

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: PD Dr. Monika Rinder

**Evaluierung der Wachtel als Tiermodell für Infektionen mit aviären
Bornaviren und die Neuropathische Drüsenmagendilatation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Von
Julia Brüggemann
aus Mönchengladbach

München 2012

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: PD Dr. Monika Rinder

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Clemens Knospe

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Für die Vögel dieser Welt, Gotcha und meine Oma Hedwig †,
von der ich die Liebe zu den Vögeln habe.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung.....	3
II.	Literaturübersicht	4
1.	Neuropathische Drüsenmagendilatation.....	4
1.1	Ätiologie.....	5
1.1.1	Aviäres Bornavirus	6
1.2	Klinik	8
1.3	Diagnostik	9
1.3.1	Klinische Diagnose einer PDD	9
1.3.2	Nachweis einer ABV-Infektion	10
1.4	Pathologie und Histologie	12
1.5	Infektionsversuche	13
2.	Bornasche Krankheit	17
2.1	Ätiologie.....	19
2.1.1	Borna Disease Virus	20
2.2	Klinik	21
2.3	Diagnostik	22
2.4	Histopathologie.....	24
2.5	Infektionsversuche	24
3.	Die Japanische Wachtel (<i>Coturnix coturnix japonica</i>)	27
3.1	Biologie und Ökologie	27
3.2	<i>Coturnix coturnix japonica</i> als Versuchstier	29
3.3	Erkrankungen	29
3.4	Experimentell induzierte Erkrankungen	30
III.	Material und Methoden.....	32
1.	Versuchsplanung	32
1.1	Versuchstiere	32
1.2	Virusmaterial.....	33
1.3	Versuchsdurchführung	33
1.3.1	Experimentelle Infektion	34
1.3.2	Probenentnahme	35
1.3.3	Klinische Untersuchung.....	37
1.3.4	Augenuntersuchung	37
1.3.5	Pathologisch-anatomische Untersuchung	39

1.3.6	ABV-RNA-Nachweis	40
1.3.7	ELISA	41
1.3.7.1	ABV-N Protein	41
1.3.7.2	Gewinnung von Kontrollseren	41
1.3.7.3	Anti-ABV-N-ELISA	42
1.3.8	Histologie	43
1.3.9	Immunhistologie	44
IV.	Ergebnisse	46
1.	Klinische Untersuchung und Gewichtsentwicklung	46
2.	Augenuntersuchung	47
3.	Pathologie	48
4.	Bornavirus -rRT-PCR	51
5.	Serologie	51
6.	Histologie	56
7.	Immunhistologie	58
V.	Diskussion	59
VI.	Zusammenfassung	67
VII.	Summary	69
VIII.	Literaturverzeichnis	71
IX.	Anhang (Tabellen- und Abbildungsverzeichnis)	90
XI.	Danksagung	91

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ABV	aviäres Bornavirus
al.	alii, aliae
BD	Bornasche Krankheit (Borna disease)
BDV	Bornavirus (Borna disease virus)
<i>C. c.</i>	<i>Coturnix coturnix</i>
C	Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
CEC-32	Wachzelfibroblastenzelle
CELO	Chicken embryo lethal orphan virus
ct	Schwellenwertzyklus (cycle threshold)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorbtionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
ffu	fluoreszierende Fokuseinheiten (fluorescent focus units)
g	Gramm
G	Breite (gauge)
H ₂ O	Wasser
i.m.	intramuskulär
IgG	Immunglobulin G
IgY	Immunglobulin Y
Inc.	amtlich als AG eingetragen (incorporated)
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
m ²	Quadratmeter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter

MM	Mastermix
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
nm	Nanometer
NNS	negativ unsegmentiert (negative nonsegmented)
Nr.	Nummer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
OD	optische Dichte
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>p. m.</i>	<i>post mortem</i>
<i>p. o.</i>	<i>per os</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDD	Drüsenmagendilatation (Proventricular Dilatation Disease)
PMV	Paramyxovirus
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRT-PCR	Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (realtime reverse transkriptase polymerase chain reaction)
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
SD	Standardabweichung (standard deviation)
Taq. Pol.	Taq-Polymerase
TBS-T	Tris-hydroxyl-methylaminomethan gepufferte Tween-20 Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline Tween-20)
TMB	dreifach Puffer (Tri-Mode Buffer)
ZNS	Zentralnervensystem

I. EINLEITUNG

Seit Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts ist bei Psittaziden eine tödlich verlaufende, chronisch auszehrende Krankheit beschrieben, die sich durch eine Erweiterung des Drüsenmagens, Anorexie, Lethargie, Depression, Dysphagie, Regurgitation, unverdaute Körner im Kot, Kachexie, Kropfstase, Ataxie und zentralnervöse Ausfälle in unterschiedlichsten Ausprägungen darstellt (Mannl et al. 1986; Bond et al. 1993; Berhane et al. 2001). Hierbei handelt es sich um die Neuropathische Drüsenmagendilatation oder auch Proventricular Dilatation Disease (PDD), die bei Papageienvögeln weltweit verbreitet ist.

Bislang konnte diese Erkrankung bei mehr als 80 Papageienspezies (Kakadus, Aras, Graupapageien, Amazonen u.a.) beobachtet werden. Ähnliche Krankheitsbilder wurden aber auch z.B. bei Wanderfalken, Finkenartigen, Kanarienvögeln, Schmuckvögeln oder Kanadagänsen beschrieben (Daoust et al. 1991; Gregory et al. 1997b; Lublin et al. 2006; Doneley et al. 2007). Sehr schnell vermutete man aufgrund histopathologischer und epidemiologischer Erkenntnisse (Woerpel und Rosskopf 1984; Graham 1991) ein Virus als Ursache.

Im Jahre 2008 gelang es schließlich zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, in Zusammenhang mit PDD ein neues Virus zu beschreiben, das aufgrund seiner Merkmale der Familie der Bornaviridae zugeordnet wurde (Honkavouri et al. 2008; Kistler et al. 2008). Dieses Virus, als aviäres Bornavirus bezeichnet, wird mittlerweile als Erreger der PDD angesehen.

Derzeit sind die Kenntnisse über diese weitverbreitete Erkrankung, die bei den betroffenen Vögeln stets tödlich endet, insbesondere hinsichtlich der aviären Bornaviren sehr lückenhaft. Daher ist es unabdingbar, weitere detaillierte Erkenntnisse bezüglich dieser neuen Erreger zu gewinnen. Ein geeignetes Tiermodell fehlt derzeit aber noch.

Die Japanische Wachtel wurde bereits für andere virusbedingte Erkrankungen als Modelltier herangezogen (Jeong et al. 2009; Poynter et al. 2009; Giannecchini et al. 2010; Wakenell et al. 2010). Ihre Vorzüge in Zucht und Haltung bestehen vor allem im geringen Platzbedarf und Futtermittelverbrauch, der relativ kurzen Brutdauer, dem frühen Eintritt der Legereife sowie ihrer bis zum etwa achten Lebensmonat konstant hohen Legeleistung (Kiwitt 2006; Bernhardt und Kühne 2007; Köhler 2007; Huss et al. 2008). Die genannten Eigenschaften prädestinieren die Wachtel

als Versuchstier bei experimenteller Fragestellung.

Bei Untersuchungen zur *in vitro*-Kultivierung von aviären Bornaviren zeigte sich, dass Fibroblastenzellen der Japanischen Wachtel, und zwar die Zelllinie CEC-32, hervorragend zu Anzucht und weiteren Studienzwecken geeignet sind (Rinder et al. 2009). Daher lag es nahe, zu untersuchen, ob die Wachtel auch *in vivo*, also als Tiermodell für eine Infektion mit aviären Bornaviren und für PDD herangezogen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob und inwieweit die Wachtel für ABV empfänglich ist. Dazu sollten Japanische Wachteln mit einem in Zellkultur vermehrten ABV-Stamm infiziert und anschließend klinisch sowie mittels rRT-PCR, ELISA und Immunhistochemie untersucht werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Neuropathische Drüsenmagendilatation

Bei der Neuropathischen Drüsenmagendilatation handelt es sich um eine chronisch verlaufende Krankheit des Magendarmtraktes und ZNS, die bereits seit den späten 70er Jahren des 20. Jahrhunderts bekannt ist und erstmals Anfang der 80er Jahre in Fachkreisen veröffentlicht wurde (Ridgway und Gallerstein 1983; Clark 1984; Turner 1984; Woerpel und Rosskopf 1984). Anfängliche Beobachtungen ließen vermuten, dass hauptsächlich Aras betroffen sind und führten zu der Bezeichnung „macaw wasting disease“ (Gerlach 1986; Phalen 1997). Heute gebräuchliche Synonyme sind PDD – Proventricular Dilatation Disease im englischsprachigen Raum sowie neuropathische (Drüsen-) Magendilatation, die die Nervenbeteiligung und das Kardinalsymptom des dilatierten Drüsenmagens als Kennzeichen dieser Krankheit in den Vordergrund stellen (Mannl et al. 1986; Phalen 1997; Gylstorff und Grimm 1998). Bis heute sind über 80 Psittazidenarten als betroffen bekannt (Doolen, 1994; Gregory et al. 1994, 1995, 1997b) u.a. Kakadus (*Cacatua spp.*), Graupapageien (*Psittacus erithacus*), Aras (*Ara spp.*) und Amazonen (*Amazonas spp.*). Auch bei anderen Vogelgruppen (Finken, Schmuckvögel, Tangaren, Löffler, Spechte, Greifvögel u.w.) konnte dieses Krankheitsbild beobachtet werden (Daoust et al. 1991; Gregory et al. 2000; Perpignan 2007; Weissenböck et al. 2009a). Eine weltweite Verbreitung der PDD ist dokumentiert (Gregory et al. 1997b).

Nach heutigen Erkenntnissen hat dieses Krankheitsbild stets einen letalen Ausgang und stellt die häufigste Magendarmerkrankung bei Papageienvögeln dar, wie Reavill und Schmidt (2007) in einer Sektionsstudie an über 1400 Tierkörpern nachweisen konnten. Seit Jahren suchte man intensiv nach neuen v.a. ätiologischen Erkenntnissen (Gregory et al. 1997a; Rossi et al. 2008), um diese für Klein- und Großbestände in der Zucht- und Hobbyhaltung und auch für Wildpopulationen bedrohliche Infektion einzudämmen. Im Jahre 2008 gelang es schließlich zwei unabhängigen Forschungsgruppen (Honkavouri et al. 2008; Kistler et al. 2008) bei Papageien, die an PDD erkrankt waren, ein bis dahin unbekanntes Virus, das aviäre Bornavirus, nachzuweisen. Diese Neuentdeckung ist wegweisend für die zukünftige Forschung auf diesem Gebiet, von der man sich

zuverlässige non-invasive Diagnostikverfahren und die Entwicklung fundierter Therapie- und Prophylaxekonzepte erwartet.

1.1 Ätiologie

Seit den ersten Beschreibungen der PDD wurde angenommen, dass an der Pathogenese ein Virus mit Einfluss auf und Affinität zum Nervengewebe Anteil hat. Eine in histologischen Untersuchungen nachgewiesene non-purulente Polyneuritis und die Tatsache, dass innerhalb eines Bestandes in wenigen Monaten mehrere Tiere seuchenhaft erkrankten (Woerpel und Rosskopf 1984; Graham 1991), gaben bereits früh ätiologische Hinweise für eine infektiöse Ursache. In der Vergangenheit wurden verschiedenste Viren als kausales Agens vermutet und eine mögliche Beteiligung untersucht, u.a. das Eastern Equine Encephalomyelitis Virus (Gaskin et al. 1991, 1992; Ritchie 1995; Gregory et al. 1996b), aviäre Picorna-, Herpes- oder Polyomaviren (Hughes 1984; Woerpel und Rosskopf 1984). Diese Vermutungen konnten jedoch nicht bestätigt werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von klinischem Material an PDD erkrankter Vögel resultierten im Nachweis pleomorpher Viruspartikel, die morphologische Ähnlichkeit mit Paramyxo-, Entero-, Corona- und Reoviren aufwiesen, aber nicht genauer klassifiziert werden konnten (Gregory et al. 1996c, 2000). Bei Virusanzuchtversuchen in Zellkultur und Kot betroffener Tiere wurden mittels elektronenmikroskopischer Betrachtung virusartige behüllte Partikel festgestellt, die aber nicht näher differenziert werden konnten (Harcourt-Brown und Gough 1997).

Mannl et al. (1986) konnten in Ganglion- und Plexusgewebe von an PDD erkrankten Kakadus intranukleäre und intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen, wie sie auch bei aviärem Paramyxovirus Typ 1 vorkommen (Granzow et al. 1999), nachweisen und vermuteten einen ursächlichen Zusammenhang. In einer Reihe weiterer Studien wurde diese Hypothese der Paramyxoviren als Erreger der PDD verfolgt. (Mannl et al. 1986; Grund et al. 1998, 1999, 2002, 2007; Grund 2004). So wurden aviäre Paramyxoviren bei Papageien isoliert, die an PDD erkrankt waren. Aus dem Rückenmark dieser Vögel wurden postmortal Viren gewonnen, die sich elektronenmikroskopisch als den Paramyxoviren ähnlich erwiesen. Die Partikel

waren pleomorph, behüllt und hatten einen Durchmesser von 90-140nm. Bei sechs von 32 Organproben konnte PMV Serotyp 1 isoliert werden. Dabei handelte es sich um schwach virulente Varianten des Impfstammes B 1. Eine okulonasale Infektion mit PMV-1 Isolaten und eine peritoneale Reinfektion an zwei Graupapageien hatte jedoch keine PDD zur Folge (Grund 1998, 2002; Ritter 2007).

Eine virale Infektion im Zusammenhang mit der PDD wurde auch von Gregory et al. (1996c, 1997a, 2000) als wahrscheinlich angenommen, da eine Übertragung mit Homogenisaten aus Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen und Gehirn von an PDD erkrankten Vögeln erfolgreich war. Aus diesen Homogenaten konnten zudem virusähnliche Partikel isoliert werden (Gregory et al. 2000).

Als mögliche Ursache für die Ausprägung der Erkrankung wurden auch immunpathologische Prozesse diskutiert, zum Beispiel eine Antikörperbildung gegen körpereigene Ganglioside (Rossi et al. 2008).

Im Jahre 2008 gelang es Honkavuori et al. (2008) und Kistler et al. (2008) unabhängig voneinander, ein bis dato unbekanntes Virus in betroffenen Papageien in USA und Israel nachzuweisen. Dieses Virus zeigte große Ähnlichkeit mit dem Borna Disease Virus und wurde als aviäres Bornavirus bezeichnet (Kistler et al. 2008). Auf Basis dieser Erkenntnisse konnte auch in Mitteleuropa eine Assoziation zwischen der PDD und den neu entdeckten aviären Bornaviren beschrieben werden (Rinder et al. 2009). Zahlreiche Nachweise von ABV mittels Immunhistochemie (Ouyang et al. 2009), Serologie (De Kloet und Dorrestein 2009; Adrian et al. 2010) und RT-PCR (Honkavuori et al. 2008; Kistler et al. 2008; De Kloet und Dorrestein 2009; Enderlein et al. 2009; Rinder et al. 2009) sowie seit kurzem auch Infektionsversuche (Gancz et al. 2009a; Gray et al. 2009; Gray et al. 2010; Piepenbring et al. 2011) belegen nachhaltig einen kausalen Zusammenhang zwischen diesem Virus und der PDD.

1.1.1 Aviäres Bornavirus

Das aviäre Bornavirus ist der Familie der Bornaviridae und der Ordnung der Mononegavirales zuzuordnen. Es handelt sich um ein behülltes einzelsträngiges RNA-Virus mit einer negativen Genomorientierung, das eine nahe Verwandtschaft zu dem bei Säugetieren vorkommenden Borna Disease Virus

aufweist. Bei der Sequenzierung partieller Gensequenzen verschiedener ABV-Stämme wurde eine Sequenzhomologie von ca. 65% im Vergleich zu BDV ermittelt (Honkavuori et al. 2008; Kistler et al. 2008). Den Bornaviren gemeinsam ist, dass sie sechs Proteine besitzen, die mit N, X, P, M, G und L bezeichnet wurden. Das N-Protein (Nukleoprotein) ist ein Tetramer, um den die Virus-RNA gewickelt ist. Bei der viralen Replikation wird das N-Protein im Zytoplasma der Zelle synthetisiert, es ist an Transkriptions- und Replikationsprozessen beteiligt (Schwemmle und Lipkin 2004).

Aviäre Bornaviren zeigen eine große genetische Heterogenität. In phylogenetischen Untersuchungen wurden bei Papageienvögeln bisher sechs Genotypen voneinander abgegrenzt (Honkavuori et al. 2008; Kistler et al. 2008; Rinder et al. 2009; Weissenböck et al. 2009a; Stäheli et al. 2010; Rinder et al. 2010b; Delnatte et al. 2011). Die Genotypen 2 und 4 wurden bisher in Mitteleuropa am häufigsten nachgewiesen (Kistler et al. 2009; Rinder et al. 2009; Weissenböck et al. 2009a). Weissenböck et al. (2009b) konnten zudem erstmals ABV Genotyp 7 in einem Kanarienvogel nachweisen. Pathogenetische Unterschiede zwischen diesen Genotypen sind bis jetzt unbekannt. Delnatte et al. (2011) wiesen vor Kurzem einen weiteren Genotyp bei Kanadagänsen und Trompeterschwänen nach, die neuropathologische Veränderungen gezeigt hatten. Im Vergleich zum bei Säugern vorkommenden Borna Disease Virus, das sich streng neurotrop zeigt, wurde bei aviären Bornaviren ein ausgeprägter breiter Gewebstropismus sowohl in neuronalen als auch nicht neuronalen Zellstrukturen beobachtet (Rinder et al. 2009). Antigen und RNA des aviären Bornavirus wurden bei betroffenen Psittiden mit klinischer PDD in verschiedenen Organen wie Gehirn, Kropf, Drüsen- und Muskelmagen, Herz, Leber und Lunge (Rinder et al. 2009, 2010a; Weissenböck et al. 2009a; Hauck et al. 2010; Hoppes et al. 2010; Löffler et al. 2010; Raghav et al. 2010) nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den Säuger-Borna-Viren ließen sich aviäre Bornaviren bisher nicht in Säugerkulturen anzüchten. Eine Anzucht gelang nicht in Affen-, Ratten- und caninen Zelllinien, sehr wohl aber in Hühner- und Wachtelzelllinien (Rinder et al. 2009) sowie in Entenfibroblastenzellen (Gray et al. 2010). Aviäre Bornaviren wurden bisher ausschließlich bei Vögeln nachgewiesen. Das Virus zeigte also bisher eine hohe Affinität zu Vögeln. Ob das Borna Disease Virus auch bei Vögeln vorkommen kann, ist derzeit unklar. So existieren widersprüchliche Ergebnisse bezüglich einer Infizierbarkeit von Hühnern mit BDV (Alkewitz 1939;

Gosztonyi et al. 1983). Bei Straußen mit Paralysen in Israel wurde jedoch offenbar BDV nachgewiesen und das klinische Bild mittels Gabe von Gehirnhomogenaten erkrankter Tiere erzeugt (Ashash et al. 1996).

Die bis jetzt vorliegenden Untersuchungsergebnisse stützen die Auffassung, dass ABV das ursächliche Agens für die PDD ist. Zahlreiche Eigenschaften des neu entdeckten Virus sind jedoch noch unbekannt (Gancz et al. 2010; Hoppes et al. 2010; Ouyang et al. 2010).

Transmission und Infektionsrouten des ABV sind momentan noch weitestgehend ungeklärt. Vermutlich kann von einer fäkal-oralen oder fäkal-nasalen Übertragung ausgegangen werden (Rinder et al. 2009, 2010b; Gancz 2010), da Virusmaterial im Kot nachgewiesen werden kann.

Die Infektion mit diesen Viren betrifft sowohl juvenile als auch adulte Vögel (Kistler et al. 2009; Smith et al. 2009). Über den Zeitraum zwischen einer Infektion bis zum Virusnachweis und über die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der PDD *post infectionem* können keine eindeutigen Aussagen gemacht werden (Gancz et al. 2010). Kistler et al. (2010) dokumentierten bei Papageien-Nestlingen aus Hobbyzuchten eine Mindestinkubationszeit und einen zeitlichen Abstand zwischen Erstkontakt (Bestandsneuzugänge) und Nachweis von ABV-RNA von zwei bis vier Wochen.

1.2 Klinik

Das klinische Bild der PDD stellt sich in Symptomen und Ausprägungen wenig einheitlich dar. Eine variable Inkubationszeit, Chronizität sowie ein stets letaler Ausgang sind kennzeichnend für dieses Krankheitsbild (Rinder et al. 2009, 2010b). Im Vordergrund steht die Kachexie des erkrankten Vogels bei gleichbleibender und sogar übersteigter Futteraufnahme. Allerdings wurde auch Anorexie beschrieben. Bei den meist apathischen, abgemagerten Patienten können gastrointestinale Störungen auftreten, die sich in Symptomen wie Kropfstase, Regurgitation, Vomitus, Diarrhö und Ausscheidung unverdauter Körner oder andere Futterbestandteile im Kot, äußern. Desweiteren treten zentralnervöse Symptome wie Ataxien, Tremor, gestörte Propriozeption, progressive Lähmungen und Koordinationsstörungen auf (Clark 1994; Gerlach 1994; Shivaprasad et al. 1995; Phalen 1997; Berhane et al. 2001). Steinmetz et al. (2008) schildern einen

Fall eines erblindeten und gleichzeitig an PDD erkrankten Graupapageien. Ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der PDD und Erblinden/Augenveränderungen besteht, ist bisher nicht bekannt. Ein gehäuftes Auftreten von Chorioretinitiden bei an PDD erkrankten Vögeln wurde von Korbel und Rinder (2011) dokumentiert.

Vögel im chronischen Zustand können akut versterben oder auch Phasen ohne Krankheitsanzeichen erleben (Phalen 1986; Smith 2009). Die Erkrankung verläuft in den meisten Fällen progressiv und schubweise.

Als Differenzialdiagnosen sollten je nach Symptomlage des vorgestellten Vogels unter anderem Intoxikationen, z.B. mit Schwermetallen oder Pflanzengiften, Parasitosen (z.B. Spulwürmer, Zestoden, Toxoplasmen), Obstruktionen durch Fremdkörper oder Tumore, Mykosen (Asperillose, Candidose), Bakteriosen (z.B. Mykobakterien, *Enterobacteriaceae*, Chlamydien), Virusinfektionen (z.B. Herpesviren, Paramyxoviren, Adenoviren), das Alter (physiologische Magendilatation bei Jungvögeln), um hier nur einige exemplarisch anzuführen, in Betracht gezogen werden (Ritter 2007; Rinder et al. 2010b).

1.3 Diagnostik

1.3.1 Klinische Diagnose einer PDD

Die Diagnose einer PDD kann bei Verdacht beim Vorhandensein typischer Symptome (siehe Kapitel 1.2) durch verschiedene klinische Verfahren überprüft werden. Der Goldstandard für die Diagnose PDD gegenüber anderen symptomähnlichen Erkrankungen ist der Nachweis lymphoplasmazytärer Infiltrate in Biopaten oder histologischen Schnitten der Wand von Kropf oder Drüsenmagen. Biopsien dieser Gewebe v.a. des Kropfes am lebenden Tier sind sehr invasiv und nicht immer befriedigend, da diese Methode nur eine maximale Sensitivität zwischen 66-76% hat (Doolen 1994; Gregory et al. 1996a; Rinder et al. 2010b).

Bildgebenden Verfahren wie Kontrastströtgen, Röntgen, Sonographie oder die Kontrastfluoroskopie können hilfreich und unterstützend sein, letztendlich jedoch nicht zum Ausschluß oder Beweis einer PDD führen (Gancz et al. 2010). Im positiven Fall kann in manchen Fällen im Proventriculus, Ventriculus und

möglicherweise auch im kranialen Anteil des Dünndarms eine mehr oder weniger starke Dilatation beschrieben werden (Ritter 2007; Gancz et al. 2010; Rinder et al. 2010b) und beim Einsatz von Kontrastmittel teilweise eine verzögerte Passage des Kontrastmittels mit großen, zurückgebliebenen Mengen im Kropf. Ein aufgeblähter mit Gas und Ingesta gefüllter Proventriculus ist ein häufiger Befund. In der Hämatologie finden sich keine oder nur leichte Veränderungen, die jedoch nicht charakteristisch für eine PDD sind. Der häufigste Befund ist eine nichtregenerative Anämie (Gancz et al. 2010), die durch eine Malabsorption infolge der Störungen des Magendarmtraktes (siehe Kapitel 1.2) sowie eine unzureichende Futteraufnahme zu erklären ist. In wenigen Fällen kommt es auch zur Leukozytose, zu einer Hypoproteinämie oder Hypoalbuminämie oder auch einer milden bis moderaten Erhöhung der Lactatdehydrogenase, Kreatinkinase und/oder der Aspartataminotransferase. Eine Überprüfung der Zink- und Bleiwerte ist angeraten, da die Symptome einer Schwermetallintoxikation Ähnlichkeit mit denen einer PDD haben können (Ridgway und Gallerstein 1983; Woerpel und Roskopf 1984; Phalen 1986; Gancz et al. 2010).

In direkten Kropf- und Kotausstrichen können keine für eine PDD typischen Befunde ermittelt werden. Möglicherweise lassen sich so aber Differenzialdiagnosen bestätigen oder ausschließen, die sich mit PDD-ähnlichen gastrointestinalen Symptomen darstellen, wie die Megabakteriose oder ein Befall mit Helminthen (Gancz et al. 2010). Veränderungen der normalen Magendarmflora (z. B. Anstieg gramnegativer Bakterien, *Clostridium sp.*, *Candida sp.*) sollten mit Vorsicht interpretiert werden, da sie auf Primär- oder Sekundärprozesse hindeuten können (Gancz et al. 2010).

1.3.2 Nachweis einer ABV-Infektion

Seit der Erstbeschreibung aviärer Bornaviren im Jahr 2008 und ihrer vermuteten ätiologischen Korrelation zur PDD (Honkavuori et al. 2008; Kistler et al. 2008; Rinder et al. 2009), wurden diagnostische Testverfahren entwickelt, die auf dem Nachweis von Virus-RNA, Antigen oder Antikörpern basieren.

Labordiagnostische Techniken wie rRT-PCR, konventionelle RT-PCR, ELISA, Westernblot, Immunfluoreszenz sowie Immunhistochemie wurden bereits erfolgreich zur Diagnose einer Infektion mit ABV eingesetzt. Diese Verfahren

sind mit Ausnahme der Immunhistochemie nicht invasiv und können auch *intra vitam* mit klinischem Material aus Blut, Kropfabstrich, Kloakenabstrich oder Kot durchgeführt werden.

RNA-Nachweise mit L (L-Polymerase), M (Matrix) oder N (Nukleoprotein) als Zielgen gelangen sowohl mit Organmaterial aus Gehirn, Kropf, Herz, Leber, Magen-Darm-Trakt und Niere als auch mit Proben vom lebenden Tier aus Kloakentupfern, Kot und Blut. Positive Ergebnisse konnten mit diesem klinischen Material sowohl mittels konventioneller RT-PCR als auch mittels rRT-PCR verzeichnet werden (Honkavuori et al. 2008; Kistler et al. 2008; De Kloet und Dorrestein 2009; Enderlein et al. 2009; Rinder et al. 2009). In Organmaterial konnte Virus-RNA in höheren Mengen nachgewiesen werden und dies teilweise auch bei negativen Ergebnissen in der untersuchten Blut- und Kotprobe (Rinder et al. 2010a). Das von Honkavuori et al. (2008) entwickelte Realtime-PCR-Protokoll ist im Vergleich zu den existierenden konventionellen PCR-Protokollen zwar sehr sensitiv und kann auch geringe Mengen an RNA nachweisen, erkennt jedoch nur Genotyp 4 (Rinder, persönliche Mitteilung).

