with different genotypes of avian bornaviruses in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Diseases* **56**(2): 414-417.
- NOWOTNY, N., KOLODZIEJEK, J., JEHLE, C. O., SUCHY, A., STAEHEL, P. und SCHWEMMLE, M. (2000): Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *Journal of Virology* **74**(12): 5655-5658.
- OGAWA, H., SANADA, Y., SANADA, N., KUDO, M., TUCHIYA, K., KODAMA, T. und UETSUKA, K. (2011): Proventricular Dilatation Disease Associated with Avian Bornavirus Infection in a Citron-Crested Cockatoo that Was Born and Hand-Reared in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* **73**(6): 837-840.
- OLDACH, D., ZINK, M. C., PYPER, J. M., HERZOG, S., ROTT, R., NARAYAN, O. und CLEMENTS, J. E. (1995): Induction of protection against Borna disease by inoculation with high-dose-attenuated Borna disease virus. *Virology* **206**(1): 426-434.

- PAYNE, S., SHIVAPRASAD, H. L., MIRHOSSEINI, N., GRAY, P., HOPPES, S., WEISSENBOCK, H. und TIZARD, I. (2011): Unusual and severe lesions of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian bornavirus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV. *Avian Pathol* **40**(1): 15-22.
- PAYNE, S. L., DELNATTE, P., GUO, J., HEATLEY, J. J., TIZARD, I. und SMITH, D. A. (2012): Birds and bornaviruses. *Animal Health Research Reviews* **13**(2): 145-156.
- PHALEN, D. N. (1986): An outbreak of proventricular dilatation syndrome (PPDS) in a private collection of birds and an atypical form of PPDS in a nanday conure. Conference of the Association of Avian Veterinarians, Miami, Florida, USA, 27-34.
- PHILADELPHO, N. A., RUBBENSTROTH, D., GUIMARAES, M. B. und PIANTINO FERREIRA, A. J. (2014): Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. *Veterinary Microbiology* **174**(3-4): 584-590.
- RAE, M. A. (2006): Diagnostic value of necropsy. In: HARRISON, G. J. und LIGHTFOOT, T. L., (Hrsg.): *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Florida, USA 2006. 661-678.
- RAGHAV, R., TAYLOR, M., DELAY, J., OJKIC, D., PEARL, D. L., KISTLER, A. L., DERISI, J. L., GANEM, D. und SMITH, D. A. (2010): Avian bornavirus is present in many tissues of psittacine birds with histopathologic evidence of proventricular dilatation disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **22**(4): 495-508.
- REDIG, P. (2008): Fungal diseases - Aspergillosis. In: SAMOUR, J., (Hrsg.): *Avian Medicine*. Elsevier, Edinburgh 2008. 373-387.
- REUTER, A., ACKERMANN, A., KOTHLOW, S., RINDER, M., KASPER, B. und STAEHEL, P. (2010): Avian Bornaviruses Escape Recognition by the Innate Immune System. *Viruses* **2**(4): 927-938.
- RICHT, J., HERZOG, S., SCHMEEL, A., FRESE, K. und ROTT, R. (1994a): Current knowledge about Borna disease. In: NAKAJIMA, H. und PLOWRIGHT, W., (Hrsg.): *Equine Infectious Diseases*. R&W Publications, Newmarket 1994a. 55-60.

- RICHT, J., STITZ, L., DESCHL, U., FRESE, K. und ROTT, R. (1990): Borna disease virus-induced meningoencephalomyelitis caused by a virus-specific CD4+ T cell-mediated immune reaction. *Journal of General Virology* **71** (Pt 11): 2565-2573.
- RICHT, J. A., PFEUFFER, I., CHRIST, M., FRESE, K., BECHTER, K. und HERZOG, S. (1997): Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging Infectious Diseases* **3**(3): 343-352.
- RICHT, J. A., SCHMEEL, A., FRESE, K., CARBONE, K. M., NARAYAN, O. und ROTT, R. (1994b): Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *Journal of Experimental Medicine* **179**(5): 1467-1473.
- RICHT, J. A., VANDEWOUDE, S., ZINK, M. C., CLEMENTS, J. E., HERZOG, S., STITZ, L., ROTT, R. und NARAYAN, O. (1992): Infection with Borna disease virus: molecular and immunobiological characterization of the agent. *Clinical Infectious Diseases* **14**(6): 1240-1250.
- RIDGWAY, R. A. und GALLERSTEIN, G. A. (1983): Proventricular dilatation in psittacines. Conference of the Association of Avian Veterinarians, San Diego, California, USA, 228-233.
- RINDER, M., ACKERMANN, A., KEMPF, H., KASPERS, B., KORBEL, R. und STAEHEL, P. (2009): Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *Journal of Virology* **83**(11): 5401-5407.
- RINDER, M., HÖGEMANN, C., HUFEN, H., BROSINSKI, K., KASPERS, B., RUBBENSTROTH, D., STAEHEL, P. und KORBEL, R. (2014): Experimentelle Infektion von Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus erithacus*) mit aviären Bornaviren: Klinische und pathologische Veränderungen. 1. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe "Zier-, Zoo- und Wildvögel, Reptilien und Amphibien", München, 61-63.
- ROSSI, G., ENDERLEIN, D., HERZOG, S., HERDEN, C., CAPELLI, S., PIEPENBRING, A., HEFFELS-REDMANN, U., MÜLLER, H., OBERHAUSER, K., PESARO, S. und LIERZ, M. (2011): Comparison of anti-ganglioside antibodies and anti-ABV antibodies in psittacines. 11th European AAV Conference 2011, Madrid, Spain, 187-188.

- ROTT, R. und BECHT, H. (1995): Natural and experimental Borna disease in animals. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **190**: 17-30.
- RUBBENSTROTH, D., BROSINSKI, K., RINDER, M., OLBERT, M., KASPERS, B., KORBEL, R. und STAEHEL, P. (2014a): No contact transmission of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and domestic canaries (*Serinus canaria forma domestica*). *Veterinary Microbiology* **172**(1-2): 146-156.
- RUBBENSTROTH, D., RINDER, M., KASPERS, B. und STAEHEL, P. (2012): Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Veterinary Microbiology*.
- RUBBENSTROTH, D., RINDER, M., STEIN, M., HOPER, D., KASPERS, B., BROSINSKI, K., HORIE, M., SCHMIDT, V., LEGLER, M., KORBEL, R. und STAEHEL, P. (2013): Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Veterinary Microbiology* **165**(3-4): 287-295.
- RUBBENSTROTH, D., SCHMIDT, V., RINDER, M., LEGLER, M., CORMAN, V. M. und STAEHEL, P. (2014b): Discovery of a new avian bornavirus genotype in estrildid finches (Estrildidae) in Germany. *Veterinary Microbiology* **168**(2-4): 318-323.
- SAUDER, C. und STAEHEL, P. (2003): Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *Journal of Virology* **77**(23): 12886-12890.
- SCHMIDT, J. (1952): Die Bornakrankheit des Pferdes. 55 Jahre Forschung und Lehre. *Archiv experimentelle Veterinärmedizin* **6**: 177-187.
- SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., KIM, S. und LIPKIN, W. I. (1994): Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *Journal of Virology* **68**(10): 6514-6522.
- SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., LAMB, R. A. und LIPKIN, W. I. (1995): The remarkable coding strategy of borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* **210**(1): 1-8.

- SCHÜPPEL, K. F., KINNE, J., LEBELT, J. und REINACHER, M. (1995): Zwei Fälle von Borna'scher Krankheit bei Varis (*Memur variegatus*). 38. Tagung der Fachgruppe "Pathologie" der DVG, Hamburg.
- SCHÜPPEL, K. F., KINNE, J. und REINACHER, M. (1994): Bornavirus-Antigennachweis bei Alpakas (*Lama pacos*) sowie bei einem Faultier (*Choleopus didactylus*) und einem Zwergflusspferd. *Verh Erkr Zootiere*(36): 189-193.
- SCHWEMMLE, M., CARBONE, K. M., TOMONAGA, K., NOWOTNY, N. und GARTEN, W. (2012): Bornaviridae. In: KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B. und LEFKOWITZ, E. J., (Hrsg.): *Virus Taxonomy*. Elsevier, 2012.
- SCHWEMMLE, M., SALVATORE, M., SHI, L., RICHT, J., LEE, C. H. und LIPKIN, W. I. (1998): Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *Journal of Biological Chemistry* **273**(15): 9007-9012.
- SCOPE, A. (2011): Bakterielle Erkrankungen. In: KALETA, E. F. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E., (Hrsg.): *Kompodium der Ziervogelkrankheiten*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, Hannover 2011. 204-223.
- SHIVAPRASAD, H. L., BARR, B. C., WOODS, L. W., DAFT, B. M., MOORE, J. D., KINDE, H., ANDERSON, M. L. und DROUAL, R. (1995): Spectrum of Lesions (Pathology) of Proventricular Dilatation Syndrome Conference of the Association of Avian Veterinarians, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 507-508.
- SIEGMANN, O. und NEUMANN, U. H. (2012): *Kompodium der Geflügelkrankheiten*. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft.
- SILVANOSE, C. (2008): Fungal diseases - Candidiasis. In: SAMOUR, J., (Hrsg.): *Avian Medicine*. Elsevier, Edinburgh 2008. 388-390.
- STAEHEL, P., RINDER, M. und KASPERS, B. (2010): Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *Journal of Virology* **84**(13): 6269-6275.