In serologischen Tests konnten Virus-Antikörper mit ABV-P und ABV-N als Antigen nachgewiesen werden (De Kloet et al. 2009; Adrian et al. 2010; Villanueva et al. 2010). Ein ELISA mit rekombinantem ABV-N-Protein als Antigen erlaubte die sichere Unterscheidung von mittels PCR bestätigten infizierten und nicht-infizierten Papageienvögeln und war auch zum Screenen von Papageienbeständen geeignet (Adrian et al. 2010). Von mehreren Arbeitsgruppen wurde aber auch das gelegentliche Auftreten diskrepanter Ergebnisse beschrieben. So wurden Antikörper mittels ELISA, Westernblot oder Immunfluoreszenz aber auch bei Vögeln detektiert, deren PCR-Untersuchungen negativ ausfielen oder umgekehrt (Rinder et al. 2009, 2010a; Villanueva et al. 2010). Ursachen dafür sind derzeit noch unklar. Zur Erzielung einer hohen Nachweis-Sicherheit sollte man beim lebenden Tier deshalb Antikörper-Nachweise mit RNA-Detektion kombinieren (Rinder et al. 2011).

Herzog et al. (2010) gelang mittels indirekter Immunfluoreszenz die Darstellung und Detektion ABV-spezifischer Antikörper bei 35 von 77 Vögeln ohne klinische PDD-Symptome aus einem Bestand mit einer PDD Vorgeschichte. ABV-spezifische Serumantikörper konnten in Serum und Virus-RNA in Kloaken- und Kropftupfern der Psittaziden nachgewiesen werden. In der RT-PCR und rRT-PCR lag der Nachweis von ABV-RNA in diesen 77 Tieren bei 36%. Besonders war,

dass bei 34% der Tiere ohne RNA-Nachweis mittels IIFA (Indirect immunofluorescence assay) ABV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten. Auch mit dieser Untersuchung kam man zu dem Ergebnis, dass eine Kombination aus Antikörperanalyse und RNA-Nachweis eine zuverlässige Methode zur Diagnose einer Infektion mit ABV darstellt.

Mittels Immunhistochemie und Nachweis von viralem N-Protein wurde Virusantigen in verschiedenen neuronalen und extraneuronalen Geweben nachgewiesen. ABV zeichnet sich also durch einen ausgeprägten Gewebstropismus aus. Es ist allerdings nicht bekannt, inwieweit dieses Phänomen an der Pathogenese der PDD beteiligt ist (Kistler et al. 2008; Ouyang et al. 2009; Rinder et al. 2009; Weissenböck et al. 2009a; Löffler et al. 2010).

1.4 Pathologie und Histologie

Bei an PDD erkrankten und verstorbenen Vögeln zeigen sich in der Sektion typischerweise dilatierte Drüsenmägen mit papierdünner Wand und massiver Futteransammlung. Der stark vergrößerte Drüsenmagen nimmt einen Großteil der Leibeshöhle ein. Seine Wand kann zudem stellenweise ulzeriert sein. Eine plötzliche Ruptur mit Erguß in die Peritonealhöhle kann vorkommen (Shivaprasad et al. 1995; Berhane et al. 2001; Rinder et al. 2010b). Ein mit Futter angefüllter Oesophagus und/oder Kropf kann bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung ebenfalls häufig beobachtet werden (Turner 1984; Phalen 1986; Berhane et al. 2001). Nicht selten werden bei an PDD erkrankten Patienten neben der Erweiterung des Drüsenmagens auch eine Dilatation des Muskelmagens (möglich durch eine atrophierte Magenwand) und des Dünndarms festgestellt. Die Muskelmagenwand zeigt sich in manchen Fällen atrophiert (Degernes et al. 1991; Shivaprasad et al. 1995; Berhane et al. 2001).

Histopathologisch typische Ergebnisse sind lymphoplasmazytäre Infiltrate besonders in autonomen Nervenplexen des Gastro-Intestinal-Traktes sowie in Nerven und Ganglien des zentralen und peripheren Systems (Mannl et al. 1986; Degernes et al. 1991; Berhane et al. 2001; Ritter 2007; Lierz et al. 2009; Ouyang et al. 2009). Neben dieser Ganglioneuritis zeigt sich als ein weiteres Merkmal häufig eine nicht eitrige Enzephalitis (Joyner et al. 1989; Berhane et al. 2001; Ritter 2007; Lierz et al. 2009). Außerdem konnten entzündliche Veränderungen in

den nervalen Anteilen von Herz, Nebenniere oder Leber beschrieben werden (Graham 1991; Cazayoux 1992; Shivaprasad 1993; Berhane et al. 2001; Ritter 2007; Ouyang et al. 2009; Weissenböck et al. 2009).

Schädigungen des Parenchyms unterschiedlicher Organe werden ebenso beobachtet. So wurde eine Myokarditis non purulenta, mononukleäre Infiltrate in der Nebenniere, Hepatitis, Cholangitis oder Leberläsionen dokumentiert (Joyner et al. 1989; Cazayoux 1992; Gregory et al. 1997c; Ritter 2007; Lierz et al. 2009; Gray et al. 2010).

Lymphoplasmazytäre Infiltrate in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes und Kropfes galten bisher als Goldstandard für die sichere Diagnose der PDD gegenüber anderen symptomähnlichen Erkrankungen. Biopsien dieser Gewebe v.a. des Kropfes am lebenden Tier sind allerdings sehr invasiv und besitzen nur eine maximale Sensitivität zwischen 66% - 76% hat (Doolen 1994; Gregory et al. 1996a; Rinder et al. 2010b).

1.5 Infektionsversuche

Da ABV erst seit 2008 als infektiöses Agens der PDD vermutet wird, wurden bisher nur wenige Infektionsversuche durchgeführt und publiziert. Bisher veröffentlicht wurden lediglich Infektionsversuche mit Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) (Gancz et al. 2009a; Payne et al. 2011; Piepenbring et al. 2011) und Felsensittichen (*Cyanoliseus patagonus*) (Gray et al. 2010), also zwei Vertretern der Ordnung Psittaciformes, und außerdem mit Khaki Campbell Enten (*Anas platyrhynchos*) (Gray et al. 2009) aus der Ordnung der *Anseriformes* und mit Haushühnern (*Gallus domesticus*) (Gancz 2009b) aus der Ordnung *Galliformes*.

In einer Infektionsstudie mit fünf Nymphensittichen wurden drei Vögel mit ABV4-Gehirnhomogenat eines an PDD erkrankten und verstorbenen Graupapageis infiziert. Zwei Vögel dienten als Kontrolle und wurden mit Gehirnhomogenat eines Vogels ohne ABV-Nachweis und PDD-Symptomatik inokuliert (Gancz et al. 2009a). Die Vögel stammten allerdings aus einem Bestand mit natürlichem ABV-2-Vorkommen. Ein dritter Kontrollvogel wurde, da bei ihm eine ABV-2-Infektion nachgewiesen wurde, aus dem Versuch ausgeschlossen. Die Virusapplikation erfolgte auf multiplen Wegen: intramuskulär, intraokulär,

intranasal und oral. Die Infektionsdosis ist nicht bekannt, es wurde lediglich das Applikationsvolumen mit 0, 2 ml (intramuskulär und oral) und einem Tropfen (konjunktival und nasal) angegeben. Diese Tiere wurden über 95 Tage beobachtet. Zwei der drei Sittiche entwickelten für PDD typische klinische Symptome. Der erste Vogel zeigte bereits 21 Tage nach der Inokulation Krankheitssymptome wie reduziertes Allgemeinbefinden, Gewichtsabnahme und nach 50 Tagen unverdaute Körner im Kot. Bei dem zweiten Vogel der Infektionsgruppe mit sichtbaren, klinischen Symptomen konnte ab Tag 31 eine Gewichtsabnahme sowie ein reduziertes Allgemeinbefinden beobachtet werden. Ab dem 85. Tag fanden sich auch bei ihm unverdaute Körner im Kot. Der dritte Vogel, der mit ABV 4 inokuliert wurde, entwickelte keine klinischen Anzeichen. Auch die beiden Kontrollsittiche waren klinisch symptomlos bezüglich einer PDD. In der pathologischen Untersuchung der beiden Sittiche mit offenen klinischen Symptomen zeigte sich die Pektoralmuskulatur atrophiert, der Drüsenmagen (mit papierdünnere Wand) und der Muskelmagen dilatiert und die Leber blass und verkleinert. Bei dem Vogel ohne Symptome war der Drüsenmagen nur leicht dilatiert. Bei den beiden Kontrolltieren wurden keine pathologischen Befunde dokumentiert. Histologisch fanden sich bei den drei Vögeln der Infektionsgruppe die für PDD typischen lymphoplasmazytären Infiltrate in den Ganglien und Nerven des Magen-Darm-Traktes sowie in der *tunica muscularis*. Diese Infiltrate zeigten sich in weiteren Organen (Herz und Gehirn). Außerdem wurden perivaskuläre Cuffs, also manschettenförmige zelluläre Gefäßumschlüsse im ZNS (Gehirn und Rückenmark) beschrieben. Die Kontrolltiere waren histologisch unauffällig. Virus-RNA konnte mittels RT-PCR, die auf das Zielgen N gerichtet war, an Tag 85 und 91 bei zwei Vögeln in Choanen- und Kloakenabstrichen nachgewiesen werden. Im Blut bei allen Vögeln und in Choanen- und Kropftupfern, die vom dritten Vogel der Infektionsgruppe entnommen wurde, konnte bis Tag 85 Virus-RNA nicht festgestellt werden. *Post mortem* wurde dann aber bei allen experimentell mit ABV infizierten Nymphensittichen in zahlreichen Organen Virus-RNA mittels RT-PCR und Virus-Antigen in immunhistologischen Untersuchungen nachgewiesen. Die Kontrollvögel waren negativ. Diese Untersuchungen stützen also sehr stark die Auffassung, dass es sich hier bei ABV tatsächlich um den Erreger der PDD handelt (Gancz et al. 2009a), allerdings mit der Einschränkung, dass es nicht sichergestellt war, dass die Vögel vor Versuchsbeginn völlig gesund und frei von potentiellen PDD-

Erregern waren, wie der Nachweis einer Infektion mit ABV-2 belegt.

Payne et al. (2011) führten ebenfalls einen Infektionsversuch mit Nymphensittichen durch. Vier Sittiche wurden durch intramuskuläre Injektionen und orale Applikation mit 8×10^4 ffu ABV-4 inokuliert, das in Entenfibroblastenkulturen hergestellt worden war. Zwei weitere Sittiche dienten als Kontrollgruppe und wurden mit uninfizierten Gewebekulturen inokuliert. Bis zum Tag 92 p. i., als ein Nymphensittich tot aufgefunden wurde, wurde bei den infizierten Vögeln keine Symptome festgestellt. Zwei der verbliebenen infizierten Vögel fielen ab Tag 110 p. i. durch neurologische Störungen in Form von Ataxien auf und waren unfähig sich fortzubewegen. An diesem Tag wurden diese drei Tiere euthanasiert. In der Sektion beobachtete man eine milde Dilatation der Drüsenmagen. Histopathologisch wurden ungewöhnlich massive und weit ausgebreitete Läsionen festgestellt. Diese beinhalteten starke lymphoplasmazytäre Infiltrate und lymphoide Knoten im Bereich der Ganglien und des Gastro-Intestinal-Traktes. Ähnliche Veränderungen zeigten sich im Nebennierenmark, Herz, Leber, Niere, Milz, Lungen, Pankreas, den Hoden und Ovarien. Im Laufe dieses Experiments stellte sich aber heraus, dass sich diese verwendeten Tiere bereits vor Versuchsbeginn auf natürlichem Weg mit ABV infiziert hatten. So hatten auch die beiden Kontrolltiere, euthanasiert an Tag 150 p. i. ohne klinische Symptome, in der pathologischen Untersuchung einen leicht dilatierten Drüsenmagen und in der Histologie milde Infiltrate in der Leber, Milz und Niere. Als Ursache für die ungewöhnlich vielen Organveränderungen bei den experimentell infizierten Nymphensittichen wurde die Hyperinfektion mit ABV-4 vermutet (Payne et al. 2011). Auch dieses Experiment stützt die Auffassung, dass ABV als Ursache für PDD anzusehen ist. Die bei der Studie von Gancz et al. (2009) gemachten Anmerkungen und Einschränkungen gelten jedoch auch hier. Auch bei diesen Vögeln ist die Vorgeschichte unbekannt und die Möglichkeit der Infektion mit anderen Erregern mit der Konsequenz der Entstehung einer PDD ist nicht auszuschließen.

Weitere Versuche mit Nymphensittichen wurden von Piepenbring et al. (2011) und Gregory et al. (2011) durchgeführt. Aus Kongressberichten sind hierzu nur wenige Informationen verfügbar. Piepenbring et al. verwendeten Virusmaterial aus Zellkultur und infizierten 18 Vögel *i.m.* und *p.o.*. Im Verlauf des Versuchs zeigten die Sittiche Krankheitssymptome einer PDD. Ferner konnte die Virusausscheidung zwischen Tag 19 und 72 *p.i.* durch ABV-Antikörpernachweis

und Virus-RNA-Nachweis belegt werden. Bei Gregory et al. (2011) fehlen detaillierte Angaben zum Infektionserfolg, Virusmaterial, Dauer, Nachweisen und Erkrankung der Nymphensittiche. Außerdem werden keine Angaben zu den Tierzahlen gemacht.

Ein weiterer Infektionsversuch wurde mit drei Felsensittichen durchgeführt (Gray et al. 2010). Diese Tiere stammten aus privaten Haltungen und waren für die Versuche zur Verfügung gestellt worden, ihre Vorgeschichte war also ebenfalls unbekannt. ABV wurde vor Versuchsbeginn nicht nachgewiesen, alle Vögel waren jedoch Dauerausscheider von Psittazinen Herpesviren. Zwei dieser Felsensittiche wurden durch intramuskuläre Injektionen und orale Applikation mit 8×10^4 ffu ABV-4, isoliert aus einem Gelbbrustara und in Entenfibroblastenkulturen vermehrt, infiziert. Der dritte Vogel wurde mit uninfizierten Fibroblastenzellen inokuliert. Ab Tag 60 nach der Infektion wurde Virus-RNA mittels RT-PCR in Kotmaterial und Antikörper mittels Westernblot ab Tag 33 *p.i.* nachgewiesen. Einer der Vögel verstarb an Tag 66 nach der Virusinjektion, der andere Sittich wurde an diesem Tag mit ausgeprägter klinischer PDD-Symptomatik, die nicht näher beschrieben wird, euthanasiert. Ob der verstorbene Vogel vor seinem Tod klinische Symptome entwickelte, wird nicht erwähnt. Bei der Sektion wurden eine Dilatation des Proventriculus und weitere PDD-typische Läsionen, zu denen genauere Angaben fehlen und histopathologisch für PDD typische Veränderungen wie lymphoplasmazytären Infiltraten im Verdauungstrakt (Drüsenmagen, Muskelmagen, Kropf, Dünndarm) nachgewiesen. Ferner zeigte ein Vogel Adrenalitis, Enzephalitis, Neuritis und Myocarditis. Im Gehirn und Rückenmark wurden multifokale Herde von Lymphozyten und Plasmazellen in neuronalem Gewebe sowie als perivaskuläre Manchetten gefunden. In Gehirnproben wurden zudem *p.m.* Virus-RNA nachgewiesen. Der Kontrollvogel wurde 77 Tage *p.i.* ohne klinische Symptome euthanasiert. Bei ihm wurden keine Anzeichen für eine Infektion mit ABV oder PDD festgestellt (Gray et al. 2010). Auch dieses Experiment stützt die Auffassung einer bedeutenden Rolle von ABV bei PDD, die Auswirkungen der Infektion mit einem anderen Virus (Herpes) auf den Organismus und den Immunstatus ist jedoch nicht einzuschätzen.

Neben diesen Infektionsversuchen mit Psittaziden existieren auch erste Experimente, die die Eignung von anderen Vögeln untersuchen. Gray et al. (2010) infizierten Khaki Campbell Enten, eine Kreuzung zwischen der Stock- und

Laufente, mit ABV4. Drei Gruppen mit je fünf vier Tage alten SPF-Entenküken wurden intramuskulär, intraokulär und/oder *per os* infiziert. Die Tiere blieben jedoch in acht Monaten klinisch symptomlos. Histopathologisch und pathologisch-anatomisch konnten keine Hinweise für eine PDD ermittelt werden. Offenbar wurden die Enten jedoch erfolgreich infiziert, denn, wie bei Hoppes et al. (2010) dargestellt wurde, gelang der Antikörpernachweis 12 Wochen *post infectionem* mittels Western Blot, der Nachweis von Virus-RNA durch RT-PCR aus Kot nach 20 Wochen (Hoppes et al. 2010).

Zudem existiert ein Abstract zu einem Infektionsversuch bei Haushühnern (Gancz et al. 2009). Dabei wurde den Vögeln Gehirnhomogenat, das schon erfolgreich bei der Infektion von Nymphensittichen verwendet worden war und ABV-4 eines an PDD erkrankten Graupapageis enthielt, intrazerebral inokuliert. Sie blieben jedoch klinisch symptomlos. ABV-Virus-RNA konnte zudem, wie sich später herausstellte (persönliche Mitteilung A. Gancz an M. Rinder, 8. August 2011) nicht nachgewiesen werden.

Die bisherigen Infektionsversuche belegen also eine Eignung von Psittaziden als Versuchstiere für Infektionen mit aviären Bornaviren und die Neuropathische Drüsenmagendilatation. Ein geeignetes Nicht-Psittaziden-Modell fehlt bisher allerdings noch, auf das zurückgegriffen werden könnte, um die Notwendigkeit von Experimenten mit Papageienvögeln zu reduzieren. Papageien besitzen ein hohes Maß an Intelligenz sowie ein differenziertes Kommunikations- und Sozialverhalten und möglicherweise daher auch eine ausgeprägte Leidensfähigkeit. Bei den von Gray et al. (2010) verwendeten Enten gelang offenbar eine Infektion mit ABV, aber nicht die Erzeugung eines klinischen Bildes der PDD, während Hühner sich nicht für Infektionsversuche mit ABV zu eignen scheinen.

2. Bornasche Krankheit

„Hitze Kopfkrankeheit der Pferde“, (Authenrieth 1813, zitiert nach Zwick 1939) „Nervenfieber“, „Subakute Meningoenzephalitis“ oder „Halbakute Gehirnentzündung“ (Wörz 1858, zitiert nach Heinig 1969) - einige der zahlreichen Synonyme für die heute als Bornasche Krankheit bekannte Virusinfektion, die sich klinisch hauptsächlich in mehr oder weniger stark

ausgeprägten Verhaltensänderungen wie Apathie, Schläfrigkeit, Stereotypie, Aggression, Erregung o.ä. und auch neurologischen Symptomen wie Paralyse und gestörter Propriozeption äußert (Sprankl et al. 1978; Rott und Becht 1995; Hallersleben et al. 1998; Uhlig und Kinne 1998; Richt und Rott 2001; Lipkin und Briese 2007; Algermissen 2010). Die BD (Borna disease) ist seit mehr als 200 Jahren bei Pferden und Schafen als eine virale Infektion des Zentralnervensystems bekannt, die sich histo-pathologisch als eine nicht-eitrige Polioenzephalomyelitis zeigt (Ludwig et al. 1985; Bode 1999; Lipkin und Briese 2007).

Der heutige Name dieser Erkrankung geht auf eine Epidemie in der Nähe der Stadt Borna in Sachsen zurück, die sich unter Pferden in den Jahren von 1894 bis 1896 ausbreitete. Auch später, bis 1940 kam es in dieser Region in periodisch wiederkehrenden Epidemien zu enormen Verlusten, die sich auf insgesamt mehr als 16000 Equiden summierten (Ludwig et al. 1985; Dürrwald et al. 1997; Ludwig et al. 2000; Dürrwald et al. 2005). In den letzten vier Jahrzehnten veränderte sich das Auftreten der Krankheitsfälle, vermutlich da die Zahl der gehaltenen Huftiere abgenommen hat und sich die Hygienebedingungen deutlich verbessert haben (Bode 1999). Seit 2011 besteht in Deutschland keine Meldepflicht mehr (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2011). Pferde und Schafe gelten als die natürlichen Wirte dieses Virus. Ein Auftreten der Erkrankung wird jedoch vereinzelt auch bei anderen Huftieren, Katzen, Kaninchen, Alpakas, Hunden und weiteren warmblütigen Tieren beobachtet (Altmann et al. 1976; Jaunin et al. 1978; Metzler et al. 1978; Bode et al. 1994a; Schüppel et al. 1994, 1995; Nakamura et al. 1999; Degiorgis et al. 2000; Ludwig et al. 2000; Lipkin und Briese 2007).

Experimentell lassen sich nahezu alle Tiere mit dem Virus infizieren, beispielsweise Nager und Primaten und wahrscheinlich auch Vögel. Das Maus- und das Rattenmodell haben sich jedoch in der experimentellen Forschung als Hauptmodelle etabliert (Kao 1985; Rott und Becht 1995; Stitz et al. 1995; Wille 2010).

Ein endemisches Vorkommen der Erkrankung wurde in Gebieten in Deutschland, Liechtenstein, Österreich und der Schweiz beschrieben (Suchy et al. 1997; Weissenböck et al. 1998; Caplazi et al. 1999; Stäheli et al. 2000). Ob die Bornasche Krankheit weltweit, also auch außerhalb dieser genannten Gebiete, vorkommt, wird kontrovers diskutiert (Matthias et al. 1954; Gosztonyi et al. 1984; Bilzer et al. 1995; Weissenböck et al. 1998; Dürrwald et al. 2006; Lipkin und

Briese 2007).

Umstritten ist auch ein Zusammenhang zwischen BDV und Schizophrenie und anderen psychischen Erkrankungen des Menschen, der aufgrund von Nachweisen von BDV-Antikörpern und Virus- RNA gefolgert wurde (Amsterdam et al 1985; Bechter et al. 1987; Kishi et al. 1995, 1996; Bode et al. 1996; Nakamura et al. 2000; Miranda et al. 2006; Lipkin und Briese 2007). Doch wurden solche Antikörper und positive PCR-Ergebnisse auch bei klinisch gesunden Menschen festgestellt. Möglicherweise handelt es sich hier um unspezifische Reaktionen oder Kreuzreaktionen bzw. um Kontaminationen mit Laborstämmen (Schwemmle et al. 1999; Richt und Rott 2001; Dürrwald et al. 2007).

2.1 Ätiologie

Joest und Degen erhielten durch den histopathologischen Nachweis intranukleärer Einschlusskörperchen bei an BD erkrankten Pferden erste Hinweise auf eine Virusätiologie (Joest und Degen 1909, 1911). Die nach ihnen benannten eosinophilen Einschlusskörperchen gelten als pathognomonisch für die Bornasche Krankheit und finden sich in den Neuronen des Hippocampus (Dürrwald und Ludwig 1997).

Weitere Hinweise auf eine Virusätiologie erbrachten Infektionsversuche, die bereits in den zwanziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts durchgeführt wurden. Über bakterienfreies Gehirnhomogenat eines erkrankten Pferdes konnte BD auf ein Kaninchen übertragen werden. Nach mehreren Passagen in Kaninchen wurde das gewonnene Material erneut erfolgreich für die Infektion eines Pferdes verwendet und dieses Pferd erkrankte an BD (Zwick und Seifried 1925; Zwick und Seifried 1927). Nachfolgend gelangen weitere experimentelle Transmissionen auch bei Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Rhesusaffen, Hühnern (hierzu ausführlicher Kapitel 2.5), Schafen und Pferden (Heinig 1969; Danner 1982; Rott und Brecht 1995; Dürrwald und Ludwig 1997; Richt et al. 1997; Katz et al. 1998). Nager sind bis heute wichtige Versuchsobjekte der experimentellen Bornaforschung (Ludwig et al. 1988; Stitz et al. 1995; Dieckhöfer 2006; Werner-Keiss 2006; Wille 2010).

2.1.1 Borna-Disease-Virus

Bei dem Erreger der Bornaschen Krankheit handelt es sich um ein behülltes Virus mit einzelsträngigem, unsegmentiertem, linearem RNA-Genom von negativer Polarität (Briese et al. 1992; Richt et al. 1993; Cubitt und de la Torre 1994; Schneemann et al. 1995; Pringle 1996; Lipkin und Briese 2007). Das BDV war bis vor einiger Zeit innerhalb der Ordnung Mononegavirales der einzige Vertreter der 1996 neu eingeführten Familie der Bornaviridae (Pringle 1996), da es genetische und biologische Unterschiede zu den anderen NNS-RNA-Viren zeigte. In den 20er Jahren des vorangegangenen Jahrhunderts wurde bereits eine Virusätiologie vermutet, indem bakterienfreie Gehirnsuspensionen auf Kaninchen übertragen wurden (Zwick und Seifried 1925). Durch Filtrationsstudien und Elektronenmikroskopie konnte eine Partikelgröße von 85-125nm (Elford und Galloway 1933; Compans et al. 1994; Kohno et al. 1999) ermittelt werden. Die Empfindlichkeit gegenüber Detergentien und UV-Strahlen zeigte, dass ein behülltes Virus vorliegen muß (Heinig 1969; Ludwig et al. 1985).

Die Unterschiede von BDV in der Replikation und der Splicing-Maschinerie bei der Umsetzung der genetischen Information (Briese et al. 1992; Cubitt et al. 1994; Schneider et al. 1994b) gegenüber den anderen Mononegavirales führte dazu, dass im Jahre 1996 eine Klassifizierung in eine eigene Virusfamilie vorgenommen wurde, die Bornaviridae (Pringle 1996). Ultrastrukturelle Analysen offenbarten sphärische Virionen von ca. 70-130nm Größe (Zimmermann et al. 1994a; Kohno et al. 1999) mit einem 50-60nm großen, elektronendichten Kern und einem helikalen Nukleokapsid von 4nm Breite. Eine äußere Membran weist spike-ähnliche Projektionen mit 7nm Länge auf (Kohno et al. 1999; Lipkin und Briese 2007).

Mit einer Größe von 8,9kb besitzt das BDV das kleinste Genom unter den Mononegavirales. Die genomische RNA entspricht in ihrer Organisation den anderen Vertretern dieser Ordnung (Algermissen 2010).

Ein Unterschied ist die Lokalisation der Transkription und Replikation, die im Zellkern stattfindet (Pyper et al. 1998). Im Vergleich zu den anderen NNS-RNA-Viren weist das BDV zudem ungewöhnliche Transkription- und Replikationsmechanismen auf. Von nur drei Transkriptionseinheiten können mindestens sechs Proteine exprimiert werden (Richt et al. 2007). Überlappende Frames (sechs offene Leserahmen), read through und alternatives Spleißen zählen

auch zu diesen Mechanismen (Schneemann et al. 1995; de la Torres 2002; Lipkin und Briese 2007; Algermissen 2010). Bei diesen sechs Proteinen handelt es sich um ein Phosphoprotein, ein Nukleoprotein, ein Matrixprotein, ein X-Protein, ein Glykoprotein sowie ein Large-Protein.

Übertragungswege und Infektionsrouten sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Richt und Rott 2001; Lipkin und Briese 2007). Experimentelle Untersuchungen lassen aber vermuten, dass die natürliche Übertragung sich entweder rhinogen über das olfaktorische Neuroepithel ereignet (Morales et al. 1988; Sauder und Stäheli 2003) oder oral mit neuronalaszendierter Route über den Nervus trigeminus erfolgt (Bilzer et al. 1996). Von dort erfolgt die Migration wahrscheinlich in das limbische System und im weiteren Verlauf die Dissemination in das gesamte ZNS, das periphere Nervensystem und auch in die Retina (Krey et al. 1979; Narayan 1983; Ludwig et al. 1985; Lipkin und Briese 2007).

Vermutlich findet eine horizontale Übertragung über Nasensekret, Konjunktivalflüssigkeit, Speichel und Urin statt (Zwick und Seifried 1927; Gosztanyi und Ludwig 1995; Sauder et Stäheli 2003). Eine vertikale Transmission wurde bisher nicht eindeutig nachgewiesen (Hagiwara et al. 2000).

2.2 Klinik

Die Inkubationszeit nach einer Infektion mit Bornaviren ist nicht genau bekannt. Sie liegt vermutlich zwischen zwei Wochen bis zu einigen Monaten (Schmidt 1952; Lipkin und Briese 2007). Das klinische Bild der BD bei natürlicher Infektion ist hauptsächlich durch Störungen im Sensorium und nachfolgender ZNS-Symptomatik gekennzeichnet (Ludwig et al. 1985; Bode 1999; Richt und Rott 2001; Algermissen 2010; Wille 2010).

Der Verlauf ist meist biphasisch mit einer akuten und einer chronischen Phase (Nitzsche 1963; Narayan et al. 1983a; Wille 2010). Bei Pferden kann es zu einer perakuten, akuten oder subakuten BD mit Meningoenzephalomyelitis kommen (Zwick 1939; Heinig 1969; Ludwig et al. 1985; Dürrwald und Ludwig 1997; Wille 2010).