- STEINMETZ, A., PEES, M., SCHMIDT, V., WEBER, M., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E. und OECHTERING, G. (2008): Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). *Journal of Small Animal Practice* **49**(12): 660-662.
- STITZ, L., BILZER, T. und PLANZ, O. (2002): The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Frontiers in Bioscience* **7**: d541-555.
- STITZ, L., DIETZSCHOLD, B. und CARBONE, K. M. (1995): Immunopathogenesis of Borna disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **190**: 75-92.
- STITZ, L., NOSKE, K., PLANZ, O., FURRER, E., LIPKIN, W. I. und BILZER, T. (1998): A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *Journal of Virology* **72**(11): 8884-8892.
- STITZ, L., SOEDER, D., DESCHL, U., FRESE, K. und ROTT, R. (1989): Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *Journal of Immunology* **143**(12): 4250-4256.
- SUEDMEYER, W. K. (1992): Diagnosis and Clinical Progression of three cases of Proventricular Dilatation Syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* **6**(3): 159-163.
- SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, S. (2010): Bornavirus. Retrieved 26.02.2017, from http://viralzone.expasy.org/all_by_species/279.html.
- TURNER, R. (1984): Macaw fading or wasting syndrome. 33rd Western Poultry Disease Conference, Davis, California, USA, 87-88.
- VICE, C. A. (1992): Myocarditis as a component of psittacine proventricular dilatation syndrome in a Patagonian conure. *Avian Diseases* **36**(4): 1117-1119.
- VILLANUEVA, I., GRAY, P., MIRHOSSEINI, N., PAYNE, S., HOPPE, S., HONKAVUORI, K. S., BRIESE, T., TURNER, D. und TIZARD, I. (2010): The diagnosis of proventricular dilatation disease: use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Borna virus. *Veterinary Microbiology* **143**(2-4): 196-201.

- WEISSENBOCK, H., BAKONYI, T., SEKULIN, K., EHRENSPERGER, F., DONELEY, R. J., DURRWALD, R., HOOP, R., ERDELYI, K., GAL, J., KOLODZIEJEK, J. und NOWOTNY, N. (2009a): Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases* **15**(9): 1453-1459.
- WEISSENBOCK, H., NOWOTNY, N., CAPLAZI, P., KOLODZIEJEK, J. und EHRENSPERGER, F. (1998): Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**(7): 2127-2130.
- WEISSENBOCK, H., SEKULIN, K., BAKONYI, T., HOGLER, S. und NOWOTNY, N. (2009b): Novel avian bornavirus in a nonpsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *Journal of Virology* **83**(21): 11367-11371.
- WOERPEL, R. W. und ROSSKOPF, W. J. (1984a): Clinical and Pathologic Features of Macaw Wasting Disease. 33rd Western Poultry Disease Conference, Davis, California, USA, 89-90.
- WOERPEL, R. W., ROSSKOPF, W. J. und HUGHES, P. E. (1984b): Proventricular Dilatation and Wasting Syndrome: Myenteric Ganglioneuritis and Encephalomyelitis of Psittacines; an update. Conference of the Association of Avian Veterinarians, Toronto, Canada, 25-28.
- WÜNSCHMANN, A., HONKAVUORI, K., BRIESE, T., LIPKIN, W. I., SHIVERS, J. und ARMIEN, A. G. (2011): Antigen tissue distribution of Avian bornavirus (ABV) in psittacine birds with natural spontaneous proventricular dilatation disease and ABV genotype 1 infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **23**(4): 716-726.
- ZWICK, W. (1939): Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere. In: GILDENMEISTER, E., HAAGEN, E. und WALDMANN, O., (Hrsg.): *Handbuch der Viruserkrankungen*. Gustav Fischer Verlag, Jena 1939. 252-354.

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Michael Lierz für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung von Material, Arbeitsplatz und Literatur bedanken. Seine langjährige, hartnäckige und intensive Unterstützung und Förderung auf wissenschaftlicher, fachlicher und beruflicher Ebene haben mir viele Türen geöffnet und mich nachhaltig geprägt.