Zu Beginn der Erkrankung zeigen sich eher unspezifische Anzeichen im Verhalten wie Stupor, Somnolenz, verlangsamte und verminderte Futteraufnahme,

Leerkauen, Kopfbewegungen, Gähnen, Fieberschübe u.ä. – dies v.a. bei Pferden (Ludwig et al. 1993; Uhlig und Kinne 1998; Dieckhöfer et al. 2004; Algermissen 2010), desweiteren lassen sich v.a. bei Nagern Aggression, Desorientierung, Hyperaktivität, Überreaktionen, Priapismus und Obesitas beobachten (Narayan et al. 1983a; Kao 1985; Ludwig et al. 1985; Lipkin und Briese 2007).

Im weiteren Krankheitsverlauf treten zudem neurologische Ausfallerscheinungen wie Paresen, Paralysen, Opisthotonus, Koordinations- und Propriozeptionsstörungen auf (Narayan et al. 1983a; Ludwig et al. 1993; Lipkin und Briese 2007; Werner-Keiss 2010). Im Endstadium kann es zudem zu Festliegen, Torticollis, Manegebewegungen, Kachexie, Exsikkose und auch Erblinden kommen (Narayan et al. 1983b; Hiepe 1958; Ludwig et al. 1985; Biesenbach et al. 1990; Bode et al. 1994; Dieckhöfer et al. 2004).

Bei einigen Tierarten, z.B. bei Mäusen, Hamster, Ratten oder Tupaias, verläuft die Erkrankung asymptomatisch und als persistierende Infektion (Anzil et al. 1973; Kao 1985; Ludwig et al. 1985; Herzog et al. 1991, 1994; Hallensleben et al. 1998; Grabner et al. 2002; Richt et al. 2007; Wille 2010). Betroffen und infizierbar sind junge und alte Tiere verschiedenster Spezies, wobei sich jedoch erhebliche tierartliche und altersbedingte Unterschiede in Verlauf und Ausprägung der BDV-Infektion und ihrer Symptome beobachten lassen (Ludwig et al. 1985; Grabner und Fischer 1991; Bode 1999; Lipkin und Briese 2007). Mäuse und Hamster sind meist klinisch unauffällig, wohingegen z.B. Rhesusaffen, Ratten, Kaninchen und Huftiere unter ausgeprägten neurologischen Störungen leiden (Narayan et al. 1983a; Rott und Becht 1995; Stamer 2002). Infizierte Spitzhörnchen präsentieren anormales Sozialverhalten (Sprankel et al. 1978).

2.3 Diagnostik

Zum Nachweis von Infektionen mit BDV existieren eine Reihe unterschiedlicher Testverfahren. Ein allseits akzeptierter Goldstandard konnte allerdings noch nicht festgelegt werden, und auch heute noch gilt die Diagnose als problematisch. In der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts basierte die Diagnostik ausschließlich auf histologischen Untersuchungen des Gehirns verstorbener Tier mit Nachweis der charakteristischen Joest-Degenschen Einschlußkörperchen (Joest und Degen

1909, 1911; Bode 1999).

Für die serologische Untersuchung wurde ein ELISA zum Nachweis von N- und P-Protein über monoklonale Antikörper entwickelt (Bode et al. 1990; Bode et al. 1994b; Bode 1999). Außerdem steht ein Triple ELISA zum Nachweis BDV-spezifischer Immunkomplexe im Blut zur Verfügung (Bode et al. 2001; Dieckhöfer et al. 2004). Die Spezifität dieses Tests ist allerdings umstritten (Stäheli et al. 2000).

Eine weitere Methode zum Antikörpernachweis ist die Immunfluoreszenz. *Intra vitam* kann eine Diagnose durch das gleichzeitige Vorkommen von Antikörpern gegen das Virus im Serum und der Cerebrospinalflüssigkeit, durch eine Serokonversion oder einen Anstieg des Titers um drei bis vier Titerstufen im indirekten Immunfluoreszenztests gestellt werden (Grabner et al. 2002; Reichelt 2009). Mit immunhistologischen Methoden können BDV-spezifische Proteine nachgewiesen sowie Astroglionen beurteilt werden (Wagner et al. 1968; Bode 1990; Herden et al. 2000; Werner-Keiss et al. 2008; Algermissen 2010).

Über den Nachweis von virusspezifischer RNA mit der RT-PCR oder *In-situ*-Hybridisierung sowie durch Virusisolierung in der Zellkultur kann die Diagnose BD an Gehirnmaterial gesichert werden. Zur Ermittlung von Virus-RNA aus Gewebe wird häufig die *In-situ*-Hybridisierung herangezogen. Um positiv orientierte RNA, also die mRNA des Virus nachzuweisen, können komplementäre antisense-Sonden benutzt werden. Diese Sonden charakterisieren sich dann durch eine Spezifität für die mRNA der sechs verschiedenen BDV-Proteine (Gröters et al. 2005; Werner-Keiss et al. 2008; Algermissen 2010). Als weitere Methode zum RNA-Nachweis ist die nested RT-PCR (= geschachtelte PCR) gebräuchlich und seit 1994 diagnostisch verfügbar (Zimmermann et al. 1994b; Vahlenkamp et al. 2000).

Der Nachweis von BDV kann auch über Virusanzucht in Zellkulturen versucht werden. Dabei werden Gehirnzelllinien, Nieren- und Hautzelllinien verschiedener Spezies verwendet. Diese Methode ist aber sehr arbeitsaufwendig und wenig sensitiv. Ein negatives Ergebnis schließt also BD nicht mit hoher Wahrscheinlichkeit aus (Amsterdam et al. 1993; Bode 1999).

2.4 Histopathologie

Da es sich bei BDV um eine Erkrankung mit strengem Neurotropismus handelt, finden sich histopathologische Veränderungen vor allem im zentralen Nervensystem und in der Retina (Ludwig 1995; Rott und Becht 1995; Richt et al. 2000, 2007). Histologisch kennzeichnend ist eine schwere, nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis, die durch das Auftreten von perivaskulären und parenchymatösen Infiltraten aus T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen charakterisiert ist (Denschl et al. 1990; Planz et al 1993; Bilzer et al. 1994, 1995; Lipkin und Briese 2007).

Degenerative Prozesse in neuronalem Gewebe bis hin zu einem *Hydrocephalus internus* können sich im Laufe der Erkrankung entwickeln (Narayan et al. 1983a). Häufig finden sich histologische Hinweise auf eine mononukleäre Retinitis. Ferner können Zerstörungsprozesse an Pigmentepithel und Photorezeptoren mit folgender Retinaatrophie beschrieben werden (Krey et al. 1979; Narayan et al. 1983b; Geiss et al. 1990; Kacza et al. 2000).

Zusätzlich zu den entzündlichen Infiltraten sind in der Histologie eosinophile intranukleäre Strukturen, die sogenannten Joest-Degen'schen Einschlusskörperchen, in den mit BDV infizierten Zellen zu finden. Sie gelten als pathognomonisch für diese Infektion. Dabei handelt es sich um Virusproteine (Joest und Degen 1909; 1911).

2.5 Infektionsversuche

Wie bereits dargestellt, ist das Wirtsspektrum des BDV sehr breit. Dies spiegelt sich auch im Spektrum an verwendeten Tierarten bei experimentell induzierten Infektionen wider.

Die erste experimentelle Infektion wurde von Zwick und Seifried (1925) beschrieben. Dabei wurde Gehirnhomogenat aus einem an BD erkranktem Pferd Kaninchen verabreicht und eine Erkrankung induziert. Auf diese Weise wurde ein Hinweis für eine Virusätiologie der Bornaschen Erkrankung geliefert.

In weiteren Infektionsversuchen konnten Bornaviren über intrazerebrale oder intranasale Applikation auf verschiedene Warmblüter erfolgreich übertragen werden. Zu diesen Versuchstieren zählen u.a. Nager wie Hamster (Anzil et al.

1973), Meerschweinchen und Kaninchen (Zwick und Seifried 1925; Krey et al. 1979), Mäuse (Kao et al. 1984; Rubin et al. 1993; Hallensleben et al. 1998) und Ratten (Nitzschke 1963; Hirano et al. 1983; Narayan et al. 1983a; Kao et al. 1985; Stamer 2002; Dieckhöfer 2006) sowie Spitzhörnchen (Sprankel et al. 1978), und Rhesusaffen (Zwick 1939).

Auch bei Vögeln wie *Gallus gallus domesticus*, *Coturnix coturnix* und *Struthio camelus* wurden experimentelle Infektionen durchgeführt (Zwick und Seifried 1927; Gosztonyi et al. 1983; Ludwig et al. 1985, 1988; Ashash et al. 1996), die teilweise erfolgreich waren, d.h., dass nach Inokulation von Virusmaterial in den Organismus vermehrt Ataxien, sensomotorische Ausfallerscheinungen bis hin zu Lähmungen auftraten (Ludwig et al. 1985). Bereits Zwick, Seifried und Witte (1927) konnten durch interzerebrale Injektion mit Gehirnemulsion gewonnen aus einem an BD verstorbenem Pferd bei zwei Hühnern nach vier Wochen Krankheitserscheinungen wie taumelnder Gang, Ataxie und Einknicken der Extremitäten feststellen, die denen bei an BV erkrankten Kaninchen auftretenden Symptome sehr ähnlich waren. Makroskopische waren keine Veränderungen zu sehen, histologisch sah man jedoch im Gehirn eine diffuse Enzephalitis mit Gefäßbeteiligung. Eine erfolgreiche Übertragung von BDV auf Hühner aus diesen Versuchen allerdings ist nicht eindeutig zu folgern und eine Beteiligung anderer Krankheitserreger ist nicht auszuschließen, da es sich bei dem injizierten Material nicht um reines Virusmaterial handelte. Nicolau und Galloway (1936) versuchten, Hühner durch intrazerebrale Injektion mit einer Emulsion aus Gehirnmateriale eines infizierten Tieres und Flüssigkeit zu infizieren, konnten jedoch weder Krankheitssymptome noch pathologische oder histologische Veränderungen nachweisen. Ebenso gelang es auch Alkewitz (1939) im Rahmen seiner Dissertation nicht, die Bornasche Krankheit der Pferde auf Hühner zu übertragen. In zwei Versuchsreihen infizierte er insgesamt 20 Hühner intrazerebral (acht Tiere), intraneural (sechs Tiere), intraperitoneal (zwei Tiere), subkutan (zwei Tiere) oder intramuskulär (zwei Tiere) mit Gehirnemulsion. Diese Gehirnemulsion bestand aus pulverisiertem Gehirnmateriale aus einem Bornakaninchen, das in einem sterilen Mörser mit Hilfe steriler physiologischer Kochsalzlösung in einer Verdünnung von etwa 1:20 hergestellt worden war. Die histologischen Untersuchungen ergaben in keinem Fall die für die Bornasche Krankheit typischen Veränderungen. Lähmungserscheinungen, die sich bei 12 Tieren zeigten, deuteten auf die Mareksche Hühnerlähme hin (Alkewitz 1939). In

den fünfziger Jahren wurde über Wechsellpassagen zwischen Kaninchen und embryonierten Hühnereiern das BDV erfolgreich übertragen (Rott und Nitzschke 1956). Bei Eintagsküken (Ludwig et al. 1973; Gosztonyi et al. 1983) und jungen Wachteln (Ludwig nicht veröffentlicht in: Ludwig et al. 1985) ließen sich persistierende Infektionen experimentell auslösen. Im fortgeschrittenen Alter erkrankten Hühner häufiger in der Herde, in der Einzelhaltung klangen die Symptome wie Ataxien und weitere sensomotorische Ausfallerscheinungen ab oder verschwanden komplett. Ludwig et al. (1985) vermuten deshalb, dass die Stressoren in der Herde krankheitsbegünstigend wirken. Bei diesen Hühnern konnte man im Serum nach Besserung einen deutlichen Anstieg von Antikörpern nachweisen (Ludwig et al. 1985).

In einer Untersuchung über die Todesursachen von jungen Straußenvögeln in Israel wurden Daten aus fünf Jahren (1989-1993) ausgewertet. Neben Extremitätendeformationen und Gastroenteritis wurde ein Parese-Syndrom mit unspezifischen sensomotorischen Ausfallerscheinungen als häufige Todesursache beschrieben (Ashash et al. 1996). Untersuchungen ergaben in der Immunfluoreszenz eine für BDV charakteristische granuläre-nukleäre Fluoreszenz. In Infektionsstudien mit 21 fünf Wochen alten Tieren wurde Gehirnhomogenat, gewonnen aus zwei mit Parese-Syndrom verstorbenen Vögeln, intramuskulär und oral inokuliert. Bei sieben Tieren konnten diese Pareseerscheinungen ausgelöst werden (Ashash et al. 1996). Ob diese Erkrankungen aber tatsächlich durch BDV ausgelöst wurden, wurde nicht sicher konstatiert.

Ratten werden häufig für experimentelle Infektionen mit BDV verwendet. Wenn adulte Lewis-Ratten im Alter von vier bis sechs Wochen mit einem Wildtyp-Virus infiziert werden, verhalten sich die Tiere drei Wochen *p.i.* in der akuten Phase hyperaktiv, aggressiv, schreckhaft und bewegungsgestört (Narayan et al. 1983a). Die folgende chronische Phase kennzeichnet sich durch permanent hohe Viruslast im ZNS und eine Reduzierung der typischen Infiltrate (Ludwig et al. 1988; Gosztonyi et al. 1991) sowie mit Symptomen wie Apathie und Somnolenz (Narayan et al. 1983a).

Hausmann et al. (1999) und Hallensleben et al. (1998) etablierten zur Erforschung der krankheitsinduzierten Immunantwort ein Maus-Modell. Mäuse zeigen keine oder nur schwach ausgeprägte ZNS-Symptomatik, wenngleich sich hohe Virustiter erzeugen lassen. Neu an diesen Infektionsversuchen an Mäusen war,

dass bereits Neugeborene mit BDV infiziert wurden, wobei sich zeigte, dass verschiedene Mausstämme unterschiedliche Empfindlichkeit und Empfänglichkeit gegenüber Bornaviren haben (Hallensleben et al. 1998; Hausmann et al. 1999).

3. Die Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*)

Bei der Wachtel handelt es sich um einen kleinen fasanenartigen Hühnervogel, der nicht nur weltweit mit verschiedensten wild lebenden Formen vertreten ist (Raethel 2006), sondern auch als Zucht- und Hauswachtel gehalten wird. Die Japanwachtel (*Coturnix coturnix japonica*) ist die am meisten verbreitete und gezüchtete Wachtel.

In den sechziger Jahren entdeckte man die Wachtel als Versuchstier bzw. als Modelltier (Vogt 1964; Köhler 2008) v.a. für Nutzgeflügel in den verschiedensten biomedizinischen, biologischen und veterinärmedizinischen Fachrichtungen. Als Nebenprodukt ergaben sich dabei gleichzeitig zahlreiche Erkenntnisse für die wissenschaftlich orientierte Wachtelhaltung, die auch weiterhin aktuell und grundlegend sind.

3.1 Biologie und Ökologie

Zoologisch gesehen sind Wachteln der Unterfamilie der Feldhühner (Perdicinae) zuzuordnen, die sich innerhalb der Familie der Fasanenartigen (Phasianidae) befindet. In der Klasse der Vögel sind die Fasanenartigen eine von sieben Familien in der Ordnung der Hühnervögel (*Galliformes*).

In der Unterfamilie der Feldhühner ist die Wachtel als Art (*Coturnix coturnix*) einzuordnen, zu deren Unterarten die Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) gehört (Scholtyssek 1987; Bauer et al. 2005; Kiwitt 2006; Köhler 2008).

Die Vertreter dieser Art charakterisieren sich neben ihrer geringen Größe durch eine rundliche Gestalt, einen sehr kurzen, aus acht bis zwölf Federn bestehenden und von den langen Schwanzfedern bedeckten Schwanz und durch lange spitze Langstreckenflügel sowie kurze, kleine Schnäbel und sporenlose Ständer (Raethel 1988, 2006; Peterson et al. 2002; Köhler 2008).

Die Japanwachtelhähne sind orangebraun, besitzen einen schwarzen Kehlkopf und ein weißes Halsband sowie ein variierendes Kopfmuster. Die Hennen sind den Männchen ähnlich, wobei das Kopfmuster weniger ausgeprägt und die Färbung sandbraun ist. Sowohl Hähne als auch Hennen haben einen kleinen und gebogenen Schnabel. Die Größe dieser Wachteln beträgt etwa 15 bis 20 Zentimeter.

Der typische Ruf, den der Hahn von sich gibt, ist ein dreisilbiges `Pick-Wer-Wick`, meist in der Dämmerung zu hören. Der Ruf des Weibchens hört sich hingegen eher wie ein Quaken an (Köhler 2008).

Die Wildform der Japanischen Wachtel stammt aus Japan, Korea und den nordwestlich angrenzenden Gebieten. In kälterer Jahreszeit erfolgt ihr Rückzug in wärmere Gebiete Südasiens und Nordafrikas (Raethel 1988; Köhler 2008). Habitate sind Grasland, niedriges Gestrüpp in Ufernähe oder grasdichte Küstengebiete.

Die Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) wird seit dem 14. Jahrhundert in Obhut des Menschen als Ziervogel gehalten, anfänglich nur als „Singvogel“, ab dem 17. Jahrhundert schätzte man auch das Fleisch. Seit etwa 100 Jahren ist die Zucht auf eine hohe Legeleistung ausgerichtet (Raethel 2006).

Zu Beginn ihrer kommerziellen Nutzung war die Japanische Wachtel eine reine Legewachtel, die sich durch eine hohe Legeleistung mit einem Körpergewicht von 110-150g und einem Eigewicht von 9-11g auszeichnete. Diese aus den sechziger Jahren stammende Form wird heute als „leichte Linie“ bezeichnet und vornehmlich im Forschungsbereich eingesetzt.

Später wurde dem Schlachtkörper mehr Aufmerksamkeit gewidmet. So entstand die heute fast ausschließlich gehaltenen Rasse `Mast- und Legewachtel` (Zweinutzungstyp) mit einem Gewicht von 160-250g und einem Eigewicht von 12-14g, mit ausgeprägter Legeleistung (Bernhardt und Kühne 2007) sowie als eine weitere Rasse die Fleischwachtel mit einer Körpermasse von bis zu 400g. Die Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) ist die Stammform aller Rassen der Lege- und Mastwachtel.

In der gewerblichen Haltung ist Intensivhaltung auf Drahtrosten mit einer Besatzdichte von 50 bis zu 100 Tiere/m² üblich. In der Hobbyhaltung werden die Vögel meist extensiv in Volieren in Bodenhaltung, auch als Nebenbesatz auf dem Boden neben anderen kleinen Vögeln und in großen Käfigen gehalten (Kiwitt 2006; Bernhardt und Kühne 2007).

3.2 *Coturnix coturnix japonica* als Versuchstier

Seit Mitte der fünfziger Jahre ist die Japanische Wachtel als Versuchstier in vielen amerikanischen Universitäts- und Industrielaboren verbreitet. Im europäischen Raum wurde sie ab 1960 als Modell- und Labortier verwendet und hat bis heute in zahlreichen Forschungsbereichen nicht an Bedeutung verloren (Zucker et al. 1968; Huss et al. 2008; Köhler 2008).

Ihre Verwandtschaft zum Haushuhn, *Gallus gallus domesticus*, führt dazu, dass sie für die Verwendung in der Geflügelforschung in sehr vielen Fällen geeignet ist. Vorteile liegen in den günstigen Haltungsbedingungen, der geringen Größe der Wachtel und dem daraus folgenden geringen Platzanspruch und Futterbedarf. Die schnelle Embryonalentwicklung und die frühe Geschlechtsreife lassen es zu, bei intensiver Haltung bis zu fünf Generationen im Jahr nachzuziehen. In der Regel erhält man drei bis vier Generationen und hat dann auch die Möglichkeit einer gezielteren Selektion (Vogt 1968; Huss et al. 2008; Köhler 2008).

Einsatz als Versuchstier findet die Wachtel vor allem bei Untersuchungen zu allgemeinen Fragen der Zucht, Haltung, Brut und Ernährung. Sie steht aber auch der Genetik und Studien zur Fortpflanzung, Endokrinologie, Immunologie, Ophthalmologie, Pharmakologie und Toxikologie zur Verfügung (Zucker et al. 1968; Eller 1971; Ichilcik et al. 1978; Lauber und Cheng 1989; Lauber et al. 1989; Huss et al. 2008, Varkoohi et al. 2011). Auch in der aktuellen Virus- und Tumorforschung findet die Japanwachtel vielfältige Verwendung (Robey et al. 1982; Chambers et al. 1986; Salter et al. 1999; Jeong et al. 2009; Giannecchini et al. 2010; Wakenell 2010). Ferner wurden diverse Wachtelzelllinien aus der Wachtel erzeugt (z.B. CEC-32, Qt-35, Cu447/Cu48), die für *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen dienen (Colwell et al. 1974; Farrow et al. 1975; Sabran et al. 1979; Zöllner et al. 2000).

3.3 Erkrankungen

Die häufigsten Verluste in der Wachtelhaltung treten wohl durch Kannibalismus und Legenot auf (Lölinger und Schubert 1967; Köhler 2008). Der Kannibalismus ergibt sich aus störenden Umweltfaktoren, meist bedingt durch defizitäres Management, ein genetisch durch Einkreuzung bedingtes Verhaltensproblem

einzelner Tiere oder aus offenen Verletzungen, die das Picken der anderen auslösen (Köhler 2008). Die Legenotproblematik erklärt sich in vielen Fällen durch die Anatomie und ein zu großes Verhältnis von Ei- zu Körpergewicht (Köhler 2008).

Desweiteren treten auch bakterielle, parasitäre, mykotische und viral bedingte Krankheiten auf (Bernhardt und Kühne 2007; Köhler 2008). Durch mangelnde Hygiene kann es zu Kontaminationen und Infektion kommen. Salmonellose, Kokzidiose oder Wurmbefall (z.B. *Capillaria*; *Syngamus*) werden häufig beschrieben (Bernhardt und Kühne 2007; Köhler 2008). Auch können hohe Verluste durch Aspergillose, die meist durch verdorbenes Futter ausgelöst wird, auftreten (Köhler 2008).

Die ulzerative Enteritis, auch als 'Wachtelkrankheit' bezeichnet, ist eine durch Clostridien ausgelöste Magen-Darm-Erkrankung (Kaleta und Heffels-Redmann 2005; Bano et al. 2008; Köhler 2008; Shivaprasad et al. 2008), die bestandsweise auftreten kann.

Gelegentlich treten Fälle von Viruserkrankungen auf, wie die Leukose, ausgelöst durch Retroviren (Köhler 2008), die Wachtelbronchitis, deren Ursache CELO-Viren sind (Adenoviren), die aviäre Encephalomyelitis, ein Picornavirus (Jack et al. 1994; Köhler 2008) oder auch die durch Herpesviren verursachte Marek'sche Krankheit (Pennycott et al. 2003; Köhler 2008).

3.4 Experimentell induzierte Erkrankungen

Seit den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts werden juvenile und adulte Wachteln zu Forschungszwecken experimentell mit Erregern infiziert, so dass eine Vielzahl von Veröffentlichungen vorliegt. Im Folgenden sollen nur einige exemplarisch angeführt werden.

Die Wachtel wurde beispielsweise erfolgreich für Studien zu bakteriellen Infektion mit *Campylobacter jejuni* (Misawa et al. 1996), *Chlamydia psittaci* (Takashima et al. 1996), Borrelien (Bishop et al. 1994; Isogai et al. 1994), *Pasteurella multocida* (Glisson et al. 1989), Coxiellen (Schmatz et al. 1977), Mycoplasmen (Koshimizu et al. 1982) oder auch *Mycobacterium avium* (Holejsovsky und Svoboda 1973) verwendet.

Auch Mykosen durch *Candida* (Asrani et al. 1993) oder Aspergillen (Chaudhary

et al. 1988) konnten experimentell induziert werden.

In der Wachtel wurden auch parasitäre Infektionen mit *Toxocara canis* (Pahari und Sasmal 1990, 1991), Cryptosporidien (Guy et al. 1987) oder *Toxoplasma gondii* (Simitch et al. 1965) experimentell evaluiert.

In der aviären Virusforschung konnten erfolgreiche Transmissionen von verschiedenen Influenzaviren (Makarova et al. 2003; Nili et al. 2007; Jeong et al. 2009; Yee et al. 2009; Cilloni et al. 2010; Giannecchini et al. 2010), dem Herpes-Marek-Virus (Khare et al. 1975a, b; Mikami et al. 1975; Kobayashi et al. 1986; Pradhan et al. 1987; Imai et al. 1991; Wakenell et al. 2008), dem Western Equine Ecephalitis Virus (Eleazer et al. 1978), dem Reticuloendotheliosis Virus (Ratnamohan et al. 1979; Barbosa et al. 2007; Santos et al. 2008), dem Sarkomatose Virus (Pienta et Groupé 1967; Yoshikawa et al. 1976; Janes et al. 1994; Kai et al. 1995), dem Virus der Infektiösen Bursitis (Weismann und Hitcher 1978; Greenfield et al. 1986), Adenoviren (Bogomolova et al. 1974; Singh et al. 1995) oder auch Tollwutviren (Yamaoka 1962) durchgeführt werden, um nur einige Beispiele zu nennen. Dabei wurden die Erreger intranasal, oral oder intraokulär, aber sehr häufig auch über Injektionen in den Muskel, das Gehirn oder das Abdomen verabreicht (Singh et al. 1995; Wakenell et al. 2008; Giannecchini et al. 2010).

III. MATERIAL UND METHODEN

In einem Infektionsversuch sollte evaluiert werden, ob sich die Japanische Wachtel (*C.c. japonica*) als Tiermodell für Infektionen mit aviären Bornaviren eignet und ob sich in der Japanischen Wachtel das klinische Bild der PDD erzeugen lässt.

1. VERSUCHSPLANUNG

1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 35 Japanische Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) aus der Zucht des Instituts für Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Küken wurden im Alter von acht Tagen freundlicherweise für das Projekt zur Verfügung gestellt.

Nach Information des Instituts für Tierernährung handelt es sich bei den verwendeten Wachteln um eine 30 Jahre alte Inzuchtlinie, die eine `schwere Linie` des Zweinutzungstyps repräsentiert. Das Gewicht der adulten männlichen Tiere liegt in der Regel zwischen 125 und 140g, das der adulten Weibchen zwischen 170 und 185g. Die hier verwendeten Vögel wurden mittels Kunstbrut in handelsüblichen Brutapparaten (J. Hempel Modell TC 2004 M) erbrütet. Der Schlupf erfolgte nach ca. 17 Tagen Bebrütungsdauer. Bis zum Transport in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische acht Tage nach Schlupf wurden die Küken in temperierten Boxen gehalten.

In der Klinik für Vögel wurden die Wachteln im S2-Infektionsstall in zwei Gruppen in getrennten Räumen im Kükenring mit Wärmestrahler aufgestellt. Sie erhielten stets Wasser ad libitum und zunächst Aufzuchtfutter aus eigener Herstellung des Instituts für Tierernährung, ab dem zehnten Lebenstag wurde dieses Futter mit Wachtelfutter der Firma Quiko gemischt. Die Stallabteile wurden mit Wärmestrahlern, Tiefstreu, Sandbad, Versteckmöglichkeiten, mehreren Futter- und Wasserplätzen, Grit, Ästen oder anderem Beschäftigungsmaterial alters- und tierschutzgerecht ausgestattet.

Die Wachteln wurden zwei Gruppen zugeordnet. Eine erste Gruppe bestand aus

20, die zweite aus 15 Tieren. Da das Geschlecht bei jungen Wachteln eines Alters von acht Tagen äußerlich noch nicht zu erkennen war, erfolgte die Gruppenverteilung zufällig. Zu einem späteren Zeitpunkt, als das Geschlecht anhand des Federkleides bestimmt werden konnte, zeigte sich, dass sich die insgesamt 35 Wachteln aus 17 männlichen und 18 weiblichen Vögeln zusammensetzten. In der ersten Gruppe mit 20 Tieren fanden sich elf Männchen und neun Weibchen, während die zweite Gruppe aus sechs Hähnen und neun Hennen bestand.

1.2 Virusmaterial

Bei dem verwendeten Virusmaterial handelt es sich um ABV Genotyp 4, und zwar um den Stamm 6758, der aus einem natürlich mit ABV infizierten und an PDD verstorbenen Gelbbrustara aus dem Patientengut der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der LMU München stammte. Das Virus wurde am Department Virologie der Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. Stäheli in der Zelllinie CEC-32, einer Wachtelfibroblastenzelllinie, angezüchtet und anschließend aufgereinigt. Für die Infektion wurde ein Virusstock mit einem Titer von $1,7 \cdot 10^5$ ffu/ml eingesetzt.

1.3 Versuchsdurchführung

Der Versuch wurde in einer Kooperation der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der LMU mit dem Institut für Physiologie der LMU und dem Departement Virologie der Universität Freiburg geplant. Er wurde unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-162-09 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Während des Versuchs wurden die Grundsätze hygienischen Arbeitens befolgt. Zu den beiden räumlich voneinander getrennten Stallabteilen der infizierten und nicht-infizierten Wachteln bestand dabei eine strikte Zugangsbeschränkung. Die Räume waren jeweils über eine Eingangsschleuse zu betreten, dort wurde Schutzkleidung (Handschuhe, Überschuhe, Overalls) angelegt und erst anschließend das Stallabteil betreten. Alle Tiere wurden mit nummerierten

Klebestreifen (Leukosilk small) am Ständer individuell gekennzeichnet. In späterem Verlauf lösten sich bei einigen Wachteln die Nummern, so dass bei diesen Tieren neue mit Buchstaben (A, B, C, D) angebracht wurden. Der Gesundheitszustand der Wachteln wurde täglich mittels Adspektion kontrolliert.

1.3.1 Experimentelle Infektion

Bei der experimentellen Infektion, bei der die Wachteln zehn Tage alt waren, wurden pro Wachtel 50 µl des oben beschriebenen Virusstocks in PBS, das entspricht etwa 10^4 ffu pro Tier, okulonasal appliziert. Die Infektion erfolgte also intranasal und konjunktival beidseits durch Eintropfen aus einer Pipettenspitze, indem eine Person jedes Tier einzeln fixierte und eine weitere Person die Dosis einführte. Bei der Technik der „Nasenlochtropfmethode“ wird die zu applizierende Substanz auf ein Nasenloch aufgetropft und gelangt über die Choanenspalte in die Schnabelhöhle, von wo sie abgeschluckt wird (König et al. 2009). Bei der Verabreichung eines flüssigen Mediums in ein Auge kann dieses über den Bindehautsack in den Organismus gelangen. Auf diese Weise wurde versucht, einen natürlicheren Infektionsweg zu imitieren und wenig invasiv vorzugehen.

Das prinzipielle zeitliche Vorgehen während des Versuchs war, wie in Tabelle 1 dargestellt, folgendermaßen. Die 20 Tiere der oben erwähnten ersten Gruppe wurden experimentell mit aviären Bornaviren infiziert. Die 15 Vögel der zweiten Gruppe wurden zunächst sämtlichst als nicht-infizierte Kontrollen verwendet. Nach vier Wochen wurden zehn Tiere aus der ersten, experimentell infizierten Gruppe zufällig ausgewählt, euthanasiert und auf das Vorliegen einer ABV-Infektion untersucht. Zum gleichen Zeitpunkt wurden zehn Tiere aus der bisher nicht infizierten Kontrollgruppe, ebenfalls zufällig ausgewählt, entnommen und als sogenannte „Kontakttiere“ zu den restlichen zehn Tieren der experimentell infizierten Gruppe gesetzt. Die übrigen fünf nicht infizierten Wachteln verblieben als Kontrollgruppe von diesen Wachteln abgetrennt. Nach Ablauf weiterer vier Wochen wurden die zehn „Kontakttiere“ euthanasiert und auf Infektion mit ABV überprüft. Die restlichen zehn Wachteln der Versuchsgruppe wurden nach weiteren vier Wochen, also insgesamt 12 Wochen nach experimenteller Infektion, euthanasiert und untersucht.

Tabelle 1: Kurzübersicht über die Gruppeneinteilung und den zeitlichen Verlauf des Versuches

Gruppe	Tier-Nummer	Behandlung	Euthanasie
Gruppe A	1	Infektion mit ABV an Tag 0	Woche 4
	6		
	7		
	9		
	15		
	16		
	18		
	19		
	20		
Gruppe B	2	Infektion mit ABV an Tag 0	Woche 12
	3		
	4		
	5		
	8		
	10		
	11		
	13		
	14		
Gruppe C	21	Kontakttiere, diese wurden in Woche 4 zu den Tieren der Gruppe B gesetzt	Woche 8
	23		
	24		
	25		
	26		
	28		
	30		
	32		
	33		
Gruppe D	22	Unbehandelte Kontrolltiere	Woche 12
	27		
	29		
	31		

Anmerkung: jeweils eine Wachtel der Gruppe A und Gruppe D verstarb vor Abschluss des Versuchs während der Blutentnahme

1.3.2 Probenentnahmen

Zu Versuchsbeginn wurde von allen Tieren Blut und eine Kloakentupferprobe für den Nachweis von ABV-Antikörpern mittels ELISA und von Virus-RNA mittels ABV-rRT-PCR genommen. Die Blutentnahme erfolgte mit 2ml Spritzen (Becton Dickinson Company, Franklin Lakes USA) und Kanülen der Größe 22G (Braun

Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) an der Vena jugularis dexter den Standardtechniken entsprechend (Pees et al. 2003; König et al. 2009). Pro Tier wurde dabei ein Volumen von maximal 0,5 % des Körpergewichts entnommen und in Na-EDTA-Gefäße überführt. Das Plasma wurde durch Zentrifugieren (Biofuge pico Herens, Kendro, Laboratory Products, Osterode, Deutschland) von den zellulären Blutbestandteilen abgetrennt und bis zur Verwendung im ELISA bei -20 °C gelagert. Für die Untersuchung auf Virus-RNA wurde zusätzlich nach der Zentrifugation die oberste Schicht der zellulären Bestandteile als sogenannter „Buffy coat“ abpipettiert und bis zur RNA-Extraktion bei -70 °C gelagert.

Die Kloakentupferprobe wurde mit einem Metallstäbchentupfer nach Einführen des Stäbchenkopfes am fixierten Tier durch kreisförmige Bewegungen des Tupfers entlang der Schleimhaut der Kloake entnommen. Danach wurde der wattierte Teil mit dem anhaftenden Probenmaterial abgetrennt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur RNA-Extraktion ebenfalls bei -70 °C gelagert. Von allen Wachteln wurde anschließend in zweiwöchigen Intervallen auf die oben beschriebene Weise Blut und Kloakentupfer entnommen und auf Antikörper und RNA von ABV getestet.

Am Tötungstag, nach Betäubung durch Inhalationsnarkose mit Isofluran/Sauerstoff und fachgerechter Exartikulation, wurden während der pathologisch-anatomischen Untersuchung von allen Tieren Organproben einer Größe von ca. 3x3x3mm mit Sektionsbesteck möglichst steril entnommen. Dabei wurden Proventrikulus, Ventrikulus, Dünndarm, Herz, Niere, Leber, Gehirn, Nervus opticus, Auge und Rückenmark einbezogen. Gewebeproben wurden für den späteren immunhistologischen Nachweis von ABV-Antigen und zur histologischen Darstellung pathologischer Veränderungen in Zambonimedium (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer) fixiert.

Von den gleichen Organen wurden außerdem weitere Gewebeproben für den RNA-Nachweis gewonnen. Die Gehirnproben der Tiere 1, 6, 7, 9, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 32 und 33 wurden mit der Bornavirus-rRT-PCR untersucht. Diese Organproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

1.3.3 Klinische Untersuchung

Im Rahmen der täglichen Versorgung wurden zusätzlich zu einer Kontrolle der Umweltbedingungen (Stallhygiene, Beleuchtung, Temperatur) die Tiere einer Adspektion unterzogen. Die Vögel wurden dabei in der Gruppe, ohne sie aufzuschrecken, beobachtet. Berücksichtigt wurden das Verhalten, die Verteilung im Raum, der Allgemein- und Pflegezustand, die Ausgeglichenheit/Lebhaftigkeit, Lautäußerungen, der Entwicklungszustand, die Bereitschaft zur Futter- und Wasseraufnahme (Verbrauch; aktive Aufnahme), die Kotbeschaffenheit und der Eieranfall (Redmann 2005).

Ferner wurden einzelne Tiere exemplarisch herausgefangen und einer kurzen physischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurde auf den Gefiederzustand, die Körperöffnungen, das Allgemeinbefinden, eventuelle Verletzungen sowie den Ernährungszustand geachtet.

Zum Zeitpunkt der Probenahme, also an Tag 0 und dann vierzehntäglich wurden alle Wachteln auf einer Waage gewogen und mittels Palpation der Ernährungszustand bestimmt. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung wurden tabellarisch aufgezeichnet. Eine statistische Auswertung der durchschnittlichen Körpergewichte der Wachteln an den einzelnen Wiegeterminen je nach Versuchsgruppe erfolgte nach Geschlecht getrennt.

1.3.4 Augenuntersuchung

Bevor die Wachteln gruppenweise im Abstand von vier Wochen für die weiterführende *post mortem* Diagnostik euthanasiert wurden, wurden sie einer allgemeinen und speziellen Augenuntersuchung unterzogen. Während an Tag 28 nur die zehn Tiere aus der Gruppe A, die euthanasiert wurden, in die Augenuntersuchung einbezogen wurden, wurde im weiteren Versuchsverlauf das Protokoll so modifiziert, dass die ophthalmologische Untersuchung bei den Tieren aller Versuchsgruppen jeweils einmal monatlich durchgeführt wurde. Deshalb existieren von Tag 28 nur Untersuchungsergebnisse von Gruppe A. Bei der Augenuntersuchung, die einfach geblindet durchgeführt wurde, war dem Untersucher Herrn Prof. Korbelt nicht bekannt, aus welcher Versuchsgruppe die Tiere stammten.

Im Rahmen der allgemeinen ophthalmologischen Untersuchung wurden beide Augen vergleichend betrachtet. Die Untersuchung des vorderen Augensegmentes erfolgte bei gedämpftem Kunstlicht unter Verwendung der üblichen Zwangsmaßnahmen. Hierbei wurden auch die Ohröffnungen und der Pupillarreflex begutachtet. Daraufhin wurde die vordere Augenkammer im seitlich auffallenden Licht (Lichtquelle im temporalen Limbusbereich) mit Beurteilung der vorderen Augenstrukturen bis zur Linse bei variierender Blickrichtung des Untersuchers unter Verwendung einer Handspaltlampe (Fa. Kowa, Tokio, Japan) untersucht. Zudem wurde die vordere Augenkammer auch mit lateraler Transillumination und Retroillumination beurteilt. Im Anschluß an diese allgemeine Augenuntersuchung erfolgte eine spezielle ophthalmologische Untersuchung, bei der die Spaltlampenbiomikroskopie, die indirekte monokulare Ophthalmoskopie mittels Diaskleralkegel (Heine, Herrsching, Deutschland) sowie die indirekte binokulare Ophthalmoskopie mittels Kopfbandophthalmoskop (Mentor Corporation, Santa Barbara, USA) durchgeführt wurden und die Kornea, die vordere Augenkammer, die Vorderfläche der Iris und die Linse auf Veränderungen hin untersucht wurden. Mit Hilfe eines Kopfbandophthalmoskopes und Ophthalmoskopierlupen mit 78 und 90 Dioptrien (Volk Optical Inc., Mentor, USA), welche zwischen das Auge des Untersuchers und das des Vogels eingebracht wurden, erfolgte die Untersuchung des Augenhintergrundes. Dabei wurde vor allem auf Trübungen und unphysiologischen Inhalt des Glaskörpers geachtet (Blut, Fibrin), Veränderungen der Retina in Form von Netzhautablösungen, -atrophien, Entzündungen (Chorioretinitiden, Chorioretiniden, Retiniden) und auf Veränderungen des Pekten, wie beispielsweise partielle oder vollständige Abrisse, Blutungen oder degenerative Veränderungen geachtet.

Ferner wurde am frischtoten Tier eine Kammerwasserprobe durch Parazentese im temporalen Limbusbereich mit einer Insulinspritze (BD Micro-Fine + Demi, 0,3 ml, LePont de Claix Cedex, Frankreich) entnommen, in beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt und für eine spätere rRT-PCR-Untersuchung bei -70 °C tiefgekühlt. Eine Kammerwasseruntersuchung mit der Bornavirus-rRT-PCR wurde von den Proben der Tiere 21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 32 und 33 durchgeführt.

1.3.5 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Vor der Sektion wurde jeder Vogel gewogen sowie einer genauen äußerlichen Untersuchung unterzogen. Dabei wurden die Körperöffnungen betrachtet, der Gefiederzustand beurteilt, auf mögliche Verletzungen geachtet und der Ernährungs- und Allgemeinzustand untersucht.

Nach erfolgter Euthanasie wurde zunächst das Gefieder befeuchtet und der Vogel in Rückenlage positioniert. Die Federn wurden im ventralen Körperbereich vom kranialen Halsanfang bis kurz vor die Kloake entfernt (Autorenkollegium 2005).

Die Eröffnung des Tierkörpers erfolgte mit einem paramedianen Schnitt entlang der *Carina sterni* bis zur Kloakenöffnung. Die Haut im ventralen Rumpfbereich wurde stumpf abgelöst. Dann wurden die Exartikulation der Hüftgelenke sowie die Durchtrennung der Muskulatur und Knochen des Schultergürtels, der Brustwand und der Bauchdeckenwand vorgenommen. Durch Wegklappen des abgesetzten Brustbeines mit anhaftender Muskulatur nach kranial konnte die Leibeshöhle freigelegt und makroskopisch beurteilt werden.

Anschließend erfolgte eine Exenteration von Herz und Herzbeutel nach Durchtrennung der Stammgefäße. So konnte das Organ genauer untersucht und interpretiert werden. Hiernach wurde die Leber entnommen und einer Bewertung unterzogen. Weiterhin wurde der Drüsenmagen vom Ösophagus getrennt und der gesamte Magendarmtrakt vollständig nach kaudal verlagert. Auf diese Weise konnten die weiter dorsal liegenden Organe entnommen und untersucht werden. Der Darmkanal wurde durch Lösen der Darmschlingen vom Gekröse ausgebreitet und begutachtet. Außerdem wurden die Geschlechts- und Ausscheidungsorgane beurteilt.

Am exartikulierten Kopf wurden die Schädelkalotte und die diese bedeckende Haut zur Eröffnung durchtrennt, so dass das Gehirn vorsichtig herausgelöst und in toto untersucht werden konnte. Desweiteren wurden die Bulbi mit Sehnerv sorgfältig freipräpariert und bewertet.

Während der Sektion wurden von jedem Vogel, wie unter „Probenentnahme“ (1.3.2) bereits beschrieben, zehn Organproben in zweifacher Ausführung entnommen, einmal für die Anfertigung histologischer und immunhistologischer Schnitte und zum anderen für eine mögliche Untersuchung mittels rRT-PCR.

Diese Proben wurden möglichst steril mit Sektionsbesteck entnommen und in eigens dafür vorbereiteten beschrifteten Eppendorf-Gefäße asserviert und

tiefgekühlt. Hierbei handelte es sich um Gewebeentnahmen von Herz, Leber, Niere, Drüsenmagen, Muskelmagen, Dünndarm und Gehirn. Ferner wurde durch Freilegen der Wirbelsäule ein jeweils mittleres Stück mit Rückenmark herausgelöst, um diesen ZNS-Anteil für weiterführende Untersuchungen zu gewinnen. Dazu wurden auch die beiden Augen mit Sehnerv zurückbehalten und tiefgekühlt gelagert.

1.3.6 ABV-RNA-Nachweis

Zum Nachweis von Virus-RNA wurden Organproben, Blutproben („Buffy coat“) und Kloakentupferproben, die wie bereits dargestellt entnommen worden waren, verwendet. Aus diesen Proben wurde zunächst die Gesamt-RNA extrahiert und diese dann mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die so erhaltene cDNA wurde dann in der rRT-PCR für die Amplifikation von ABV-Genom eingesetzt.

Die RNA-Extraktionen aus Organen und Blutproben wurden mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), die aus Kloakentupferproben mittels QIAamp Viral RNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) jeweils gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Bei der Extraktion wurden stets Negativkontrollen mitgeführt.

Die Reverse Transkription wurde mit Random Hexamer Primern (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter Verwendung von M-MLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Standardprotokoll vollzogen. Dabei wurde neben den Negativkontrollen aus der Extraktion auch eine RT-Positivkontrolle, die ABV-RNA enthielt, einbezogen.

Bei der rRT-PCR wurde das Primer-Sonden-Set 1034/1322 (forward: 5'CAGACAGCACGTCGAGTGAGA-3', reverse: 5'AGTTAGGGCCTCCCTGGGTAT-3'; Sonde: 6FAM-AGGTCCCCGCGAAGGAAGCGA-TMR) wie bei Honkavuori et al. (2008) beschrieben, verwendet. In einem 25 µl-Ansatz wurden dabei jeweils 0,15 µl (50 µM) der beiden Primer, 0,25 µl (20 mM) Sonde, 0,3 µl dNTP (25 mM, each) und 0,625 u HotStar Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 3 mM Mg-Ionen eingesetzt. Nach einer initialen Denaturierung für 15 min bei 95 °C wurden 50 Zyklen aus jeweils 30s Denaturierung bei 95 °C, Annealing bei 50 °C und Elongation bei 72 °C

durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte im Realtime-PCR-Gerät Mx3000 P (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und wurden mit der zugehörigen MxPro Software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ausgewertet. Eine Reaktion wurde dann als positiv bewertet, wenn die Fluoreszenz bei sigmoidem Kurvenverlauf den Fluoreszenz-Schwellenwert überschritt.

Neben den Extraktions-Negativkontrollen und der RT-Positivkontrolle wurde auch ein Positivkontrollansatz für die PCR mitgeführt. Dabei handelte es sich um ein Plasmid, in das ABV-PCR-Produkt einligiert worden war. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Briese und Dr. Kirsi Honkavuori, Universität Columbia, New York, USA, zur Verfügung gestellt.

1.3.7 ELISA

1.3.7.1 ABV-N Protein

Als Antigen für die serologischen Untersuchungen wurde ein rekombinantes N-Protein des aviären Bornavirus verwendet, das in *E. coli* als His-Tag-Protein exprimiert worden war (Reuter et al. 2010). Affinitätschromatographisch gereinigtes N-Protein wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. Peter Stäheli, Department Virologie der Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

1.3.7.2 Gewinnung von Kontrollseren

ABV-Antikörper-negative und -positive Seren wurden aus einer Wachtel (Tier # 998) gewonnen. Dazu wurde der Wachtel vor der Immunisierung zunächst Blut für die Gewinnung des Präimmunserums (Negativserums) entnommen. Die Wachtel wurde anschließend i.m. in den Brustmuskel immunisiert. Appliziert wurden jeweils 100 µg ABV-N Protein in FIA (Freund`s incomplete adjuvant) in einem Volumen von 200 µl an zwei Stellen. Drei und sechs Wochen nach der Erstimmunisierung wurde die Wachtel mit der gleichen Antigenformulierung auf dem gleichen Weg Booster-immunisiert. 14 Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte die Entnahme des Immunserums. Alle Serumproben wurden aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die Anzeige für die Gewinnung von Antiseren wird unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531.6-12-09 bei der Regierung von Oberbayern geführt.

1.3.7.3 Anti-ABV-N ELISA

Der ELISA wurde am Institut für Tierphysiologie der LMU München in der Arbeitsgruppe Prof. B. Kaspers durchgeführt. Dabei erfolgte eine exemplarische Untersuchung der Serumproben der Wachteln aus der Kontroll-, Kontakt- und experimentellen Infektionsgruppe bis zum Tag 70.

96-Loch-Mikrotiterplatten (MaxiSorp, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurden über Nacht mit 5 µg/ml rekombinantem ABV-N Protein in Carbonatpuffer (pH 9.6) beschichtet (100 µl pro Kavität), anschließend mit PBS-T gewaschen und für eine Stunde bei 37°C mit 4% Magermilch in PBS blockiert. Anschließend wurden die Proben in einer 1:20 (Tag 0, 14, 28) Vorverdünnung in PBS-T auf die Platten aufgetragen und eine log₂-Verdünnungsreihe angelegt. Das Positiv- und das Negativkontrollserum wurden jeweils 1:100 vorverdünnt und ebenfalls log₂ weiterverdünnt. In einigen Versuchen (Tag 42, 56, 70) wurden die Proben lediglich in einer 1:20 und 1:100 Verdünnung in Doppelansätzen analysiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Nach dem Waschen folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit einem monoklonalen Anti-Wachtel-IgY Antikörpers WAB (1 µg/ml in PBS-T, 100 µl pro Kavität; Arbeitsgruppe Kaspers, Institut für Tierphysiologie, LMU, München). Nach dem erneuten Waschen wurde die Platte mit einem POD-konjugierten Ziegen-Anti-Maus-IgG Antikörper (1:10.000 in PBS-T, 100 µl pro Kavität, Jackson Laboratories 715-035-146, USA) für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und mit Tetramethylbenzidine entwickelt (TMB, Applichem, Darmstadt, Deutschland). Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 50 µl einer 1 M H₂SO₄ gestoppt. Zur Erfassung unspezifischer Bindungen wurde eine weitere Platte wie beschrieben bearbeitet, jedoch ohne Beschichtung mit dem rekombinanten ABV-N-Antigen (Siehe hierzu auch Tabelle 2). Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader (Spectra Classic, Spectra Classic, Firmware: V2.02, XReas Plus Version V 4.11).

Zur Berechnung des Grenzwerts für die Diskriminierung von positiven und negativen Seren wurde der Mittelwert der OD des Präimmunserums (# 998) bei

einer 1:100 Verdünnung berechnet und das 5-fache der Standardabweichung addiert.

Tabelle 2 Aufbau des ELISAs zum Nachweis von Wachtel-Anti-ABV-N

Beschichtung	2 Platten mit ABV-N, 5µg/ml 1 Platte ohne Beschichtung
Blockierung	4% Magemilch
Negativkontrolle	Präimmunserum 998 in PBS-T log2 1:100
Positivkontrolle	Immunsersum 998 vom in PBS log 2 1:100
Proben	Proben Tag 0, 14, 28, 42, 56 und 70 jeweils 1:20 & 1:100 in PBS-T
2. Antikörper	α-Wachtel-IgG, 1µg/ml
Detektion	gt-α-m-POD 1:10000 in PBS-T
Entwicklung	10 Min. mit TMB

1.3.8 Histologie

Für die histologische Untersuchung wurden die während der anatomisch-pathologischen Untersuchung gewonnenen Organproben (Auge, Sehnerv, Gehirn, Rückenmark, Leber, Herz, Niere, Dünndarm, Drüsenmagen, Muskelmagen) in Zambonimedium (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer) für 48 Stunden eingelegt. Nach Zuschnitt und teilweiser Zusammenfassung ähnlicher Gewebestrukturen (Leber/Niere; Drüsenmagen/Dünndarm; Herz/Muskelmagen) wurden die Proben mit dem Tissue-Tek VIP Sakura Bayer Diagnostics (Leverkusen, Deutschland) entwässert und mit flüssigem Paraffin imprägniert. Mit dem Einbettungsautomat (Shandon Histocentre, Thermofisher Scientific, Minnesota, USA) wurden die so vorbereiteten Probenstücke nach Standardprotokoll in Paraffin eingeblockt (Mulisch und Welsch 2010). Nach Aushärtung wurden zunächst mit dem Mikrotom von Reichert und Jung (Wien, Österreich) 4µm dicke Schnitte angefertigt, auf Glasobjektträgern (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen, deparaffiniert, rehydriert und mit dem Hämatoxylin/Eosin-Verfahren eingefärbt.

Die mikroskopische Auswertung dieser Gewebeschnitte erfolgte mit einem Laborlux S Leitz Mikroskop (Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland).

1.3.9 Immunhistologie

Bei der Durchführung der Immunhistologie wurden neben den Gewebeproben der Wachteln stets auch ABV-haltige Gewebeschnitte von Papageien als Positivkontrolle mitgeführt. Die Gewebeproben wurden für 48 Stunden in Zambonimedium (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer) fixiert. Augen und Proben mit Knochenanteil (Rückenmark) wurden mit Hilfe von Osteosoft (Merck, Darmstadt, Deutschland) dekalzifiziert. Die Proben wurden, wie bereits beschrieben, entwässert und in Paraffin eingebettet, in 4µm dicken Schnitten auf adhäsive Gläser (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht, deparaffiniert und rehydriert.

Für die immunhistologische Färbung wurde zunächst die endogene Peroxidase durch 0, 3% Hydrogenperoxid blockiert. Darauf folgte eine 45-minütige Inkubation der Schnitte mit 100% Ziegen Serum (Biowest, Nuaille, Frankreich). Um eventuell vorhandene aviäre Bornavirus-Antigene zu erkennen, wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der in einem Kaninchen hergestellt wurde und sich gegen rekombinantes ABV-N Protein richtet. Dieses N Protein war in *E.coli* als His-tagged Fusionsprotein hergestellt worden (Reuter et al. 2010). Bereits vor der Immunisierung mit N-Protein wurde von diesem Kaninchen Serum gewonnen, das sogenannte Prä-Immuneserum. Dieses Serum wurde als Kontrolle für unspezifische Hintergrundfärbungen eingesetzt. Das Anti-N- und das Prä-Immuneserum wurden von Prof. Dr. Bernd Kaspers (Institut für Tierphysiologie der LMU) zur Verfügung gestellt.

Die vorliegenden Schnitte wurden zwei Stunden lang bei Raumtemperatur mit Primärantikörper inkubiert und dann dreimal in PBS gewaschen (pH 7,4). Eine weitere Inkubation von 30 Minuten mit biotinyliertem Anti-Kaninchen IgG (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in 1:100 Verdünnung schloss sich an. Die nachfolgende Färbung wurde mit dem Vectastain ABC-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) der Herstelleranleitung folgend vorgenommen. Um die stattfindende Reaktion sichtbar zu machen, wurde braunes Chromogen 3,3-Diaminodenzidine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Für melaninhaltige Gewebeschnitte wurde stattdessen das Peroxidasesubstrat-Kit Vector NovaRED (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. Abschließend fand eine Gegenfärbung mit Haematoxylin statt. Die Objektträger wurden dann mit Eukitt Einschlußharz (Kindler, Freiburg, Deutschland)

eingedeckelt. Die mikroskopische Untersuchung der Gewebeschnitte wurde mit einem Laborlux S Leitz (s.o.) durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Klinische Untersuchung und Gewichtsentwicklung

Die klinischen Beobachtungen im Rahmen der täglichen Versorgung und der zweiwöchentlichen Probenentnahme, bei der jedes Tier einzeln einer genauen Untersuchung und Palpation unterzogen werden konnte, gaben keinerlei Hinweise auf eine Erkrankung vergleichbar mit einer PDD. Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde das Verhalten als aufmerksam, das Allgemeinbefinden und der Pflegezustand als gut sowie die Futter- und Wasseraufnahme als unauffällig beurteilt. Bis auf Pickverletzungen an den Augenlidern der männlichen Tiere, die auf Rangordnungskämpfe zurückzuführen waren, sowie federlose Stellen waren keine Beeinträchtigungen des Gesundheitszustandes erkennbar. Die einzige Ausnahme stellte ein Tier aus der Kontrollgruppe, die Wachtel Nummer 22, dar, die wegen einer Kopfverletzung chirurgisch versorgt werden musste. Dieses weibliche Tier verblieb einige Tage in stationärer Behandlung in der Station für Vögel der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische und wurde hier mit Antibiotika (Enrofloxacin 25mg/kg KM), Schmerzmedikation (Meloxicam 0,5mg/kg KM) sowie Infusionstherapie mit Ringer Lactat (25ml/kg KM) versorgt, bevor es in die Gruppe zurückgesetzt wurde.

Wie in Tabelle 3 dargestellt, lagen die durchschnittlichen Körpergewichte der Wachteln an Tag 0, also in einem Alter der Wachteln von zehn Tagen, zwischen 49g und 56g. Ab Tag 28 bis zum Versuchsende variierte das durchschnittliche Körpergewicht bei den Hennen von 110g bis 153g. Bei den männlichen Wachteln wurden in diesem Zeitraum durchschnittliche Körpergewichte von 97g bis 124g gemessen. Sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Wachteln wurden im Versuchszeitraum keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe festgestellt.