Herrn Dr. Dirk Enderlein danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung der PaBV-2-PCR, für die geduldigen Ratschläge zu unzähligen Fragen zu Laborproblemen und für die Unterstützung bei den Infektionsversuchen.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Heffels-Redmann bedanken, die mich in die Laborarbeit eingeführt hat und stets hilfreiche Anregungen für die Publikationen und Versuche hatte.

Frau Dr. Sibylle Herzog aus dem Institut für Virologie gilt mein besonderer Dank, da sie mich nicht nur bei der Bewältigung der Untersuchung unzähliger Proben unterstützte, sondern immer ein offenes Ohr für Probleme hatte und mir stets neue Denkanstöße und Blickwinkel vermittelte. Auch für die rege konstruktive Kritik möchte ich mich bei ihr bedanken. Ebenfalls aus dem Institut für Virologie gilt mein Dank Frau Hildburg Lange-Herbst für die Unterstützung bei der Serologie und Virus-Reisolierung.

Frau PD Dr. Christiane Herden aus dem Institut für Veterinärpathologie danke ich für die Unterstützung bei der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung und für die sehr hilfreiche Auseinandersetzung mit den Publikationen. Auch Frau Saskia Reißmeyer und Herrn Basim Al-Ibadi aus dem Institut für Veterinärpathologie möchte ich für die Unterstützung bei der Untersuchung der vielen Proben danken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Sandra David-Holl, Frau Julia Schmalz und Frau Hanne Falkenstein bedanken, die mich bei der PCR und der PMV-Serologie im Labor der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische

großartig unterstützt haben und mir in anstrengenden Zeiten im Tierversuch den Rücken im Labor freigehalten haben.

Ein sehr herzlicher Dank gilt den (z.T. mittlerweile ehemaligen) Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, die mich zu jeder Zeit und mit großem Ehrgeiz bei den Versuchen und bei der Untersuchung der vielen Proben unterstützt haben, die mir stets zur Seite standen und meine Dienste in der Poliklinik während der Versuchszeit übernommen haben, die mir unglaublich viel Spaß und Freude in meiner Zeit in der KVRAF bereitet haben und mit denen mich zum Teil bis heute und hoffentlich noch sehr lange eine enge Freundschaft verbindet. Ein solches Team habe ich selten erlebt, der große Zusammenhalt hat mir stets die nötige Kraft für meine Aufgaben in der Klinik und der Doktorarbeit gegeben. Allen voran möchte ich Frau Dr. Kristina Meier, Frau Julia Heckmann, Frau Helena Schneider, Frau Franca Möller Palau-Ribes, Frau Susanne Paries und Herrn Dominik Fischer danken, die mich immer mit bester Laune und großem Engagement unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich bei Frau Luisa Ziegler, Frau Svenja Funcke, Frau Hannah Wünnemann, Frau Sylvia Mayr, Frau Elisa Wüst, Frau Bärbel Nachtigall, Herrn Andreas Bublath, Frau Christine Lange und Herrn Christoph Kleinhakenkamp bedanken, die mich bei den Voruntersuchungen, bei den Infektionen, Probenahmen, Sektionen, Laboruntersuchungen, Bestellungen von Material und bei den Diensten in der Poliklinik unterstützt haben.

Frau Antoinette Huhn gilt mein besonderer Dank für die unaufhörliche Unterstützung bei der Untersuchung der bakteriologischen und mykologischen Proben.

Herrn Dr. Marcellus Bürkle möchte ich für die Bereitstellung der Futterautomaten danken.

Frau Susanne Rückemann und Frau Dr. Ruth Kothe möchte ich danken, da wir ohne sie unsere zwei PaBV-Isolate nicht hätten.

Ich bedanke mich bei der Loro Parque Fundacion, Teneriffa, für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer in meinem Weg bekräftigt hat, besonders meiner Mutter Jutta, die mich zu dem zielstrebigen und ehrgeizigen Menschen gemacht hat, der ich heute bin und die mir mein ganzes Leben trotz aller Umstände alle Wege ermöglicht hat. Ich danke meinen Großeltern für die finanzielle Unterstützung und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie trotz jahrelanger Abwesenheit meinerseits und versuchsbedingter regelmäßiger Absagen immer zu mir gehalten haben. Ganz besonders aber danke ich Sebastian, ohne den ich oft genug die Nerven nicht behalten hätte, der mir immer wieder großes Verständnis für meinen nicht ganz so einfachen Weg entgegenbrachte und der mir der größte Motivator ist.

10 Erklärung

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

Anne Piepenbring

Bergisch Gladbach, 08.03.2017



ISBN 978-3-86345-364-0



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