Tabelle 3 Arithmetische Mittelwerte der Gewichte (g) der männlichen und weiblichen Tiere der Gruppen mit experimenteller Virusapplikation (Gruppe A und B, "infiziert"), der Kontakttiere (Gruppe C, "Kontakt") und der Kontrolltiere (Gruppe D, "Kontrolle") mit Standardabweichung SD

Datum	♂ infiziert	♂ Kontakt	♂ Kontrolle	♀ infiziert	♀ Kontakt	♀ Kontrolle
Tag 0	50,8 (+/- 4,37)	54,43 (+/- 5,62)	49,81 (+/- 1,85)	56,13 (+/- 4,68)	55,84 (+/- 4,55)	51,46 (+/- 1,2)
Tag 14	102 (+/- 6,99)	98,35 (+/- 3,86)	90,5 (+/- 10,61)	108,13 (+/- 8,22)	101,14 (+/- 9,39)	94 (+/- 8,49)
Tag 28	97,91 (+/- 5,01)	119,25 (+/- 4,9)	109,5 (+/- 7,78)	121,62 (+/- 7,66)	133,1 (+/- 14,36)	123,5 (+/- 6,85)
Tag 42	120,8 (+/- 7,56)	117 (+/- 3,83)	113,5 (+/- 3,55)	140,67 (+/- 20,53)	139,5 (+/- 12,93)	122 (+/- 6,63)
Tag 56	123,5 (+/- 6,07)	113,5 (+/- 2,38)	119,5 (+/- 0,71)	110,8 (+/- 15,61)	131,3 (+/- 11,17)	128,5 (+/- 9,19)
Tag 70	123,5 (+/- 8,17)		111,5 (+/- 7,78)	152,5 (+/- 7,19)		127,5 (+/- 0,71)
Tag 84	124 (+/- 8,22)		114,5 (+/- 6,36)	153,5 (+/- 6,14)		129 (+/- 1,41)

2. Augenuntersuchung

Bei der Augenuntersuchung fielen als häufigste Veränderung fokale Chorioretinitiden auf. Desweiteren waren vereinzelt Lid- und Lidrandverletzungen durch Picken, Ödeme auf der Kornea, Einblutungen im Augenhintergrund und Irisdepigmentierung zu sehen. Augenveränderungen kamen in allen Versuchsgruppen, also sowohl bei den experimentell infizierten Tieren als auch in der Kontakt- und Kontrollgruppe vor. Vier Wochen nach Infektion lagen Untersuchungsergebnisse nur für Tiere der Gruppe A, also der Infektionsgruppe vor. Zu diesem Zeitpunkt zeigten 67% der Tiere mindestens eine der unten angeführten Augenveränderungen. Nach acht Wochen wurde bei 60% der Tiere in Gruppe B (infizierte Gruppe) und bei 33% der Wachteln aus der Gruppe C (Kontaktgruppe) Augenveränderungen festgestellt. In der Gruppe D (Kontrollgruppe) hatte kein Tier eine Auffälligkeit. Nach 12 Wochen wiesen nur noch 30% der Wachteln aus der Gruppe B (infizierte Gruppe), aber alle der Gruppe D Augenveränderungen auf. Art und Weise der Veränderungen werden

im Folgenden für jedes einzelne Tier angeführt.

An Tag 28 *post infectionem*, an dem neun Tiere der Gruppe A einbezogen wurden (das zehnte Tier aus dieser Gruppe war bei der Blutentnahme verstorben) wurden bei zwei Tieren (19, 20) keine Augenveränderungen festgestellt. Bei einer Wachtel (7) war das rechte Auge ohne besonderen Befund, das linke Auge konnte wegen schlechter Einsehbarkeit nicht beurteilt werden. Bei fünf Tieren wurden Chorioretinitiden, davon bei vier Wachteln (9, 15, 16, 18) beidseits und bei einer nur auf dem linken Auge (1) beobachtet. Eine Wachtel zeigte auf dem rechten Auge ein Ödem sowie eine Einblutung im Augenhintergrund (6).

Bei der zweiten Augenuntersuchung acht Wochen nach Versuchsbeginn wurden in der experimentell infizierten Gruppe B bei vier Tieren (2, 4, 5, 17) keine Veränderung und bei sechs Tieren Chorioretinitiden beobachtet, davon bei fünf beidseits (3, 10, 11, 13, A) und bei einer Wachtel (8) nur auf dem linken Auge. In der Gruppe C der Kontakttiere fielen drei Tiere (21, 25, 28) ohne Augenveränderungen und sechs mit Chorioretinitiden auf, bei vier beidseits (23, 24, 26, 33), bei zwei einseitig links (30, 32). Ein Tier zeigte eine Pickverletzung am linken Augenlid (26). In der Kontrollgruppe wurden bei keinem Vogel Veränderungen der Augen festgestellt.

12 Wochen *p.i.* zeigten sich bei den verbliebenen Wachteln aus der experimentell infizierten Gruppe B sieben Tiere ohne Augenveränderungen (3, 4, 8, 14, A, B, C - einigen Tiere fehlte die Leukosilkmarkierung am Fuß und die Nummern konnten nicht mehr zugeordnet werden, so wurden Buchstaben verwendet). Bei einem Tier (10) wurde eine Chorioretinitis in beiden Augen und bei einem weiteren Tier (5) eine Irisdepigmentierung sowie eine Lidrandverletzung am linken Auge festgestellt. Tier D hatte ein Lidödem am linken Auge. Die vier Kontrolltiere zeigten Chorioretinitiden beidseits (31), nur rechts (27, 29) oder nur links (22).

2. Pathologie

Im Rahmen des Versuchs wurden zehn experimentell infizierte Tiere (Gruppe A) nach vier Wochen, zehn Kontakttiere nach acht Wochen und die restlichen Tiere nach zwölf Wochen euthanasiert und makroskopisch untersucht. Ausgeprägte Dilatationen der Mägen und/oder Kachexie, also typische PDD-Veränderungen,

kamen nicht vor. Andersartige pathologische Veränderungen wurden in allen Gruppen dokumentiert, gehäuft jedoch den experimentell infizierten Gruppen A und B. Bis auf ein Tier zeigten alle Wachteln Veränderungen. In der Gruppe C der Kontakttiere waren 50% der Tiere ohne makroskopische Veränderung (fünf von zehn Tieren) ebenso wie in der Gruppe D der Kontakttiere (zwei von vier Tieren). Wie in Tabelle 4 für jedes Tier im Einzelnen dargestellt ist, waren die häufigsten Veränderungen an den Nieren, dem Magendarmtrakt und der Leber zu finden.

Gruppe A und B (Virusapplikation an Tag 0):

Die Tiere, die vier Wochen *p.i.* euthanasiert wurden (1, 6, 7, 9, 15, 16, 18, 19, 20), zeigten vermehrt und massivere makroskopische Auffälligkeiten an ihren Organen, als die Tiere, die 12 Wochen *p.i.* lebten (3, 4, 5, 8, 10, 14, A, B, C, D). In diesen Gruppen A und B war lediglich ein Tier ohne besonderen Befund. Bei vier Tieren aus der Gruppe A, die vier Wochen *post infectionem* euthanasiert wurde, wurden sehr deutliche Organveränderungen gefunden.

Gruppe C (Kontaktgruppe) und Gruppe D (Kontrollgruppe):

Bei den Tieren der Gruppe C (21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 33, 34), konnten acht Wochen nach Versuchsbeginn nur wenige pathologische Veränderungen in der Sektion beschrieben werden. Bei fünf Tieren wurden keine Veränderungen festgestellt. Auch die Tiere der Gruppe D hatten nach zwölf Wochen nur wenige und geringgradige Veränderungen, zwei von vier Tieren waren ohne pathologischen Befund.

Die Kontakt- und Kontrolltiere zeigten demnach insgesamt weniger und geringgradigere pathologische Veränderungen als die Tiere der experimentell infizierten Gruppe, bei denen die Tiere der Gruppe A nach vier Wochen vermehrt pathologische Veränderungen aufwiesen, vier sogar in hochgradigem Maß, als die Tiere der Gruppe B, die nach 12 Wochen euthanasiert und pathologisch untersucht wurden.

3. Bornavirus –rRT-PCR

Bei der Untersuchung zum Nachweis von ABV-RNA mittels rRT-PCR nach Honkavuori et al. (2008) wurden 141 Blut- und 145 Kloakentupferproben einbezogen, also alle im Versuchszeitraum von den Wachteln genommene Proben dieser Art. Außerdem wurden stichprobenhaft neun Kammerwasserproben, die von den Wachteln 21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 32 und 33 stammten, und 18 Gehirngewebeproben von den Tieren 1, 6, 7, 9, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 32 und 33 einbezogen. RNA von aviären Bornaviren wurde in den untersuchten Proben weder in Blut- und Kloakentupferproben noch in Kammerwasser oder Gehirn nachgewiesen. Die verwendeten Positivkontrollen zeigten stets positive Amplifikationssignale mit den erwarteten Ct-Werten.

4. Serologie

Exemplarisch wurden Seren der Tiere aus der Kontroll-, Kontakt- sowie der experimentell infizierten Gruppe von Tag 0, 14, 28 (hier jeweils Proben der aus der infizierten Gruppe 1, 7, 9, 15, 16, 19, 20), Tag 42 (Proben aus der infizierten Gruppe und der Kontrollgruppe 2, 3, 5, 8, 10, 11, 13, 14, A, 22, 27, 29, 31), Tag 56 (Proben der Kontaktgruppe 21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 33, B) und Tag 70 (Proben der infizierten Gruppe und der Kontrollgruppe 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, A, B, 22, 27, 29, 31) in die Untersuchung mittels ELISA mit einer 1:20 log₂-Verdünnung (Tag 0, 14, 28) bzw. mit einer 1:100 log₂-Verdünnung (Tag 42, 56, 70) einbezogen (Tabelle 5, Abbildung 2 - 7).

In den untersuchten Seren aller Versuchsgruppen konnten keine ABV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die gemessenen OD-Werte der Wachtelseren lagen fast ausnahmslos unter dem „Cut off“ von 0,39 OD für die Diskriminierung von positiven und negativen Seren, der als Mittelwert der OD des Präimmunserums (# 998) bei einer 1:100 Verdünnung plus der 5-fachen Standardabweichung berechnet wurde.

Die Ergebnisse der Messung der exemplarisch ausgewählten Wachtelseren aus den verschiedenen Gruppen lagen auch bei einer Serumverdünnung von 1:20 mit einer Ausnahme immer in einem Bereich bis etwa 0,3 OD. Nur das Serum der Wachtel 21 (ein Tier der Kontaktgruppe) an Tag 56 erreichte eine OD von 0,5595.

Im Versuchszeitraum, also von Tag 0 über Tag 14, 28, 42 und 56 bis zu Tag 70 wurde bei den Seren der Versuchswachteln kein auffälliger Anstieg der OD-Werte beobachtet.

Die Positivkontrolle 998 stellte sich bei allen Messungen mit deutlich höherer Absorption als die Wachtelseren dar, und zwar sogar noch bei einer Verdünnungsstufe von 1: 2560. Die OD der Positivkontrolle verringerte sich dabei mit zunehmender Verdünnung.

Bei der Untersuchung der Seren auf einer Platte ohne Antigenbeschichtung wurden stets OD-Werte in einer Höhe von etwa 0,02 bis 0,06 gemessen, auch bei der verwendeten Positivkontrolle. Die OD-Werte lagen damit meist deutlich niedriger als die OD-Werte, die bei Einsatz des ABV-Antigens ermittelt wurden. Dieser Unterschied fiel bei der Positivkontrolle besonders deutlich aus. Es ergaben sich also keine Hinweise auf unspezifische Reaktionen der Seren mit Proteinen der verwendeten Puffer oder mit der ELISA-Platte.

Tabelle 5: Mittelwerte der OD mit SD exemplarischer ELISA-Untersuchungen aus den einzelnen Versuchsgruppen mit Angabe der Maximalwerte des jeweiligen Untersuchungstages

Tag	998	998PI	Kontrollegruppe	Kontaktgruppe	Infektiongruppe
0	2,9930	0,2280			0,2744 +/- 0,0378 Maximalwert Tier 9: 0,35
14	2,6980	0,1380			0,2039 +/- 0,0473 Maximalwert Tier 9: 0,29
28	2,4910	0,1250			0,1989 +/- 0,0479 Maximalwert Tier 18: 0,269
42	2,5985	0,139	0,165 +/- 0,057 Maximalwert Tier 27: 0,213		0,174 +/- 0,061 Maximalwert Tier 14: 0,284
56	2,446	0,076		0,216 +/- 0,136 Maximalwert Tier 21: 0,559	
70	2,5985	0,139	0,113 +/- 0,03 Maximalwert Tier 27: 0,1515		0,173 +/- 0,097 Maximalwert Tier 10: 0,2565

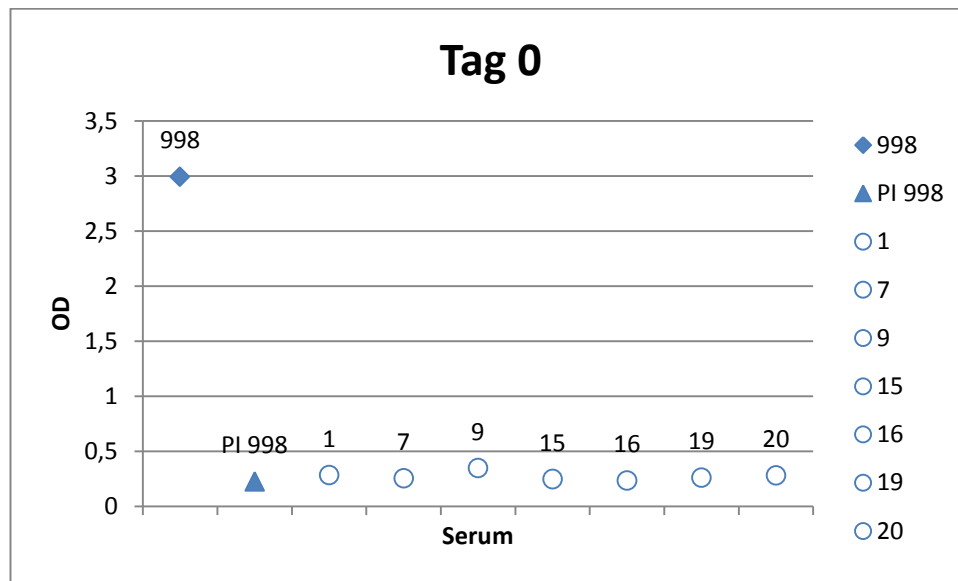


Abbildung 1: Im ABV-ELISA ermittelte Absorptionen an Tag 0 von PI 998, 998 und von Tieren aus der Infektionsgruppe

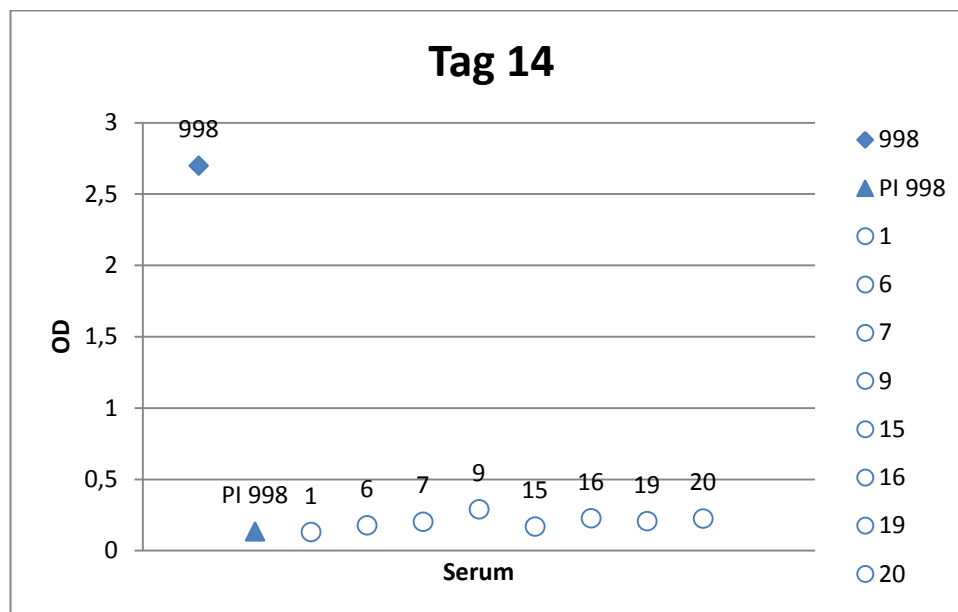


Abbildung 2: Im ABV-ELISA ermittelte Absorptionen an Tag 14 von PI 998, 998 und von Tieren aus der Infektionsgruppe

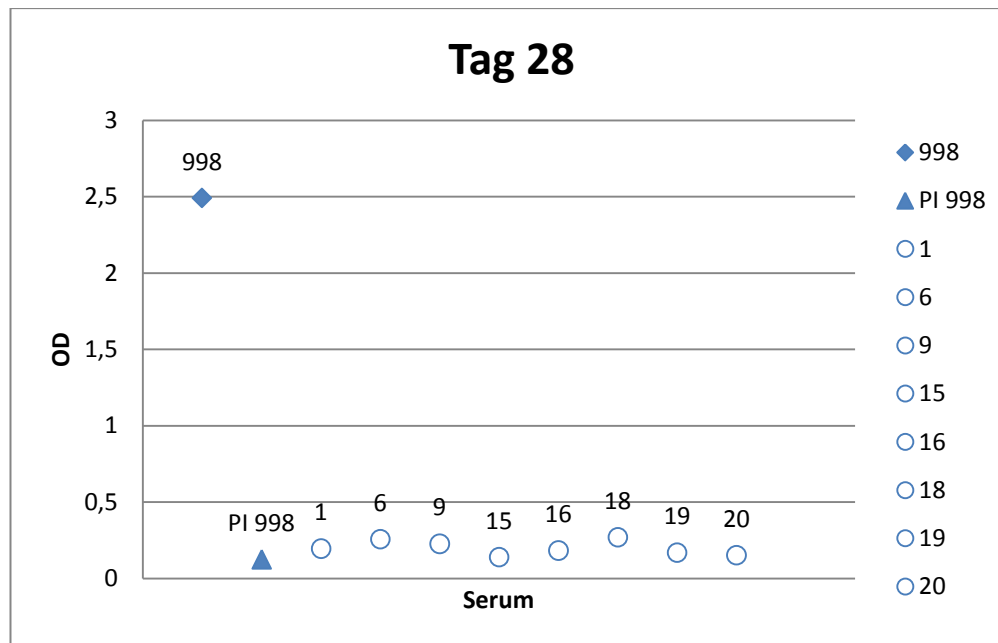


Abbildung 3: Im ABV-ELISA ermittelte Absorptionen an Tag 28 von PI 998, 998 und von Tieren aus der Infektionsgruppe

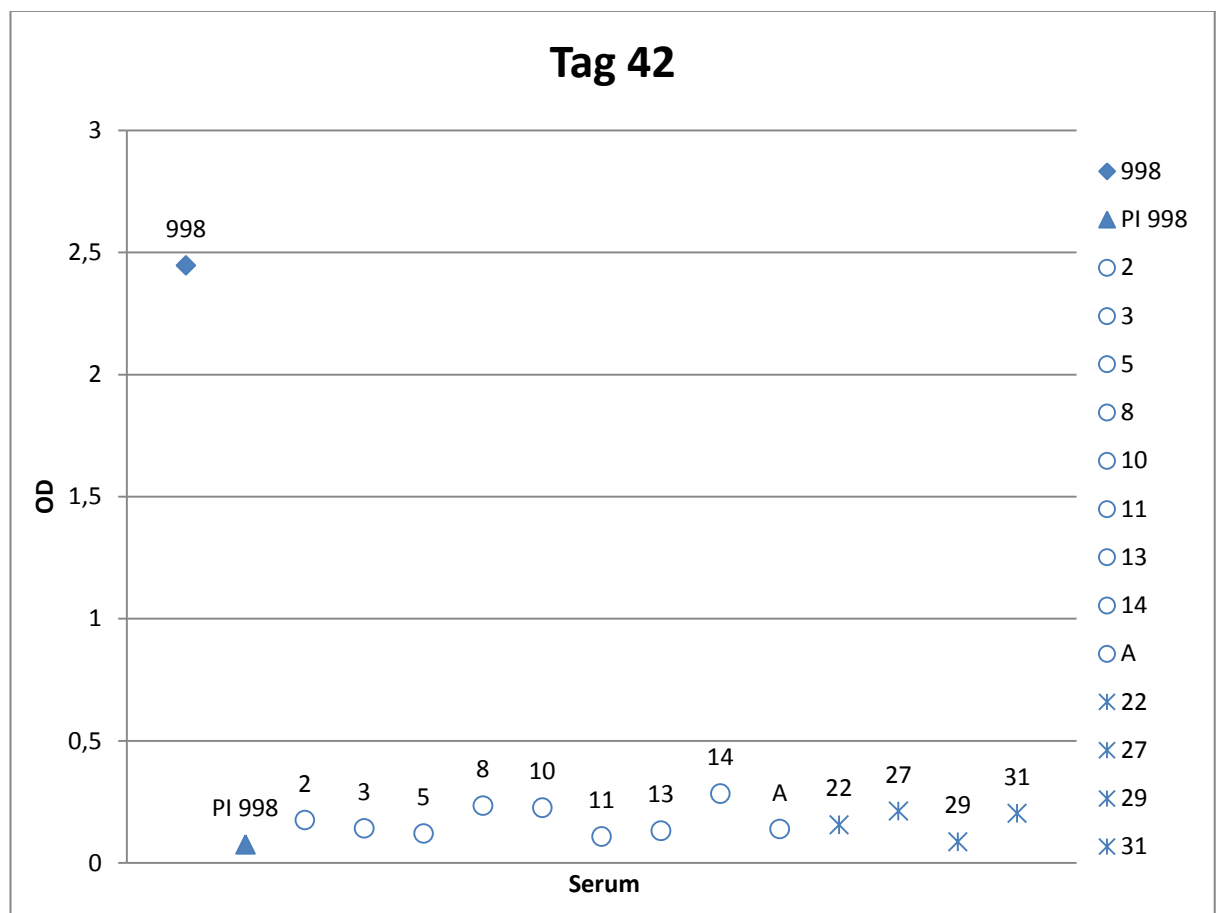


Abbildung 4: Im ABV-ELISA ermittelte Absorptionen an Tag 42 von PI 998, 998 und von Tieren aus der Infektionsgruppe und Kontrollgruppe (alle)

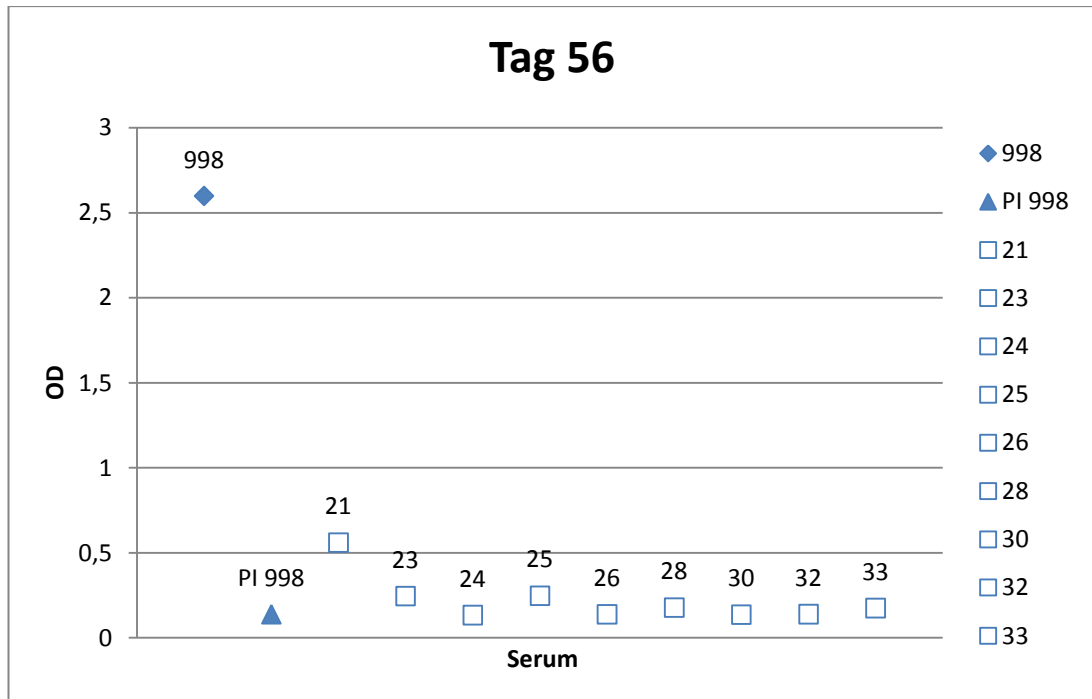


Abbildung 5: Im ABV-ELISA ermittelte Absorptionen an Tag 56 von PI 998, 998 und von Tieren aus der Kontaktgruppe

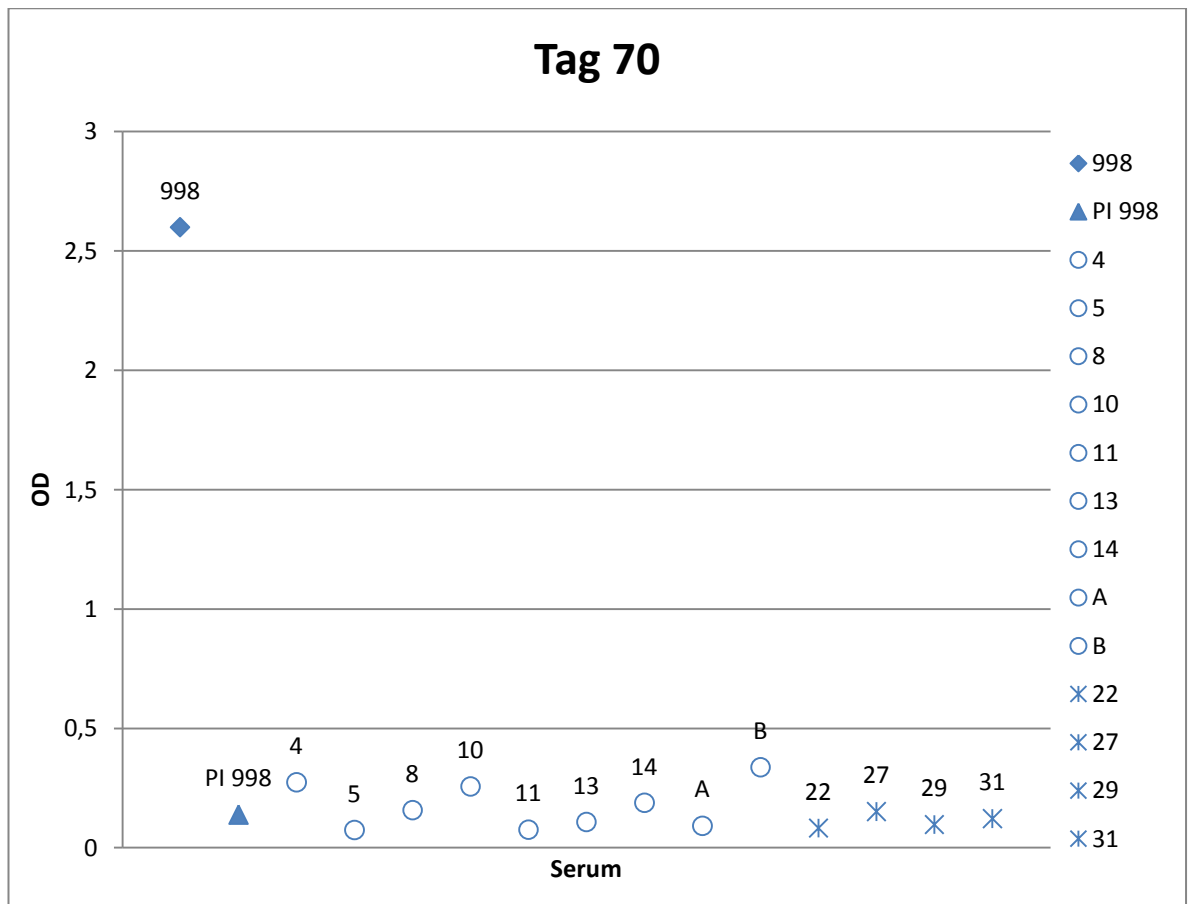


Abbildung 6: Im ABV-ELISA ermittelte Absorptionen an Tag 70 von PI 998, 998 und von Tieren aus der Infektionsgruppe und Kontrollgruppe (alle)

5. Histologie

Exemplarisch wurden die Organproben von drei Tieren ausgewählt und untersucht. Tier 9 hatte in der Augenuntersuchung beidseits Chorioretinitis und in der pathologisch-anatomischen Untersuchung Auffälligkeiten an der Leber und der Niere gezeigt. Dieser Vogel wurde an Tag 28 euthanasiert.

Tier 10 hatte beidseits eine Chorioretinitis. In der Sektion waren zudem eine Fettleber sowie ein gefäßgezeichneter Drüsenmagen und aufgegaste Blinddärme aufgefallen. Dieses Tier wurde an Tag 84 *p.i.* euthanasiert. Beide Wachteln gehörten zu den Gruppen der experimentell infizierten Tiere, ihnen war das Virusmaterial in PBS okulonasal appliziert worden.

Bei Tier 21 waren in der Sektion keine pathologischen Befunde erhoben worden. Eine Chorioretinitis war an beiden Augen aufgetreten. Dieses Tier gehörte zur Kontaktgruppe, wurde acht Wochen nach Versuchsbeginn euthanasiert und hatte einen vierwöchigen Kontakt zu der Gruppe, der das Virusmaterial okulonasal eingetropt wurde.

Die Beurteilung der histologischen Schnittpräparate wurde freundlicherweise von Frau Prof. Helga Gerlach durchgeführt.

Tier 9, infizierte Gruppe:

Herz: o.b.B.

Leber: leichte Fettleber; mäßige Stauungshyperämie; vereinzelte Hepatozyten und Kupffer'sche Sternzellen zeigen winzige braune Partikel in Kern und/oder Zytoplasma

Niere: mäßige Stauungshyperämie; Glomeruli o.b.B.; Tubuli o.b.B.

Muskelmagen: o.b.B.

Drüsenmagen: o.b.B.

Duodenum: beginnende Autolyse

Rückenmark: o.b.B.; einige Ependymzellen mit winzigen braunen Partikeln im Zytoplasma

Gehirn: Cerebrum mit Proliferation und Syncytien von Ependymzellen; sonst o.b.B.

Auge: nicht beurteilbar

Beurteilung

- Verschiedene Organe mit Zellen, die winzige braune Partikel zeigen

- Leichte Fettleber

Tier 10, infizierte Gruppe:

Herz: Verlust der Querstreifung

Niere: Stauungshyperämie; viele Venen ganz oder teilweise leer; Glomeruli o.b.B.; Tubuli o.b.B.

Leber: Stauungshyperämie; mäßige Fettleber

Muskelmagen: ödematöse Auerbach'sche Ganglien, neuropile Vakuolisierung, Anhäufung von Zellen ohne Differenzierungsmöglichkeit; an Stellen mit abgelöster Koilinschicht ist der Mukosasaum braunlich gefärbt

Drüsenmagen: o.b.B.

Duodenum: o.b.B.

Rückenmark: o.b.B.

Gehirn: Cerebellum: Schlitze in einigen großen Neuronen im Zentrallobus; Cerebrum: Dilatation von Virchow-Robin'schen Räumen; Proliferation und Syncytia von Ependymzellen

Auge: nicht beurteilbar

Beurteilung

- Auerbach'sche Ganglien und Nervenstränge ödematös und Hyperplasie der Schwann-Zellen
- Cerebellum mit Degeneration einiger Mitochondrien in großen Neuronen
- Proliferation und Syncytienbildung von Ependymzellen
- Mäßige Fettleber

Tier 21, Kontaktgruppe

Herz: o.b.B.

Leber: mäßige Stauungshyperämie; mäßige Fettleber; in einigen Randgebieten Hepatozyten mit leicht bräunlich gefärbtem Zytoplasma

Niere: Stauungshyperämie; Glomeruli liegen fest in ihren Kapseln; einzelne Epithelzellen der parietalen Membran sind geschwollen und leicht braun gefärbt; die proximalen Tubuli und einige Sammelröhrchen zeigen Epithelzellen, die mit bräunlich gefärbten Partikeln "schaumig" gefüllt sind; in der HE-Färbung fehlt der Bürstensaum und es liegt eine beginnende Tubulonephrose mit Vakuolen in einzelnen Epithelzellen vor

Drüsenmagen: o.b.B.

Duodenum: o.b.B.

Gehirn: Cerebellum: mit Ödemata unter den Meningen; Diencephalon: Hyperämie und leichtes Ödem unter den Meningen; wenige Neuronen mit Schlitzten; Cerebrum: Dilatation Virchow-Robin'scher Räume

Rückenmark: o.b.B.

Auge: Vakuolen in der Ganglienzellschicht der Retina, sonst o.b.B.

Beurteilung:

- Tubulonephrose
- Mäßige Fettleber
- Vakuolen in der Ganglienzellschicht der Retina

Bei der histologischen Untersuchung dieser Tiere wurden also keine PDD-typischen Veränderungen wie ausgeprägte lymphoplasmazytäre Infiltrate oder typische perivaskuläre Cuffs gefunden. Ferner konnte auch keine Proliferation der Gliazellen oder eine Infiltration der Ganglien ermittelt werden.

6. Immunhistologie

In der immunhistologischen Untersuchung sollte ABV-Virusantigen in Wachtelorganen oder -gewebe mit einem polyklonalen Antikörper gegen das N-Protein nachgewiesen werden. Dabei wurden histologische Schnitte von jeweils zehn unterschiedlichen Organen der Wachteln 9, 10 und 21 einbezogen. Diese Tiere wurden, wie oben dargestellt, parallel einer histopathologischen Untersuchung unterzogen. Tier 9 stammte aus der Gruppe A, war also experimentell mit ABV infiziert und 28 Tage *p.i.* euthanasiert worden, während Tier 10 der Gruppe B angehörte, also den experimentell infizierten Tieren, die 84 Tage *p.i.* euthanasiert wurden. Wachtel 21 war ein Tier der sogenannten Kontaktgruppe und wurde 56 Tage nach Versuchsbeginn und somit nach 28-tägigem Kontakt mit experimentell infizierten Wachteln euthanasiert.

Antigen von aviären Bornaviren wurde in keinem Organ oder Gewebe der Wachteln nachgewiesen. Die als Positivkontrolle parallel mitgeführten Organschnitte von ABV-positiven Papageien ergaben stets eine braune oder rote Farbreaktion, die ABV-Antigen anzeigt.

V. DISKUSSION

Seit 2008 werden ABV als Erreger für die neuropathische Drüsenmagendilatation angesehen, eine vor allem bei papageienartigen Vögeln vorkommende (Honkavuori et al. 2008; Kistler et al. 2008; Rinder et al. 2009) und seit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts beschriebene Magen-Darm- und ZNS-Erkrankung (Mannl et al. 1986; Bond et al. 1993; Berhane et al. 2001). Da es sich um eine sehr schwere Erkrankung mit letalem Ausgang handelt, für die bisher nur palliative Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen (Ridgway und Gallerstein 1983; Phalen 1986; Joyner et al. 1989; Dahlhausen 2001; Grund 2004; Gray et al. 2010) und fundierte Erkenntnisse unter anderem zur Therapie noch völlig fehlen, besteht ein großer Forschungsbedarf, damit betroffenen Patienten geholfen und diese weltweit verbreitete Erkrankung eingedämmt werden kann. Da Papageien in Hinblick auf Anspruch, Wahrnehmung, Empfindung, Entwicklung und Kognitionsfähigkeit sehr weit entwickelt sind (Huber und Gajdon 2006; Pepperberg 2006a, 2006b, 2010), sollte im Rahmen dieser Studie ein geeignetes Tiermodell für die aviäre Bornaforschung aus dem Geflügelbereich gefunden werden.

Ziel dieser Studie war es daher, zu ermitteln, ob sich die Japanische Wachtel als Tiermodell für die experimentelle Forschung mit aviären Bornaviren und für die Neuropathische Drüsenmagendilatation eignet. Die Wachtel wurde ausgewählt, weil sich die Wachtelembryofibroblastenzelllinie CEC-32 besonders gut für die Anzucht von ABV eignete (Rinder et al. 2009). Ihre Zucht-, Haltungs- und Entwicklungsvorzüge, und zwar ihre geringe Größe, der daraus folgende geringe Platzanspruch und Futterbedarf, die schnelle Embryonalentwicklung und frühe Geschlechtsreife, machen sie prinzipiell zu einem sehr populären Forschungsmodell (Kiwitt 2006; Bernhardt und Kühne 2007; Köhler 2007). Seit den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die Japanische Wachtel als Modelltier für virusbedingte Erkrankungen herangezogen (Jeong et al. 2009; Poynter et al. 2009; Giannecchini et al. 2010; Wakenell et al. 2010). In diesen Studien erfolgte die Infektion der Versuchstiere sehr häufig nicht nur intranasal, oral oder intraokulär, sondern zusätzlich oder ausschließlich intramuskulär, intrazerebral oder intaabdrominal (Pienta und Groupé 1967; Salter et al. 1999; Poynter et a. 2009; Wakenell et al. 2010).

In der hier vorgestellten Untersuchung wurden Japanische Wachteln mit einem in CEC-32-Zellen angezüchteten und aufgereinigten ABV-Isolat des Genotyps 4 okulonasal infiziert. Anschließende diagnostische Tests zum Nachweis von Virus-RNA oder Antikörpern sowie klinische, pathologische und histopathologische Untersuchungen über einen Zeitraum von drei Monaten ergaben keine Hinweise auf eine Erkrankung oder Virusvermehrung in den Versuchstieren.

Bei dem in dieser Studie verwendeten Protokoll zum Nachweis von ABV-RNA handelte es sich um ein rRT-PCR-Verfahren, das von Honkavuori et al. (2008) entwickelt wurde und im Vergleich mit den bisher publizierten konventionellen PCR-Protokollen zumindest für ABV-4 die höchste Sensivität besitzt (M. Rinder, persönliche Mitteilung). Es ist außerdem bekannt, dass das in dieser Studie verwendete Isolat 6758, das dem Genotyp 4 zuzuordnen ist, mit der verwendeten Primer-Sonden-Kombination sicher erkannt wird (Rinder et al. 2009). In der vorliegenden Studie wurde mit diesem Test in Kloakentupfern und im Blut der Wachteln über den gesamten Versuchszeitraum sowie in einzelnen Kammerwasserproben ABV-RNA nicht nachgewiesen. Da frühere Untersuchungen ergeben hatten, dass insbesondere im Gehirn infizierter Tiere in der Regel sehr hohe ABV-RNA-Konzentrationen vorkommen, wurden auch Gehirnproben ausgewählter Tiere in die PCR-Testung einbezogen und auch in diesen Organen wurde ABV-RNA nicht festgestellt.

Zum Nachweis von Antikörpern gegen ABV bei Wachteln mußte zunächst ein serologischer Test etabliert werden. Dazu wurde einer Wachtel Blut für die Gewinnung des Präimmunsersums, also des Negativ-Kontrollserums, entnommen. Diese Wachtel wurde anschließend mit rekombinantem ABV-N-Protein immunisiert und so ein Positiv-Kontrollserum erzeugt. Der ABV-N-ELISA für die Japanische Wachtel wurde in Anlehnung an den von Adrian et al. (2010) für Psittaziden entwickelten ABV-N-ELISA etabliert. Mit diesem Test wurden exemplarisch Seren von Wachteln aus verschiedenen Gruppen bis zum Tag 70 *p.i.* sowie das Positiv- und das Negativkontrollserum untersucht. Während das Positivkontrollserum eine deutliche Absorption ergab und somit die Existenz spezifischer ABV-N-Antikörper im Serum dieser Wachtel angezeigt wurde, lagen die Absorptionen, die für die Versuchswachtel gemessen wurden, stets im Bereich des ermittelten Cut-offs von 0,39 OD. Der auf der Basis der Negativkontrollen ermittelte Grenzwert für diesen ELISA wurde von den Seren der Versuchswachteln bis auf eine Ausnahme nicht überschritten. Die Werte für die

Absorption unterschieden sich zudem nicht zwischen den experimentell infizierten Wachteln und den nicht infizierten Kontrolltieren. Sie veränderten sich außerdem nicht im Lauf des Versuchs, so dass auch nicht auf einen Titeranstieg im Lauf der Zeit gefolgert werden kann. Die Untersuchungen mittels ELISA ergaben also keinerlei Hinweise auf eine erfolgreiche Infektion der Versuchswachteln mit der Konsequenz einer spezifischen Antikörperbildung.

In der vorliegenden Untersuchung der Wachteln wurden ELISA und RNA-Nachweismethoden kombiniert, da dies nach gegenwärtigen Erkenntnissen als sicherste Diagnose zum Nachweis einer ABV-Infektion angesehen wird (Hoppes et al. 2010; Rinder et al. 2011). Zusätzlich wurden bei drei ausgewählten Wachteln immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis von ABV-Antigen im Gewebe durchgeführt. Dabei wurde ABV-Antigen nicht nachgewiesen und somit die Ergebnisse von rRT-PCR und ELISA bestätigt.

Anzeichen für eine PDD-Erkrankung der Wachteln wurden weder bei der täglichen Adspektion und regelmäßigen klinischen Untersuchung noch bei der pathologischen Untersuchung festgestellt. Die Vögel hatten zu jeder Zeit des Versuchsverlaufs einen guten Ernährungszustand, und Unterschiede zwischen den infizierten und nicht-infizierten Tieren wurden nicht nachgewiesen. Viele Wachteln zeigten zwar Chorioretinitiden, also Augenveränderungen, die bei mit ABV infizierten und an PDD erkrankten Papageienvögeln signifikant gehäuft auftreten (Korbel und Rinder 2011), das Auftreten war aber auf alle Versuchsgruppen der Wachteln verteilt und kam auch bei den Kontrollvögeln der Gruppe D vor. Bei der Chorioretinitis handelt es sich allerdings um ein unspezifisches Symptom, das bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen, auch bei Infektionserkrankungen wie zum Beispiel der Newcastle Krankheit (Obaldia und Hanson 1989; Shivaprasad 1999; Schwaller 2002) oder Herpesvirusinfektionen (Korbel 1994) auftreten kann. Auch bei der Bornaschen Krankheit des Pferdes wurden Augenveränderungen beschrieben (Ludwig et al. 1984; Bode 1999). Die für die in der vorliegenden Untersuchung festgestellten Augenveränderungen infrage kommenden Ursachen sind unbekannt.

Ähnlich verhält es sich mit den bei der Sektion festgestellten Organveränderungen, die in allen Versuchsgruppen festgestellt wurden und somit nicht mit der ABV-Infektion in Zusammenhang zu bringen sind. Schwerpunktmäßig zeigten sich Veränderungen an der Niere und der Leber sowie im Magen-Darm-Trakt v.a. an den Blinddärmen. Einen Zusammenhang zwischen

dem Alter der Tiere und einer Zunahme der pathologischen Veränderungen konnte auch nicht festgestellt werden. Die Veränderungen entsprechen zudem nicht dem typischen Bild einer PDD-ähnlichen Erkrankung, bei der sich in der Sektion ein dilatierter Drüsenmagen mit papierdünner Wand und massiver Futteranschofung durch schlecht verdautes Körnerfutter (Rinder et al. 2010), ein angefüllter Oesophagus und/oder Kropf (Turner 1984; Phalen 1986; Berhane et al. 2001), ein dilatierter Dünndarm (Degernes et al. 1991; Shivaprasad et al. 1995; Berhane et al. 2001) oder Enteritiden (Joyner et al. 1989) zeigen. Ursachen für das häufige Auftreten von pathologischen Befunden bei den in dieser Untersuchung verwendeten Wachteln sind unbekannt. Leider liegen Vergleichsdaten über pathologische Untersuchungen von gleichartigen Wachteln der gleichen Zuchtlinie/ Herkunftsbetriebes nicht vor, so dass nicht beurteilt werden kann, ob die hier beobachteten Veränderungen für diese Tiere im „normalen“ Bereich liegen, also vielleicht ernährungs- und zuchtlinienbedingt sind.

Die hier dargestellten Untersuchungsergebnisse lassen demnach den Schluss zu, dass die Japanische Wachtel wahrscheinlich kein geeignetes Modell für Infektionsstudien mit ABV und PDD ist.

Bisher im wissenschaftlichem Schrifttum dokumentiert wurden erfolgreiche Infektionsstudien mit ABV bei Nicht-Psittaziden lediglich bei einer Art und zwar bei Khaki Campbell Enten (*Anas platyrhynchos*) (Gray et al. 2010). Eine in einem Kongressbericht erwähnte erfolgreiche Infektion mit Hühnern (Gancz et al. 2009b) ließ sich später nicht mittels Sequenzierung von PCR-Produkten bestätigen (A. Gancz persönliche Mitteilung an PD Dr. M. Rinder von 8. August 2011). Daneben existieren Publikationen zu experimentellen ABV-Infektionen nur bei zwei Psittazidenarten, und zwar bei Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) (Gancz et al. 2009a; Gregory et al. 2011; Payne et al. 2011; Piepenbring et al. 2011) und Felsensittichen (*Cyanoliseus patagonis*) (Gray et al. 2010), also bei Vögeln, bei denen ABV-Infektionen und die Neuropathische Drüsenmagendilatation auch natürlicherweise vorkommen.

Die bisher als erfolgreich beschriebenen Infektionsexperimente unterscheiden sich in einigen Aspekten von der hier durchgeführten Studie. Die Unterschiede betreffen Zahl, Alter und Herkunft der Versuchstiere, Art des zur Infektion verwendeten Materials, die Versuchsdauer sowie den Nachweis einer erfolgreichen Infektion und PDD-Erkrankung. Im Folgenden sollen diese Unterschiede zunächst für das Khaki-Campbell-Enten-Experiment und dann

vergleichend auch für die Versuche mit Psittaziden dargestellt werden.

Wie im Kapitel Material und Methoden ausführlich dargestellt ist, wurden in der vorliegenden Studie 35 Wachteln, die aus der Versuchstierzucht des Instituts für Tierernährung stammten, verwendet. Sie waren zwar nicht spezifiziert pathogenfrei, wurden aber direkt vom Zuchtbetrieb in den Infektionsstall der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der LMU München gebracht und dort unter strikten Biosecurity-Maßnahmen gehalten. Vor Versuchsbeginn wurde die Freiheit von aviären Bornaviren nachgewiesen. Für die Infektion wurde ein ABV-4-Virusstock verwendet, der in CEC-32-Zellen vermehrt und aufgereinigt worden war. Pro Tier wurde eine Dosis von 10^4 ffu okulonasal verabreicht. Über eine Versuchsdauer von 12 Wochen (86 Tage) wurden in regelmäßigen Intervallen klinische, virologische und nach Euthanasie der Tiere auch pathologische und histologische Untersuchungen durchgeführt. Die Wachteln zeigten zu keinem Zeitpunkt klinische Symptome oder pathologische Veränderungen, die auf eine ABV-Infektion oder PDD hinweisen könnten, und Virus-RNA oder Antikörper wurden nie nachgewiesen. Bei dem ABV-Infektionsversuch mit Stockenten der Rasse Khaki Campbell (Gray et al. 2009) wurden insgesamt 33 spezifiziert-pathogenfreie fünf Tage und acht Wochen alte Enten verwendet. Die Tiere wurden mit einem in Enten-Embryofibroblasten angezüchteten ABV-4-Isolat simultan oral, intraokulär und durch Injektion in den Brustmuskel infiziert. Die pro Tier verwendete Infektionsdosis wurde allerdings nicht angegeben. Die Enten entwickelten wie die Wachteln keine klinischen Symptome und keine pathologischen oder histopathologischen Veränderungen (Hoppes et al. 2010), allerdings wurde Virus-RNA 20 Wochen *p.i.*, also bei Versuchsende, im Gehirn nachgewiesen (Gray et al. 2009). ABV-Antikörper wurden bei den Enten ebenfalls festgestellt, aber es existieren über den Zeitpunkt des Erstdachweises widersprüchliche Angaben. So wurden bei Gray et al. (2009) 12 Wochen *p.i.* und bei Hoppes et al. (2010), wo der Versuch ebenfalls beschrieben wurde, drei Wochen *p.i.* angegeben.

Bei der Betrachtung der Infektionsversuche mit Psittaziden, also mit Nymphensittichen (Gancz et al. 2009a; Gregory et al. 2011; Payne et al. 2011; Piepenbring et al. 2011) oder Felsensittichen (Gray et al. 2010), zeigte sich hinsichtlich der Herkunft und Vorgeschichte der Vögel, dass oft nur wenig Informationen vorlagen. So stammten die verwendeten Versuchstiere von lokalen Züchtern (Gancz et al. 2009a; Payne et al. 2011) oder aus Privathaltung (Gray et

al. 2010), also aus wenig standardisierten und kontrollierten Haltungen oder die Herkunft wurde nicht angegeben (Gregory et al. 2011; Piepenbring et al. 2011). Bei einigen von Gancz et al. (2009a) und Payne et al. (2011) eingesetzten Nymphensittichen wurden natürliche ABV-Infektionen zumindest bei einem Teil der Tiere nachgewiesen. Bei Gancz et al. (2009a) wurde ein betroffener Vogel aus dem Versuch ausgeschlossen. Die Felsensittiche (Gray et al. 2010) waren Ausscheider von psittazinen Herpesviren. Ob diese natürlichen Infektionen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben, ist unklar, zumindest werden aber bei Payne et al. (2011) ungewöhnlich starke histopathologische Veränderungen bei den infizierten Tieren mit der im Versuch erfolgten Hyperinfektion erklärt.

Mit Ausnahme der Studie von Piepenbring et al. (2011) wurden bei den Infektionsversuchen mit Psittaziden nur sehr geringe Tierzahlen eingesetzt. In der Untersuchung von Gancz et al. (2009a) bildeten drei Nymphensittiche die Infektionsgruppe und zwei die Kontrollgruppe. Payne et al. (2011) verwendeten vier Nymphensittiche zur experimentellen Infektion und zwei als Kontrolltiere, während im Versuch von Gregory et al. (2011) vermutlich zwei Nymphensittiche beteiligt waren. In der Studie von Gray et al. (2010) wurden zwei Felsensittiche experimentell infiziert und ein Vogel als Kontrolle gehalten. In der Untersuchung von Piepenbring et al. (2011) bildeten 18 Sittiche die Infektionsgruppe und vermutlich sechs die Kontrollgruppe.

Die Art und Menge sowie die Applikationsweise des in den einzelnen Infektionsversuchen verwendeten Virusmaterials war ebenfalls sehr unterschiedlich. Die bei Gancz et al. (2009a) verwendeten Nymphensittiche wurden mit Gehirnhomogenat aus einem natürlich infizierten Graupapagei parallel oral, intranasal, intramuskulär und intraokulär infiziert. Die Infektionsdosis ist unbekannt. In den Studien von Gray et al. (2010) und Payne et al. (2011) wurde Zellkulturmaterial, und zwar Enten-Embryofibroblasten mit ABV-4 zur peroralen und gleichzeitig intramuskulären Infektion verwendet, pro Felsensittich bzw. Nymphensittich wurden 8×10^4 ffu eingesetzt. In den bisher publizierten Abstracts von Piepenbring et al. (2011) und Gregory et al. (2011) fehlen detaillierte Angaben zum Material und zur Dosis, in beiden Studien wurden aber vermutlich Viren aus Zellkultur verwendet.

Mit Ausnahme der Studie von Gregory et al. (2011) wurde bei allen erwähnten Infektionsversuchen mit Psittaciformes über eine erfolgreiche Infektion, nachgewiesen über Virus-RNA oder die Ausbildung von Antikörpern, berichtet.

Zudem wurde in diesen erfolgreich verlaufenen Infektionen gleichzeitig die Entwicklung von PDD typischen Krankheitserscheinungen oder von pathologischen Veränderungen zumindest bei einem Teil der verwendeten Vögel dokumentiert (Gancz et al. 2009a; Gray et al. 2010; Payne et al. 2011; Piepenbring et al. 2011). Virus-RNA wurde bei den Versuchstieren postmortal in inneren Organen nachgewiesen (Gancz et al. 2009a; Gray et al. 2010; Payne et al. 2011; Piepenbring et al. 2011) oder, falls untersucht, auch in Choanentupfer- oder Kotproben bei lebenden Vögeln ab Tag 60 (Felsensittiche, Gray et al. 2010), Tag 19 (Nymphensittiche, Piepenbring et al. 2011) und Tag 85 (Nymphensittiche, Payne et al. 2011). Antikörpernachweise mittels Western blot gelangen bei den Felsensittichen bereits 33 Tage *p.i.* (Gray et al. 2010).

Bei Gancz et al. (2009a) wurden typische klinische Symptome einer PDD erstmals bereits 21 Tage nach der Infektion beobachtet, während bei Payne et al. (2011) ein Todesfall und Erkrankungen erst an Tag 92 bzw. 110 auftraten. Auch die beiden bei Gray et al. (2009) infizierten Felsensittiche entwickelten starke klinische Symptome einer PDD. Nach 66 Tagen verstarb ein Tier, das andere wurde wegen seines schlechten klinischen Zustandes euthanasiert.

Bei Vergleich des hier vorgestellten eigenen Infektionsversuchs mit den bereits publizierten fällt primär der gewählte Infektionsweg auf, durch den sich der Wachtelversuch von den anderen unterscheidet. So wurden die Wachteln ausschließlich okulonasal infiziert, während in anderen Studien multiple Wege der Virusapplikation gewählt wurden, dabei stets auch intramuskuläre Injektionen. Ob damit der im Vergleich zum Entenversuch fehlende RNA- und Antikörpernachweis erklärt werden kann, muss Spekulation bleiben. Zur bei den Enten eingesetzten Infektionsdosis (Gray et al. 2010) wurden keine Angaben gemacht. Zumindest entspricht aber die in der vorliegenden Studie bei den Wachteln eingesetzte Virusmenge in etwa derjenigen, die bei den Felsensittichen (Gray et al. 2010) und in einer Nymphensittichstudie (Payne et al. 2011) verwendet wurde.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Versuch 12 Wochen *p.i.* beendet. Die Versuchsdauer ist damit etwas kürzer als bei den Campbell-Enten mit 20 Wochen. Allerdings wurden bei den Enten Antikörper bereits 12 Wochen, möglicherweise auch bereits drei Wochen *p.i.* nachgewiesen (Gray et al. 2010; Hoppes et al. 2010), also in einem Zeitraum, der von der hier dargestellten Studie abgedeckt wurde. Ob die infizierten Wachteln möglicherweise nach einem

längeren Zeitraum als 12 Wochen Antikörper entwickelt hätten, kann nicht abschließend geklärt werden.

Die bisher publizierten Infektionsversuche belegen also, dass sich bei Psittaziden, und zwar bei Nymphensittichen und Felsensittichen, eine ABV-Infektion etablieren und gleichzeitig das klinische Bild einer PDD erzeugen lässt. Bei Enten der Rasse Khaki Campbell ist aus den veröffentlichten Ergebnissen zu folgern, dass hier zwar eine experimentelle ABV-Infektion möglich ist. Allerdings trat das klinische Bild einer PDD bei diesen Tieren nicht auf. Die Campbell-Enten sind daher als Modell für Forschungen zur PDD nicht geeignet. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse virologischer, klinischer, pathologischer und histologischer Untersuchungen zu einem ABV-Infektionsversuch mit Wachteln belegen nicht eine Eignung dieser Tierart als Modelltier für ABV und PDD. Derzeit steht also ein geeignetes Versuchstier als Ersatz für Psittaziden nicht zur Verfügung.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aviäre Bornaviren (ABV) wurden im Jahr 2008 erstmals beschrieben und mit der Neuropathischen Drüsenmagendilatation, der bei Papageienvögeln bedeutendsten Magen-Darm-Erkrankung in Verbindung gebracht.

Bisher existieren erfolgreiche ABV-Infektionsversuche mit Erzeugung des klinischen Bildes einer PDD lediglich für Psittaziden. Ein geeignetes Tiermodell, mit dessen Hilfe man auf die Verwendung von Papageien, die sich durch eine stark ausgeprägte Kognitions- und Wahrnehmungsleistung auszeichnen und hohe Ansprüche an die Haltungsbedingungen stellen, verzichten könnte, fehlt bisher noch. In-vitro-Versuche mit aviären Bornaviren haben gezeigt, dass eine Wachtelzelllinie, die CEC-32--Zellen, sich für die Virusanzucht hervorragend eignet. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob sich die Wachtel als Tiermodell eignet. Die Wachtel stellt wegen ihrer geringen Größe und des geringen Platzanspruchs und Futterbedarfs sowie der schnellen Embryonalentwicklung und frühen Geschlechtsreife ein sehr beliebtes Versuchstier dar und wird seit über 60 Jahren auch in der in der Virusforschung häufig eingesetzt.

In einem auf drei Monate angelegten Versuchsprojekt wurden 35 Japanische Wachteln einbezogen. Zwanzig Vögel wurden im Alter von zehn Tagen okulonasal mit einem in Zellkultur vermehrten und aufgereinigten ABV-Isolat des Genotyps 4, das ursprünglich aus einem natürlich infizierten Graupapagei gewonnen worden war, in einer Dosis von 10^4 ffu pro Tier experimentell infiziert. Zehn weitere Wachteln wurden vier Wochen nach Versuchsbeginn als Kontakttiere zu den experimentell infizierten Tieren hinzugesetzt, um eine mögliche Übertragung von Tier zu Tier zu erfassen. Fünf Wachteln dienten als nicht-infizierte Kontrollen. Der Gesundheitszustand aller Tiere wurde täglich durch Adspektion überprüft. Außerdem wurden in zweiwöchigen Intervallen Kloakentupfer- und Blutproben zum Nachweis einer ABV-Infektion mittels rRT-PCR und ELISA genommen sowie das Körpergewicht der Wachteln erfasst. Alle vier Wochen wurden zudem Augenuntersuchungen durchgeführt. Jeweils zehn Wachteln wurden vier und 12 Wochen nach experimenteller Infektion euthanasiert und einer pathologischen Untersuchung unterzogen. Die Kontakttiere wurden vier Wochen nach Vergesellschaftung mit der experimentell infizierten Gruppe ebenfalls euthanasiert und seziiert. Organe einzelner Tiere wurden zudem

histologisch sowie immunhistochemisch und mittels rRT-PCR auf das Vorhandensein von ABV-Antigen bzw. -RNA untersucht.

In dieser Studie ergaben sich keine Hinweise auf eine erfolgreiche Infektion der Wachteln mit ABV oder auf die Entwicklung einer klinischen Erkrankung im Sinne einer PDD. So wurden keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen den Tieren der einzelnen Versuchsgruppen ermittelt. Bei der Untersuchung der Kloakentupfer- und Blutproben mittels rRT-PCR wurde RNA von aviären Bornaviren nicht nachgewiesen. Zudem wurden spezifische Antikörper gegen ABV-N-Protein mittels ELISA nicht festgestellt. Augenveränderungen, und hier vor allem Chorioretinitiden, wurden bei Tieren aller Versuchsgruppen, auch der Kontrollgruppe, relativ häufig beobachtet, waren demnach also nicht mit einer potentiellen ABV-Infektion assoziiert. Bei der Sektion wurden pathologische Veränderungen bei vielen Tieren an zahlreichen Organen festgestellt. Sie kamen jedoch in allen Versuchsgruppen vor und entsprachen nicht dem typischen Bild einer PDD. Bei der histologischen Untersuchungen wurden PDD-typischen Veränderungen ebenfalls nicht nachgewiesen und ABV-Antigen nicht detektiert.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse virologischer, klinischer, pathologischer und histologischer Untersuchungen im Rahmen eines ABV-Infektionsversuchs mit Japanischen Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) belegen nicht eine Eignung dieser Vögel als Modelltier für ABV und PDD. Derzeit steht also ein geeignetes Versuchstier als Ersatz für Psittaziden nicht zur Verfügung.

VI. SUMMARY

Evaluation of the quail as an animal model for infections with avian bornavirus and proventricular dilatation disease

Avian bornaviruses (ABV) were described for the first time in 2008 and were found to be associated with proventricular dilatation disease (PDD), the most important gastrointestinal disease in psittacines.

Experimental infections with ABV leading to proventricular dilatation disease have been documented only in psittacine birds so far. An animal model suitable to substitute the use of these birds which possess high cognitive and perceptual abilities and require a highly enriched environment is unavailable to date. In-vitro experiments with avian bornaviruses revealed that a permanent quail cell line, CEC-32 cells, was highly suitable for the propagation of viruses. Therefore the aim of this study was to investigate whether the quail was suitable as an animal model. With their small size, modest space and food requirements and early sexual maturity, quail make very popular research animals and have been widely employed in virus research for over 60 years.

Thirty-five Japanese quail were included in a three-month research project. In the experiment, at the age of ten days, 20 birds were infected intranasally and intraconjunctivally with an ABV virus stock of genotype 4 derived from a naturally infected grey parrot and isolated in a CEC-32 cell culture system. The infection dose used was 10^4 ffu per animal. Four weeks after the start of the experiment, a further ten quail were put in with the experimentally infected animals as contact animals, in order to determine whether the infection was passed from one animal to another. Five quail served as non-infected controls. The state of health of all the animals was checked daily by adspection. In addition, at two-week intervals blood and cloacal swab samples were taken for the purpose of detecting ABV infection by means of rRT-PCR and ELISA, and the animals were weighed. Furthermore, eye examinations were performed every four weeks. At four and 12 weeks respectively after experimental infection, ten of the animals were sacrificed and a pathological examination was performed. After having been housed with the experimentally infected group for four weeks, the contact animals were also sacrificed and dissected. Organs from individual animals were examined histologically and immunohistochemically for the presence of ABV

antigen and were tested for the presence of ABV RNA by means of rRT-PCR.

In this study, there was no evidence of a successful infection of the quail with ABV or of the development of a clinical disease in the sense of PDD. No difference was found in the weight gained between the animals in the different experimental groups. RNA from avian bornaviruses was not detected in cloacal swabs or blood using rRT-PCR nor were any antibodies specific to ABV-N-protein identified by ELISA. Changes in the eyes, particularly chorioretinitis, were observed relatively frequently in animals from all experimental groups, including the controls; they were therefore not associated with possible ABV infection. Upon dissection, pathological changes were observed in many animals in numerous organs. However, they appeared in all experimental groups and did not portray a typical picture of PDD. On histological investigation, changes typical of PDD were likewise not evidenced, nor was ABV antigen detected.

The results of the virological, clinical, pathological and histological investigations presented here do not provide any evidence for the suitability of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) as an animal model for ABV infections and PDD.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adrian K, Rinder M, Stäheli P, Korbel R, Kaspers B. Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen aviäre Bornaviren bei Papageienvögeln. 16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten München 2010: 41-43

Algermissen D. Nachweis von Borna Disease-Virus-spezifischen Proteinen und deren subgenomischer RNA bei natürlich infizierten Pferden. Vet diss Hannover, 2010

Alkewitz, W. Übertragungsversuche der Bornaschen Krankheit der Pferde auf Hühner. Vet diss München, 1939

Altmann D, Kronberger H, Schüppel KF, Lippmann R, Altmann I. Bornasche Krankheit bei Neuwelttylopoden und Equiden. 13. Int Kong Erk Zoot 1976: 127-132

Amsterdam JD, Winokur A, Dyson W, Herzog S, Gonzalez F, Rott R, Koprowski H. Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? Arch Gen Psychiatry. 1985 Nov; 42(11): 1093-1096

Anzil AP, Blinzinger K, Mayr A. Persistent Borna virus infection in adult hamsters. Arch Gesamte Virusforsch. 1973; 40(1): 52-57

Ashash E, Malkinson M, Meir R, Perl S, Weisman Y. Causes of losses including a Borna disease paralytic syndrome affecting young ostriches of one breeding organization over a five-year period (1989-1993). Avian Dis. 1996 Jan-Mar; 40(1): 240-245

Asrani RK, Gupta RK, Sadana JR, Pandita A. Experimental candidiasis in Japanese quail: pathological changes. Mycopathologia. 1993 Feb; 121(2): 83-89

Autorenkollegium. Geflügelsektion. In: Siegmann O, Neumann U (Hrsg.). Kompendium der Geflügelkrankheiten. 6., aktualisierte und erweiterte Auflage. Schlütersche Verlag. Stuttgart 2005: 85-86

Bano L, Drigo I, Macklin KS, Martin SW, Miller RS, Norton RA, Oyarzabal OA, Bilgili SF. Development of a polymerase chain reaction assay for specific identification of *Clostridium colinum*. Avian Pathol. 2008 Apr; 37(2): 179-181

Barbosa T, Zavala G, Cheng S, Villegas P. Pathogenicity and transmission of reticuloendotheliosis virus isolated from endangered prairie chickens. Avian Dis. 2007 Mar; 51(1): 33-39

Hans-Günther Bauer, Einhard Bezzel und Wolfgang Fiedler (Hrsg): Das Kompendium der Vögel Mitteleuropas: Alles über Biologie, Gefährdung und Schutz. Band 1: Nonpasseriformes – Nichtsperlingsvögel. Aula-Verlag Wiebelsheim. Wiesbaden 2005

Bechter K, Herzog S, Fleischer B, Schüttler R, Rott R. Kernspintomographische Untersuchungen bei psychisch kranken Patienten mit oder ohne Serumantikörper gegen das Virus der Bornaschen Krankheit. *Nervenarzt* 1987; 58: 617-624

Berhane Y, Smith DA, Newman S, Taylor M, Nagy E, Binnington B, Hunter B. Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathol.* 2001 Oct; 30(5): 563-570

Bernhardt F, Kühne A. Wachteln als Ziergeflügel halten. Verlag Ulmer. Stuttgart 2007

Biesenbach W, Herzog S, Frese K. Peripheral neuropathy in experimental Borna disease virus infection in Lewis rats. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1990: 132-145

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

Bilzer T, Grabner A, Stitz L. Immunopathology of Borna disease in the horse: clinical, virological and neuropathologic findings. *Tierarztl Prax.* 1996 Dec; 24(6): 567-576

Bishop KL, Khan MI, Nielsen SW. Experimental infection of northern bobwhite quail with *Borrelia burgdorferi*. *J Wildl Dis.* 1994 Oct; 30(4): 506-513

Bode L, Dürrwald R, Ludwig H. Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet Rec.* 1994a Sep 17; 135(12): 283-284

Bode L., Dürrwald R, Koepfel P, Ludwig H. Neue Aspekte der equinen Borna-Virus-Infektion mit und ohne Krankheit. *Prakt Tierarzt* 1994b: 1065-1068

Bode L, Dürrwald R, Rantam FA, Ferszt R, Ludwig H. First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Mol Psychiatry.* 1996 Jul; 1(3): 200-212

Bode L. Borna Disease Virus – natürliche Infektion und Krankheit bei Mensch und Tier. Wissenstand und Neubewertung von Diagnostik, Pathogenese und Epidemiologie unter Einbeziehung eigener Studien. *Vet Habil Berlin*, 1999

Bogomolova NN, Shcherbakova OE, Fokina GI, Danilov AI. Sensitivity of female Japanese quail, their embryos and a cell culture of quail fibroblasts to infection by the avian adenovirus CELO. *Vopr Virusol.* 1974 Jul-Aug; (4): 445-449

Bond MW, Downs D, Wolf S; Screening for psittacine Proventricular dilatation syndrome. *Proc Assoc Avian Vet*, Nashville, 1993: 92-97

Briese T, de la Torre JC, Lewis A, Ludwig H, Lipkin WI. Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Nat Acad Scie USA* 89rd 1992: 11486-11489

Bundesministerium.<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/MeldepflichtigeTierseuchen.html>

Caplazi P, Melzer K, Goetzmann R, Rohner-Cotti A, Bracher V, Zlinszky K, Ehrensperger F. Borna disease in Switzerland and in the principality of Liechtenstein. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1999; 141(11): 521-527

Cazayoux CA, Myocarditis as a component of psittacine proventricular dilatation syndrome in a Patagonian conure. *Avian Diseases* 1992; 36: 1117-1119

Chambers JA, Cywinski A, Chen PJ, Taylor JM. Characterization of Rous sarcoma virus-related sequences in the Japanese quail. *J Virol.* 1986 Aug; 59(2): 354-362

Chaudhary SK, Sadana JR. Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Clinical signs and haematological changes. *Mycopathologia.* 1988 Jun; 102(3): 179-184

Cilloni F, Toffan A, Giannecchini S, Clausi V, Azzi A, Capua I, Terregino C. Increased pathogenicity and shedding in chickens of a wild bird-origin low pathogenicity avian influenza virus of the H7N3 subtype following multiple *in vivo* passages in quail and turkey. *Avian Dis.* 2010 Mar; 54(1 Suppl): 555-557

Clark FD Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. *Avian Dis.* 1984 Jul-Sep; 28(3): 813-815

Colwell WM, Simmons DG, Muse KE. Use of Japanese quail embryo fibroblast cells for propagation and assay of turkey herpesvirus FC-126. *Appl Microbiol.* 1974 Jan; 27(1): 218-223

Compans RW, Melsen LR, de la Torre JC. Virus-like particles in MDCK cells persistently infected with Borna disease virus. *Virus Res.* 1994 Sep; 33(3): 261-268

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

Danner K. Borna-Virus und Borna-Infektionen. Vom Miasma zum Modell. Enke Verlag. Stuttgart 1982

Daoust PY, Julian RJ, Yason CV, Artsob H. Proventricular impaction associated with nonsuppurative encephalomyelitis and ganglioneuritis in two Canada geese. *J Wildl Dis.* 1991 Jul; 27(3): 513-517

De Kloet SR, Dorrestein GM. Presence of avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws. *Avian Dis.* 2009; 53: 568-573

de la Torre JC, Carbone KM, Lipkin WI. Molecular characterization of the Borna disease agent. *Virology.* 1990 Dec; 179(2): 853-856

de la Torre JC, Bode L, Dürrwald R, Cubitt B, Ludwig H. Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus Res.* 1996 Sep; 44(1): 33-44

Degernes LA, Flammer K, Fischer P. Proventricular dilatation syndrom in a green-winged macaw. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet 1991: 45-49

Degernes LA, Love EN, Laughery MC. Review of Radiographic changes associated with proventricular dilatation disease. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet 1996: 209-211

Degiorgis MP, Berg AL, Hård Af Segerstad C, Mörner T, Johansson M, Berg M. Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). J Clin Microbiol. 2000 Aug; 38(8): 3087-3091

Delnatte P, Berkvens C, Kummrow M, Smith DA, Campbell D, Crawshaw G, Ojkic D, DeLay J. New genotype of avian borna virus in wild geese and trumpeter swans in Canada. Vet Rec. 2011 Jul 23; 169(4): 108

Dieckhöfer R, Bode L, Ludwig H, Kiefer M Reckwald P, Rupp A. Bornavirus (BDV) beim Pferd – Klinik, Diagnostik und Therapie bei einem lokalen Infektionsgeschehen im Saarland und tierseuchenrechtliche Betrachtungen. Tierärztl Umschau 2004; 59: 619-632

Dieckhöfer, R. Epidemiologische Untersuchungen zur equinen BDV-Infektion, der Bornaschen Krankheit beim Pferd, der Therapie und die dazugehörige aktuelle Gesetzessituation in Deutschland. Vet Diss Berlin, 2006

Doneley RJ, Miller RI; Fanning TE. Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. Aust Vet. J 2007; 85: 119-123

Doolen M. Crop biopsy – a low risk diagnosis for neuropathic gastric dilatation. Proc. Annu. Conf. Assoc. Avian Vet. 1994: 193-196

Dürrwald R, Ludwig H. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. Zentralbl Veterinarmed B. 1997 May; 44(3): 147-184

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

Dürrwald R, Kolodziejek J, Herzog S, Nowotny N. Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. Rev Med Virol. 2007 May-Jun; 17(3): 181-203

Eleazer TH, Blalock HG, Warner JH Jr, Pearson JE. Eastern equine encephalomyelitis outbreak in *coturnix* quail. Avian Dis. 1978 Jul-Sep; 22(3): 522-525

Elford W, Galloway IA. Filtration of the virus of Borna disease through graded colodion membranes. Brit J Exper Path 1933; 14: 196

Enderlein D, Heffels-Redmann, Kaleta EF, Müller H, Herzog S, Herden C, Piepenbring A, Neumann D, Lierz M. Neue Erkenntnisse zur Rolle des aviären Bornavirus bei der Drüsenmagenenerweiterung der Psittaziden. 16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten München 2010: 15-20

Farrow WM, Schmitt MW, Groupé V. Responses of isolator-derived Japanese quail and quail cell cultures to selected animal viruses. J Clin Microbiol. 1975 Nov; 2(5): 419-424

Gancz A, Kistler AL, Greninger AL, Farnoushi Y, Mechani S, Perl S, Berkowitz A, Perez N, Clubb S, Derisi JL, Ganem D, Lubin A. Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. Virol. J. 2009a; 6: 100

Gancz A, Kistler A, Greninger A, Farnoushi Y, Mechani S, Perl S, Berkovitch A, Perez N, Clubb S, Ganem D, DeRisi JL, Lublin A. Avian bornaviruses and proventricular dilatation disease. Proc Annu Assoc Avian Vet 2009b: 5

Gancz A, Clubb S, Shivaprasad HL. Advanced diagnostic approaches and current management of Proventricular Dilatation Disease. Vet Clin Exot Anim 2010; 13: 471-494

Gaskin JM, Homer BL, Eskelund KH. Some unofficial thoughts on avian viral serositis. Proc. Assoc. Avian Vet. 1991: 38-42

Gaskin JM, Questions and answers about psittacine proventricular dilatation disease and avian viral serositis. Proc. Midwest Avian Research Exposition 1992: 69-71

Geiss V, Frese K, Morales JA, Ojok L, Herzog S. Borna disease virus-induced retinitis in Lewis rats-an immune-mediated retinopathy. Lens Eye Toxic Res. 1990; 7(3-4): 7

Gerlach H. Update of the macaw wasting syndrome. Proc Annu Conf. Assoc Avian Vet, Miami. 1986: 21-25

Gerlach H. Viruses. In: Avian Medicine: principles and application. Eds.: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LP. Lake Worth, Fl.: Wingers Publ. Inc. 1994: 862-948

Giannecchini S, Clausi V, Di Trani L, Falcone E, Terregino C, Toffan A, Cilloni F, Matrosovich M, Gambaryan AS, Bovin NV, Delogu M, Capua I, Donatelli I, Azzi A. Molecular adaptation of an H7N3 wild duck influenza virus following experimental multiple passages in quail and turkey. Virology. 2010 Dec 20; 408(2):167-173

Glisson JR, Cheng IH, Rowland GN, Stewart RG. Pasteurella multocida infection in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Avian Dis. 1989 Oct-Dec; 33(4): 820-822

Gosztanyi G, Leiskau T, Ludwig H. The significance of the Borna disease virus infection for the non-mammal, the chicken. Zentralbl Bakt Mikrobiol Hyg (A) 1983; 255: 170

Gosztanyi G, Ludwig H. Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995; 190: 39-73

Grabner A, Fischer A. Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years. *Tierarztl Prax*. 1991 Feb; 19(1): 68-73

Grabner A, Herzog S, Lange-Herbst H, Frese K. Die intra-vitram Diagnose der Bornaschen-Kranheit (BD) bei Equiden. *Pferdeheilk* 2002; 18: 579-586

Graham DL. Wasting/ proventricular dilatation disease. A pathologist view. *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*. 1991: 43-44

Granzow H, Weiland F, Mundt E, Köllner B, Werner O. Intranuclear inclusions in cells infected with Newcastle disease virus. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1999 Aug; 46(6): 411-421

Gray P, Villanueva MS, Mirhosseini N, Hoppes S, Payne S, Tizard I. Experimental Infection of birds with avian bornavirus. *Proc Annu Assoc Avian Vet* 2009: 7

Gray P, Hoppes S, Suchodolski P, Mirhosseini N, Payne S, Villanueva I, Shivaprasad HL, Honkavuori KS, Lipkin WI, Briese T, Reddy SM, Tizard I. Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. *Emerg Infect Dis*. 2010 Mar; 16(3): 473-479

Greenfield CL, Dohms JE, Dietert RR. Infectious bursal disease virus infection in the quail-chicken hybrid. *Avian Dis*. 1986 Jul-Sep; 30(3): 536-542

Gregory CR, Latimer KS, Niagro FD, Ritchie BW, Campagnoli RP, Norton TM, Greenacre CB. A review of proventricular dilatation syndrome. *J Assoc Avian Vet*. 1994; 8: 69-75

Gregory CR, Ritchie BW, Latimer KS, Campagnoli RP, Pesti D, Lukert PD. Proventricular Dilatation Disease. *Avian Viruses: Function and Control*. Wingers Publishing, Lake Worth, FL, 1995

Gregory CR, Latimer KS, Campagnoli RP, Ritchie BW. Histologic evaluation of the crop for diagnosis of proventricular dilatation syndrome in psittacine birds. *J Vet Diagn Invest*. 1996a Jan; 8(1): 76-80

Gregory CR, Latimer KS, Niagro FD, Campagnoli RP, Steffens WL, Ritchie BW. Detection of eastern equine encephalomyelitis virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using DNA in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest*. 1996b Apr; 8(2): 151-155

Gregory CR, Latimer KS, Niagro FD, et al. Characterization of a virus like particle observed in tissues from psittacine birds affected with proventricular dilatation syndrome. *Southeastern Conf Avian Dis* 1996c

Gregory, Taylor, Schmidt. Proventricular Dilatation Disease, round table discussion, *J of Avian Medicine and Surgery*, 1997a; 11 (3): 201-203

Gregory CR, Ritchie BW, Latimer KS, Steffens WL, Campagnoli RP, Pesti D, Lukert PD. Proventricular Dilatation Disease: A Viral Epornitic. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet 1997b: 43-52

Gregory CR, Ritchie AE, Latimer KS, Steffens WL, Campagnoli RP, Pesti D, Lukert PD. Progress in understanding proventricular dilatation disease. Proc. Annu Conf Assoc Avian vet 2000: 269-75

Gregory CR, Pesti D, Ritchie BW. ABV and PDD. A controlled experimental approach. Proc Annu Assoc Avian Vet 2011: 63

Gröters S, Alldinger S, Baumgärtner W. Up-regulation of mRNA for matrix metalloproteinases-9 and -14 in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis. Acta Neuropathol. 2005 Oct; 110(4): 369-382

Grund Ch, Hildebrand R-A, Grimm F, Kösters J. Isolation und Charakterisierung von aviären Paramyxoviren aus Papageien mit der Neuropathischen Magendilatation. XI. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten München. 1998: 139-145

Grund Ch, Grimm F. , Kösters J. Serological studies on persistent aPMV-1 infection associated with PDD. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet 1999: 19-23

Grund Ch, Werner O, Gelderblom HR, Grimm F, Kösters J. Avian Paramyxovirus serotype 1 isolates from spinal cord of parrots display very low virulence. J Vet Med B 2002. 49: 445-51

Grund Ch. Bedeutung von schwach virulenten aviären Paramyxoviren bei Psittaziden. Vet Habil München, 2004: 104-110

Grund Ch, Mohn U, Korbel R. Relevance of low virulent avian paramyxovirus serotype 1 for psittacine birds. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet. 2005: 283-286

Guy JS, Levy MG, Ley DH, Barnes HJ, Gerig TM. Experimental reproduction of enteritis in bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with *Cryptosporidium* and reovirus. Avian Dis. 1987 Oct-Dec; 31(4): 713-722

Gylstorff I, Grimm F. Vogelkrankheiten. 2. Auflage. Verlag UTB. Stuttgart 1998

Hagiwara K, Kamitani W, Takamura S, Taniyama H, Nakaya T, Tanaka H, Kirisawa R, Iwai H, Ikuta K. Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. Vet Microbiol. 2000 Mar 15; 72(3-4): 207-216

Hallensleben W, Zocher M, Stäheli P. Borna disease virus is not sensitive to amantadine. Arch Virol. 1997; 142(10): 2043-2048

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

Harcourt-Brown NH, Gough RE. Isolation of virus-like particles associated with proventricular dilatation syndrome in macaws. Proc Euro Conf Avian Med Surg 1997: 111-115

Hauk R, Lierz M, Honkavuori KS, Gruber AD, Olias P, Abdelwhab EM, Kohls A, Lipkin WI, Briese T, Hafez HM. Nachweis von aviären Bornaviren bei an neuropathischer Drüsenmagendilatation erkrankten und gesunden Papageien. 16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten München 2010: 25-33

Hausmann J, Hallensleben W, de la Torre JC, Pagenstecher A, Zimmermann C, Pircher H, Stäheli P. T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 17; 96(17): 9769-9774

Heinig A. Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: Röhler H (ed.): Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Jena 1969: 83-148

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

Hirano N, Kao M, Ludwig H. Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. J Gen Virol. 1983 Jul; 64 (Pt 7): 1521-1530

Holejsovsky J, Svoboda S. Experimental infection of the Japanese quail with *Mycobacterium avium*. Arch Exp Veterinarmed. 1973; 27(6): 929-937

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

Hoppes S, Gray P, Payne S, Tizard I. The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian Bornavirus and Proventricluar dilatation disease. Vet Clin Exot Anim 2010; 13: 495-508

Huber L, Gajdon GK. Technical intelligence in animals: the kea model. Anim Cogn. 2006 Oct; 9(4): 295-305

Hughes PE. The pathology of myetric ganglioneuritis; psittacine encephalomyelitis; proventricular dilatation disease of psittacines and macaw wasting syndrome. Proc 33rd Western Poultry Dis Conf 1984: 85-87

Huss D, Poynter G, Lansford R. Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. Lab Anim (NY). 2008 Nov; 37(11): 513-519

Ichilcik R, Austin JC. The Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) as a laboratory animal. J S Afr Vet Assoc. 1978 Sep; 49(3): 203-207

Imai K, Yuasa N, Furuta K, Narita M, Banba H, Kobayashi S, Horiuchi T. Comparative studies on pathogenical, virological and serological properties of Marek's disease virus isolated from Japanese quail and chicken. *Avian Pathol.* 1991 Mar; 20(1): 57-65

Isogai E, Tanaka S, Braga IS 3rd, Itakura C, Isogai H, Kimura K, Fujii N. Experimental *Borrelia garinii* infection of Japanese quail. *Infect Immun.* 1994 Aug; 62(8): 3580-3582

Jack SW, Reed WM, Burnstein T. The pathogenesis of quail bronchitis. *Avian Dis.* 1994 Jul-Sep; 38(3): 548-556

Janes ME, Bower RK, Anthony NB. The leukocyte response of Japanese quail to Rous sarcoma virus-induced tumors. *Avian Dis.* 1994 Jul-Sep; 38(3): 610-615

Jaunin VB, Fatzer R, Melzer K, Gonin Jmaa D, Caplazi P, Ehrensperger F. A case of Borna disease in a cat. *Eur J Vet Path* 1998; 4: 33-35

Jeong OM, Kim MC, Kim MJ, Kang HM, Kim HR, Kim YJ, Joh SJ, Kwon JH, Lee YJ. Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. *J Vet Sci.* 2009a Mar; 10(1): 53-60

Joest EK, Degen K. Über eigentümliche intranukleäre Einschlüsse bei der enzootischen Gehirn- und Rückenmarksentzündung. *Z Infkrkh Haustiere* 1909; 6: 348-356

Kaleta KF, Heffels-Redmann U. Weitere Infektionen durch Hühneradenoviren (FAV). In: Siegmann O, Neumann U (Hrsg.). *Kompendium der Geflügelkrankheiten*. 6., aktualisierte und erweiterte Auflage. Schlütersche Verlag. Stuttgart 2005: 179

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

Kao M. Die Pathogenese der Borna Krankheit bei der Ratte. Ein Modell für persistierende und subakute/akute Krankheiten des zentralnervensystems und die Fettsucht (obesity syndrome). *Vet Diss Berlin*, 1985

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

Khare ML, Grun J, Adams EV. A transovarian transmission study of Marek's disease in Japanese quail. *Poult Sci.* 1975a Nov; 54(6): 1953-1961

Khare ML, Grun J, Adams EV. Marek's disease in Japanese quail - a pathological, virological and serological study. *Poult Sci.* 1975b Nov; 54(6): 2066-2068

Kishi M, Nakaya T, Nakamura Y, Zhong Q, Ikeda K, Senjo M, Kakinuma M, Kato S, Ikuta K. Demonstration of human Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett.* 1995 May 15; 364(3): 293-297

- Kishi M, Arimura Y, Ikuta K, Shoya Y, Lai PK, Kakinuma M. Sequence variability of Borna disease virus open reading frame II found in human peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*. 1996 Jan; 70(1): 635-640
- Kistler AL, Gancz A, Clubb S, Skewes-Cox P, Fischer K, Sorber K, Chiu CY, Lublin A, Mechani S, Farnoushi Y, Greninger A, Wen CC, Karlene SB, Ganem D, DeRisi JL. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology*. 2008 Jul 31; 5: 88
- Kistler AL, Smith JM, Greninger AL, Derisi JL, Ganem D. Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *J Virol*. 2010 Feb; 84(4): 2176-2179
- Kiwitt R. Wachteln – Zucht und Haltung. Ulmer Verlag. Stuttgart 2006
- Kobayashi S, Kobayashi K, Mikami T. A study of Marek's disease in Japanese quails vaccinated with herpesvirus of turkeys. *Avian Dis*. 1986 Oct-Dec; 30(4): 816-819
- Köhler D. Wachtelhaltung: Zucht - Ernährung - Vermarktung. Verlag Oertel & Spörer. Reutlingen 2008
- Kohno T, Goto T, Takasaki T, Morita C, Nakaya T, Ikuta K, Kurane I, Sano K, Nakai M. Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol*. 1999 Jan; 73(1): 760-766
- König HE, Korbel R, Liebich HG. Anatomie der Vögel. Schattauer Verlag. 2. Auflage Stuttgart 2009
- Korbel RT. Augenkrankheiten bei Vögeln: Ätiologie und Klinik von Augenkrankheiten, Luftsack-Perfusionsanästhesie, ophthalmologische Photographie und Bildatlas der Augenkrankheiten bei Vögeln. Vet Habil, München 1994
- Korbel RT, Rinder M. Ophthalmological findings in birds affected with PDD. *Proc Annu Assoc Avian Vet* 2011: 193
- Koshimizu K, Kotani H, Magaribuchi T, Yagihashi T, Shibata K, Ogata M. Isolation of ureaplasmas from poultry and experimental infection in chickens. *Vet Rec*. 1982 May 1; 110(18): 426-429
- Krey H, Ludwig H, Rott R. Spread of infectious virus along the optic nerve into the retina in Borna disease virus-infected rabbits. *Arch Virol*. 1979; 61(4): 283-288
- Lauber JK, Cheng KM. Heritable susceptibility to environmentally induced glaucoma in several mutants of Japanese quail. *J Hered*. 1989 Jul-Aug; 80(4): 268-271

Lierz M, Hafez HM, Honkavuori KS, Gruber AD, Olias P, Abdelwhab EM, Kohls A, Lipkin WI, Briese T, Hauck R. Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathol.* 2009 Dec; 38(6): 491-496

Lipkin, WI, Briese T. Bornaviridae. In: Knipe, DM, Howley RD (eds): *Fields Virology* 5th ed.. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2007: 1829-1851

Löffler B, Rinder M, Gerlach H, Stäheli P, Kaspers B, Korbel R. Gewebetropismus von aviären Bornaviren bei Papageien mit PDD. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten München 2010: 38-40

Lölinger H und Schubert HJ. Spontanerkrankungen bei Japanischen Wachteln. *Z Versuchstierk* 1967; 9: 87-94

Ludwig TH, Becht H, Groh L. Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Med Microbiol Immunol.* 1973; 158(4): 275-289

Ludwig H, Kraft W, Kao M, Gosztonyi G, Dahme E, Krey H. Borna-Virus-Infektion (Borna Krankheit) bei natürlich und experimentell infizierten Tieren: ihre Bedeutung für die Praxis. *Tierarztl Prax.* 1985; 13(4): 421-453

Ludwig H, Bode L, Gosztonyi G. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol.* 1988; 35: 107-151

Ludwig H, Bode L. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev Sci Tech.* 2000 Apr; 19(1): 259-288

Makarova NV, Ozaki H, Kida H, Webster RG, Perez DR. Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology.* 2003 May 25; 310(1): 8-15

Mannl A, Gerlach H, Leipold R. Neuropathic gastric dilatation in psittaciformes. *Avian Dis.* 1986 Jan-Mar; 31(1): 214-221

Metzler A, Ehrensperger F, Wyler R. Natürliche Bornavirusinfektionen beim Kaninchen. *Zentralbl Veterinärmed B* 1978; 25: 161-164

Mikami T, Onuma M, Hayashi TT, Narita M, Okada K. Pathogenic and serologic studies of Japanese quail infected with JM strain of Marek's disease herpesvirus. *J Natl Cancer Inst.* 1975 Mar; 54(3): 607-614

Miranda HC, Nunes SO, Calvo ES, Suzart S, Itano EN, Watanabe MA. Detection of Borna disease virus p24 RNA in peripheral blood cells from Brazilian mood and psychotic disorder patients. *J Gen Virol.* 1984 Oct; 65 (Pt 10):1845-9. Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J Affect Disord.* 2006 Jan; 90(1): 43-47

Misawa N, Ohnishi T, Uchida K, Nakai M, Nasu T, Itoh K, Takahashi E. Experimental hepatitis induced by *Campylobacter jejuni* infection in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Vet Med Sci.* 1996 Mar; 58(3): 205-210

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

Mulisch M, Welsch U. Romeis - Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag. Stuttgart 2010

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

Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, Nakaya T, Watanabe M, Tomonaga K, Iwahashi K, Ameno K, Momiyama N, Taniyama H, Sata T, Kurata T, de la Torre JC, Ikuta K. Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. J Virol. 2000 May; 74(10): 4601-4611

Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. Science. 1983a Jun 24; 220(4604): 1401-1403

Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. J Infect Dis. 1983b Aug; 148(2): 305-315

Nili H, Asasi K, Dadras H, Ebrahimi M. Pathobiology of H9N2 avian influenza virus in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Avian Dis. 2007 Mar; 51(1 Suppl): 390-392

Nitzsche, E. Untersuchungen über die experimentelle Bornavirus-Infektion bei der Ratte. Zentralbl Veterinärmed B; 10: 470-527

Obaldia N 3rd, Hanson RP. Effect of Newcastle disease virus on ocular and paraocular tissues in experimentally inoculated chickens. Avian Dis. 1989 Apr-Jun; 33(2): 285-290

Ouyang N, Storts R, Tian Y, Wigle W, Villanueva I, Mirhosseini N, Payne S, Gray P, Tizard I. Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. Avian Pathol. 2009 Oct; 38(5): 393-401

Pahari TK, Sasmal NK. Infection of Japanese quail with *Toxocara canis* larvae and establishment of patent infection in pups. Vet Parasitol. 1990 Apr; 35(4): 357-364

Pahari TK, Sasmal NK. Experimental infection of Japanese quail with *Toxocara canis* larvae through earthworms. Vet Parasitol. 1991 Aug; 39(3-4): 337-340

Payne S, Shivaprasad HL, Mirhosseini N, Gray P, Hoppes S, Weissenbock H, Tizard I. 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. 2011 Feb; 40(1): 15-22.

- Pees M, Christen C, Lierz M, Stelzer G, Straub J (eds.). Leitsymptome bei Papageien und Sittichen. Diagnostischer Leitfaden und Therapie. Enke Verlag. Stuttgart 2003
- Pennycott TW, Duncan G, Venugopal K. Marek's disease, candidiasis and megabacteriosis in a flock of chickens (*Gallus gallus domesticus*) and Japanese quail (*Coturnix japonica*). Vet Rec. 2003 Sep 6; 153(10): 293-297
- Pepperberg IM. Ordinality and inferential abilities of a grey parrot (*Psittacus erithacus*). J Comp Psychol. 2006a Aug; 120(3): 205-216
- Pepperberg IM. Grey Parrot (*Psittacus erithacus*) numerical abilities: addition and further experiments on a zero-like concept. J Comp Psychol. 2006b Feb; 120(1): 1-11
- Pepperberg IM. Vocal learning in Grey parrots: A brief review of perception, production, and cross-species comparisons. Brain Lang. 2010 Oct; 115(1): 81-91
- Perpiñán D, Fernández-Bellón H, López C, Ramis A. Lymphoplasmacytic myenteric, subepicardial, and pulmonary ganglioneuritis in four nonsittacine birds. J Avian Med Surg. 2007 Sep; 21(3): 210-214
- Peterson RT, Mountfort G, Hollom PAD. Die Vögel Europas. Blackwell Wissenschafts-Verlag. 15. neubearb. Auflage. Berlin 2002
- Phalen DN. An outbreak of psittacine proventricular dilatation syndrome (PPDS) in a private collection of birds and atypical form of PPDS in a nanday conure. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet 1986: 27-34
- Phalen DN. Psittacine proventricular dilatation syndrome. In: Avian Medicine and Surgery. Eds: Altmann SL, Clubb SI, Dorrestein GM, Quesenberry A. Philadelphia, PA, Saunders W.B. Saunders Company 1997: 312-315
- Pienta RJ, Groupé V. Growth curve and distribution of Rous sarcoma virus (Bryan) in Japanese quail. J Virol. 1967 Dec; 1(6): 1122-1129
- Piepenbring A, Herzog S, Herden C, Heffels-Redmann U, Ressemeyer S, Kaleta EF, Enderlein D, Lierz M. Pathogenesis of Avian Bornavirus (ABV) in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) Proc Annu Assoc Avian Vet 2011: 211
- Poynter G, Huss D, Lansford R. Injection of lentivirus into stage-X blastoderm for the production of transgenic quail. Cold Spring Harb Protoc. 2009 Jan; 2009(1): 5118
- Pradhan HK, Mohanty GC, Mukit A. Marek's disease in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*): a study of natural cases. Avian Dis. 1985 Jul-Sep; 29(3): 575-582
- Pringle CR. Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. Arch Virol. 1996; 141(11): 2251-2256

- Pyper JM, Clements JE, Zink MC. The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J Virol.* 1998 Sep; 72(9): 7697-7702
- Raethel HS. Hühnervögel dieser Welt. Neumann-Neudamm Verlag. Berlin 1988
- Raethel HS. Wachteln, Rebühner, Steinhühner, Frankoline und Verwandte. Oertel & Spörer Verlag. Reutlingen 2006
- Raghav R, Taylor M, Delay J, Ojkic D, Pearl DL, Kistler AL, Derisi JL, Ganem D, Smith DA. Avian bornavirus is present in many tissues of psittacine birds with histopathologic evidence of proventricular dilatation disease. *J Vet Diagn Invest.* 2010 Jul; 22(4): 495-508
- Ratnamohan R, Bagust TJ, Grimes TM, Spradbrow PB. Transmission of an Australian strain of reticuloendotheliosis virus to adult Japanese quail. *Aust Vet J.* 1979 Oct; 55(10): 506
- Reavill D, Schmidt R. Lesions of the Proventriculus/Ventriculus of Pet Birds. 1640 Cases. *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet.* 2007: 89-93
- Redmann Th. Klinische Untersuchung. In: Siegmann O, Neumann U (Hrsg.). *Kompendium der Geflügelkrankheiten.* 6., aktualisierte und erweiterte Auflage. Schlütersche Verlag. Stuttgart 2005: 83-84
- Reichelt U. Epizootiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit bei Pferden in Bayern und Darstellung des monoklonalen Antikörpers 38/15H7. *Vet Diss Berlin,* 2009
- Reuter A, Ackermann A, Kothlow S, Rinder M, Kaspers B, Stäheli P. Avian Bornaviruses Escape Recognition by the Innate Immune System *Viruses* 2010; 2(4): 927-938
- Richt JA, Herzog S, Pyper J, Clements JE, Narayan O, Bechter K, Rott R. Borna disease virus: nature of the etiologic agent and significance of infection in man. *Arch Virol Suppl.* 1993; 7: 101-109
- Richt JA, Pfeuffer I, Christ M, Frese K, Bechter K, Herzog S. Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis.* 1997 Jul-Sep; 3(3): 343-352
- Richt JA, Grabner A, Herzog S. Borna disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2000 Dec; 16(3): 579-95
- Richt JA, Rott R. Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet J.* 2001 Jan; 161(1): 24-40
- Richt JA, Grabner A, Herzog S, Gartner W, Herden C. Borna Disease. In: *Selon DC (ed.): Equine Infectious Diseases.* St. Louis 2007: 207-213
- Ridgway RA, Gallerstein GA. Proventricular dilatation in psittacines. *Proc Annu Conf. Avian Vet* 1983: 228-230

Rinder M, Ackermann A, Kempf H, Kaspers B, Korbel R, Stäheli P. Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *J Virol.* 2009 Jun; 83(11): 5401-5407

Rinder M, Kaspers B, Stäheli P, Korbel R. Diagnostik von aviären Bornaviren. 16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten München 2010a: 34-36

Rinder M, Kaspers B, Stäheli P, Korbel R. Neuropathische Magendilatation der Papageienvögel und aviäre Bornaviren. Aktuelle Entwicklungen. *Veterinärspiegel* 2010b: 188-191

Rinder M, Adrian K, Kaspers B, Stäheli Korbel R. Development of various diagnostic tests for avian bornavirus in psittacine birds. *Proc Annu Assoc Avian Vet* 2011: 185

Ritchie BW. *Avian Viruses: Function and Control.* Lake Worth, Wingers Publishing 1995: 379-411

Ritter, H. Retrospektive feingewebliche Untersuchungen von Psittaziden mit der Verdachtsdiagnose neuropathische Magendilatation. *Vet diss München*, 2007

Robey WG, Kuenzel WJ, Vande Woude GF, Fischinger PJ. Growth of murine sarcoma and murine xenotropic leukemia viruses in Japanese quail: induction of tumors and development of continuous tumor cell lines. *Cancer Res.* 1982 Jul; 42(7): 2523-2529

Rossi G, Crosta L, Pesaro S. Parrot proventricular dilation disease. *Vet Rec.* 2008 Sep 6; 163(10): 310

Rott R, Herzog S, Fleischer B, Winokur A, Amsterdam J, Dyson W, Koprowski H. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science.* 1985 May 10; 228(4700): 755-756

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

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

Sabran JL, Hsu TW, Yeater C, Kaji A, Mason WS, Taylor JM. Analysis of integrated avian RNA tumor virus DNA in transformed chicken, duck and quail fibroblasts. *J Virol.* 1979 Jan; 29(1): 170-178

Salter D, Balander R, Crittenden L. Evaluation of Japanese quail as a model system for avian transgenesis using avian leukosis viruses. *Poult Sci.* 1999 Feb; 78(2): 230-234

- Santos VL, Williams SM, Zavala G, Barbosa T, Zhang J, Cheng S, Shivaprasad HL, Hafner S, Fadly A, Santos RL, Brown CC. Detection of reticuloendotheliosis virus by immunohistochemistry and in situ hybridization in experimentally infected Japanese quail embryos and archived formalin-fixed and paraffin-embedded tumours. *Avian Pathol.* 2008 Aug; 37(4): 451-456
- Sauder C, Stäheli P. Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol.* 2003 Dec; 77(23):12886-12890
- Schamel K, Stäheli P, Hausmann J. Identification of the immunodominant H-2K (k)-restricted cytotoxic T-cell epitope in the Borna disease virus nucleoprotein. *J Virol.* 2001 Sep; 75(18): 8579-8588
- Schmatz HD, Busche R, Krauss H, Thiel N. The behavior of the Q-fever agent, *Coxiella burnetii*, in birds. 3. Experimental infection of quail. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 1977 Oct 5; 84(10): 375-376
- Schmidt J. Die Bornakrankheit des Pferdes. 55 Jahre Forschung und Lehre. *Arch Exp Veterinärmed* 1952; 6: 177-187
- Schneemann A, Schneider PA, Kim S, Lipkin WI. Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol.* 1994 Oct; 68(10): 6514-6522
- Schneider PA, Briese T, Zimmermann W, Ludwig H, Lipkin WI. Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J Virol.* 1994a Jan; 68(1): 63-68
- Schneider PA, Schneemann A, Lipkin WI. RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol.* 1994b Aug; 68(8): 5007-5012
- Schüppel KF, Kinne J, Reinmacher M. Bornavirus-Antigennachweis bei Alpakas (*Lama pacos*) sowie bei einem Faultier (*Choloepus didactylus*) und einem Zwergflußferd (*Choeropsis liberiensis*). *Verh Erkrgr Zoot* 1994; 36: 189-193
- Schüppel KF, Kinne J, Lebelt J, Reinmacher M. Zwei Fälle von Bornascher Krankheit bei Varis (*Memur variegatus*). 38. Tag Fachgr Path DVG 1995
- Schwaller A. Augenheilkunde beim Vogel – Entwicklungsgeschichte, Standortbestimmung und Zukunftsvision. *Vet Diss München*, 2002
- Schwemmler M, Jehle C, Formella S, Stäheli P. Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet.* 1999 Dec 4; 354 (9194): 1973-1974
- Schwemmler M, Lipkin WI. Models and mechanisms of Bornavirus pathogenesis. *Drug Discovery Today* 2004, 1: 211-216
- Shivaprasad HL, Barr BC, Woods LW, Daft BM, Moore JD, Kinde H, Anderson ML, Droual R. Spectrum of lesions (pathology) of proventricular dilatation syndrome. *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet* 1995: 505-506

Shivaprasad HL. Poultry ophthalmology. In: Gelatt KN (ed.). Veterinary ophthalmology. 3rd ed., Philadelphia 1999: 1117-1207

Shivaprasad HL, Uzal F, Kokka R, Fisher DJ, McClane BA, Songer AG. Ulcerative enteritis-like disease associated with *Clostridium perfringens* type A in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). Avian Dis. 2008 Dec; 52(4): 635-640.

Simitch T, Petrovich Z, Bordjochki A, Savin Z, Mikovitch Z. Experimental infection of the quail per os, with the vegetative and cystic form of *Toxoplasma gondii*. Bull Acad Vet Fr. 1965 Jan; 38: 27-29

Singh A, Oberoi MS, Singh B. Pathogenicity of quail's inclusion body hepatitis virus (avian adenovirus-1) for Japanese quails and broiler chicks. Vet Res Commun. 1995; 19(6): 545-551

Smith, J. Unusual Outbreak of PDD in a psittacine nursery. Proc Annu Assoc Avian Vet 2009: 9-13

Sprankel H, Richarz K, Ludwig H, Rott R. Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. Med Microbiol Immunol. 1978 May 26; 165(1):1-18

Stäheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmle M. Epidemiology of Borna disease virus. J Gen Virol. 2000 Sep; 81(Pt 9): 2123-2135

Stamer S. Charakterisierung eines Borna Disease Virus-spezifischen T-Zell-Epitops der Lewis Ratte und Einsatz eines Epitops in Immunisierungsexperimenten. Vet Diss Gießen, 2002

Steinmetz A, Pees M, Schmidt V, Weber M, Krautwald-Junghanns ME, Oechtering G. Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). J Small Anim Pract. 2008 Dec; 49(12): 660-662

Stitz L, Dietzschold B, Carbone KM. Immunopathogenesis of borna disease. Current Top Microbiol + Immunol 1995, 190: 75-92

Suchy A, Weissenböck H, Waller R, Schmidt P, Nowotny N. Nachweis der Bornaschen Krankheit bei einem Pferd in Österreich. Wien Tierärztl Mschr 1997; 84: 317-321

Takashima I, Hiyoshi M, Kariwa H, Mukaiya R, Hashimoto N. Experimental *Chlamydia psittaci* infection of Japanese quail. Microbiol Immunol. 1996; 40(4): 265-270

Turner R. Macaw fading or wasting syndrome. Proc. 33rd Poult Dis Conf 1984: 87-88

Uhlig A, Kinne J. Neurologische Befunde bei Pferden mit Bornascher Krankheit. Prakt. Tierarzt 1998; 28: 33-36

Varkoohi S, Pakdel A, Moradi Shahr Babak M, Nejati Javaremi A, Kause A, Zaghari M. Genetic parameters for feed utilization traits in Japanese quail. *Poult Sci.* 2011 Jan; 90(1): 42-47

Villanueva I, Gray P, Mirhosseini N, Payne S, Hoppes S, Honkavuori KS, Briese T, Turner D, Tizard I. The diagnosis of proventricular dilatation disease: use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Borna virus. *Vet Microbiol.* 2010 Jul 14; 143(2-4): 196-201

Vogt H. Die Japanische Wachtel als Versuchstier. *Dtsch Gefl Wirtsch* 1964; 16: 728-734

Wakenell PS, O`Connell P, Blackmore C, Mondal SP, Schat KA. Role of Marek's disease herpesvirus in the induction of tumours in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by methylcholanthrene. *Avian Pathol.* 2010 Jun; 39(3): 183-188

Weisman J, Hitchner SB. Infectious bursal disease virus infection attempts in turkeys and *Coturnix* quail. *Avian Dis.* 1978 Oct-Dec; 22(4): 604-609

Weissenböck H, Suchy A, Caplazi P, Herzog S, Nowotny N. Borna disease in Austrian horses. *Vet Rec.* 1998 Jul 4; 143(1): 21-22

Weissenböck H, Bilzer T, Ehrensperger F, Gosztonyi G, Herden C, Staehli P, Hausmann J, Pagenstecher A. Equine borna disease in Japan. *Vet Rec.* 2002 Dec 7; 151(23): 712

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

Weissenböck H, Sekulin K, Bakonyi T, Högler S, Nowotny N. Novel avian bornavirus in a nonsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *J Virol.* 2009b Nov; 83(21): 11367-11371

Werner-Keiss N. Untersuchungen zur Expression von Strukturproteinen des Virus der Bornaschen Krankheit an intrazerebral infizierten Lewis-Ratten. *Vet Diss Hannover*, 2006

Wille S. Fremdgenexpression und Transkriptionsregulation des Borna Disease Virus Foreign gene expression and transcriptional regulation of Borna Disease Virus, *Diss Biol Freiburg*, 2010

Woerpel RW, Roskopf WJ. Clinical and pathological features of macaw wasting disease (proventricular dilatation syndrome). *Proc. 33rd Poult Dis Conf* 1984: 89-90

Yamaoka H. Rabies virus inoculated into the quail. *Shonika Kiyo.* 1962 Sep-Oct; 8: 92-96

Yee KS, Cardona CJ, Carpenter TE. Transmission of low-pathogenicity avian influenza virus of subtype H6N2 from chickens to Pekin ducks and Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Avian Pathol. 2009 Feb; 38(1): 59-64

Yoshikawa Y, Yamanouchi K, Fukuda A, Hayami M. Characterization of an early cytotoxicity-inducing factor in sera of Japanese quails after inoculation with Rous sarcoma virus. Int J Cancer. 1976 Apr 15; 17(4): 525-532

Zimmermann W, Breter H, Rudolph M, Ludwig H. Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. J Virol. 1994a Oct; 68(10): 6755-6758

Zimmermann W, Dürrwald R, Ludwig H. Detection of Borna disease virus RNA in naturally infected animals by a nested polymerase chain reaction. J Virol Methods. 1994b Feb; 46(2):133-143

Zöller B, Redman-Müller I, Nanda I, Guttenbach M, Dosch E, Schmid M, Zoorob R, Jungwirth C. Sequence comparison of avian interferon regulatory factors and identification of the avian CEC-32 cell as a quail cell line. J Interferon Cytokine Res. 2000 Aug; 20(8): 711-717

Zucker H, Gropp J, Peh J, Zentz Ch. Erfahrungen mit der japanischen Wachtel (*Cot. cot. jap.*) als Labortier sowie einige Ergebnisse von Nährstoffbedarfsuntersuchungen Tierärz U 1967: 416-423

Zwick W., Seifried O. Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). Berl Tierärztl Wochenschrift 1925; 41: 129-132

Zwick W, Seifried O. Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn- und Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). Z Infkrkh Haustiere 1927; 30: 42-136

Zwick W. Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere. In: Goldenmeister, Haagen, Waldmann (eds.): Handbuch der Viruskrankheiten, Vol 2, Jena 1939: 254-354

IX. ANHANG

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: KURZÜBERSICHT ÜBER DIE GRUPPENEINTEILUNG UND DEN ZEITLICHEN VERLAUF DES VERSUCHES.....	36
TABELLE 2 AUFBAU DES ELISAS ZUM NACHWEIS VON WACHTEL-ANTI-ABV-N	44
TABELLE 3 ARITHMETISCHE MITTELWERTE DER GEWICHTE (G) DER MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN TIERE DER GRUPPEN MIT EXPERIMENTELLER VIRUSAPPLIKATION (GRUPPE A UND B, "INFIZIERT"), DER KONTAKTTIERE (GRUPPE C, "KONTAKT") UND DER KONTROLLTIERE (GRUPPE D, " KONTROLLE") MIT STANDARDABWEICHUNG SD.....	48
TABELLE 4 KOMPLETTÜBERSICHT DER ORGANVERÄNDERUNGEN, NUMMERN DER EXPERIMENTELL INFIZIERTEN GRUPPEN A + B IN ROTER, NUMMERN DER KONTAKTGRUPPE C IN SCHWARZER SCHRIFT, NUMMERN DER KONTROLLTIERE GELB MARKIERT, KENNZEICHNUNG MIT + BEI VORKOMMEN DER VERÄNDERUNG; ANGABE DES ALTERS IN WOCHEN (4, 8, 12 WOCHEN).....	51
TABELLE 5 MITTELWERTE DER OD MIT SD EXEMPLARISCHER ELISA-UNTERSUCHUNGEN AUS DEN EINZELNEN VERSUCHSGRUPPEN MIT ANGABE DER MAXIMALWERTE DE JEWEILIGEN UNTERSUCHUNGSTAGES	53

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MESSERGEBNISSE VON TAG 0 DER PI 998, 998 UND VON TIEREN AUS DER INFektionsGRUPPE	54
ABBILDUNG 2: MESSERGEBNISSE VON TAG 14 <i>p.i.</i> DER PI 998, 998 UND VON TIEREN AUS DER INFektionsGRUPPE.....	54
ABBILDUNG 3: MESSERGEBNISSE VON TAG 28 <i>p.i.</i> DER PI 998, 998 UND TIEREN AUS DER INFektionsGRUPPE.....	55
ABBILDUNG 4: MESSERGEBNISSE VON TAG 42 <i>p.i.</i> DER PI 998, 998, TIEREN AUS DER INFektionsGRUPPE UND KONTROLLGRUPPE (ALLE)	55
ABBILDUNG 5: MESSERGEBNISSE VON TAG 56 <i>p.i.</i> DER PI 998, 998, TIEREN AUS DER KONTAKTGRUPPE	56
ABBILDUNG 6: MESSERGEBNISSE VON TAG 70 <i>p.i.</i> DER PI 998, 998, TIEREN AUS DER INFektionsGRUPPE UND KONTROLLGRUPPE (ALLE)	56

X. DANKSAGUNG

Zum Abschluß möchte ich allen herzlich danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre stetige auch moralische Unterstützung, meinem Bruder Dr. Thomas Brüggemann für seinen fachlichen Rat und die konstruktive Korrektur meiner Arbeit, Viktor Stauder für seinen moralischen Beistand, die unermüdliche Hilfe und Geduld zu jeder Tages- und Nachtzeit sowie für sein Korrekturlesen und Kai Knebel für seinen Beitrag zu meinem beruflichen Werdegang und die graphische Beratung.

Frau PD Dr. Rinder danke ich die Überlassung dieses Themas, die Hilfestellung und Korrektur, die zur Umsetzung und Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. R. Korbel danke ich für die Doktorandenstelle, die Überlassung des Themas, seine Hilfestellung und Unterstützung bei der Augenuntersuchung der Tiere und die schöne, lehrreiche Zeit an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische.

Herrn Prof. Dr. B. Kaspers und seinem Team danke ich für die Durchführung und Entwicklung der Serologie sowie die Korrekturhilfen für diese Kapitel.

Frau Prof. Dr. H. Gerlach spreche ich meinen Dank für die Untersuchung und Dokumentation der histologischen Schnitte aus.

Herrn Prof. Dr. P. Stäheli und seinem Team der Universität Freiburg danke ich für die Bereitstellung des Virusmaterials.

Frau Dr. B. Dobenecker und dem Institut für Tierernährung danke ich für die Überlassung der Wachteln, ihre freundliche Beratung und Information zu diesen Tieren.

Vielen Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische, für Ihre Hilfe und Unterstützung auch moralischer Art v.a. Renate Englert, Kerstin Blüthgen, Lisa Koch, Katrin Stein, Franz Kronthaler, Andreas Päsler, Bianka Schink, Barbara Löffler, Martina Rzepka, Sonja Bergs, Heike Hufen und Tanja Hndawy.