

Aus dem Institut für Tierpathologie  
(Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Morphologische und immunbiologische  
Charakterisierung sowie Etablierung  
elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden der  
Aviären Inflammatorischen Demyelinisierenden  
Polyradikuloneuropathie (AvIDP) der Weißen  
Leghorn-Rasse**

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

von Sophie Ruth Bader  
aus Berlin

München, 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Kaspers  
Priv.-Doz. Dr. Fischer  
Priv.-Doz. Dr. Rinder  
Priv.-Doz. Dr. Werckenthin

Tag der Promotion: 24.07.2010

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Guillain-Barré-Syndrom (GBS) oder akute idiopathische Polyradikuloneuritis des Menschen</b>	<b>3</b>
2.1.1 GBS-Subtypen	3
2.1.2 Klinisches Bild der AIDP	4
2.1.3 Pathologie und Pathogenese der AIDP	5
2.1.4 Prognose bei AIDP	7
2.1.5 Ätiologie	7
2.1.5.1 <i>Vorausgehende Infektionen</i>	7
2.1.5.2 <i>Vorausgehende Impfungen</i>	7
2.1.6 Die Theorie der „molekularen Mimikry“	8
2.1.7 Elektrodiagnostik bei AIDP	8
<b>2.2 Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)</b>	<b>9</b>
2.2.1 Elektrodiagnostik bei CIDP	10
<b>2.3 Experimentelle allergische/autoimmune Neuritis (EAN) – Tiermodell des GBS</b>	<b>10</b>
2.3.1 Klassische EAN	10
2.3.2 AT-EAN	11
2.3.3 Chronische EAN	12
2.3.4 EAN in Hühnern	12
<b>2.4 Demyelinisierende Neuropathien beim Huhn</b>	<b>13</b>
2.4.1 „Periphere Neuropathie“ (PN) bei Weißen Leghorn-Hühnern	13
2.4.1.1 <i>Klinik</i>	14
2.4.1.2 <i>Pathologie</i>	14
2.4.1.3 <i>Virologische Untersuchungen</i>	15
2.4.1.4 <i>Übertragungsversuche</i>	15
2.4.1.5 <i>Unterschiede der PN zur MD</i>	15
2.4.1.6 <i>Theorien zur Ätiologie</i>	16

2.4.2	Mareksche Krankheit der Hühner (Marek´s Disease, MD)	16
2.4.2.1	Ätiologie	16
2.4.2.2	Klinisches Bild des Marekschen Krankheit	17
2.4.2.3	Übertragung und Pathogenese des MDV	18
2.4.2.4	Klassische bzw. Nervenform der MD (Mareksche Hühnerlähme; Fowl Paralysis; Range Paralysis)	18
2.4.3	„Idiopathische Polyneuritis“ (IP) in SPF-Hühnern	20
2.4.4	Durch Riboflavinmangel bedingte demyelinisierende aviäre periphere Neuropathie	20
<b>3</b>	<b>Eigene Arbeiten</b>	<b>22</b>
	<b>Artikel 1: Studie zur Neuropathologie und Immunbiologie der AvIDP der Weißen Leghorn-Hühner (publiziert im <i>Journal of Neuroinflammation</i>): Acute paretic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans</b>	<b>22</b>
	<b>Abstract</b>	<b>22</b>
	<b>Background</b>	<b>24</b>
	<b>Methods</b>	<b>25</b>
	Animal selection	25
	Histopathology and transmission electron microscopy	25
	Immune cell phenotyping	27
	Fluorescence microscopy	29
	Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)	30
	Genotyping	31
	PCR analysis for MDV strain discrimination	32
	<b>Results</b>	<b>33</b>
	Clinical presentation	33
	Morphological findings	33
	Immunostaining	35
	Fluorescence microscopy	38
	Quantitative RT-PCR	38
	Genotyping	41
	PCR analysis for MDV strain discrimination	42
	<b>Discussion</b>	<b>43</b>
	<b>Conclusions</b>	<b>49</b>

<b>Abbreviations</b>	<b>49</b>
<b>Artikel 2: Etablierung elektrophysiologischer Methoden zur Untersuchung neurologisch erkrankter Hühner in Langzeitstudien (eingereicht): Evaluation of lumbosacral nerve root conductance in chickens by electrophysiological testing and high-resolution spinal magnetic stimulation</b>	<b>51</b>
<b>Abstract</b>	<b>51</b>
<b>Introduction</b>	<b>52</b>
<b>Material and Methods</b>	<b>53</b>
Animals	53
Study protocol	53
Anesthesia	53
Technical equipment	53
Motor nerve conduction velocity (MNCV) and compound muscle action potentials (CMAPs)	54
Cranial somatosensory evoked potentials (SSEPs)	55
Spinal magnetic stimulation (sMS)	56
Confirmatory tests	57
Statistical analyses	58
<b>Results</b>	<b>58</b>
Electrical motor nerve stimulation	59
Cranial somatosensory evoked potentials	60
Spinal magnetic stimulation	62
Comparison of CMAPs by proximal electrical and magnetic stimulation	63
<b>Discussion</b>	<b>64</b>
<b>Abbreviations</b>	<b>70</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>4.1 AvIDP – eine eigene Entität?</b>	<b>72</b>
4.1.1 Entscheidungskriterien zur Umbenennung der „Peripheren Neuropathie“ in „Aviäre Inflammatorische Demyelinisierende Polyradikuloneuropathie“ (AvIDP)	72
4.1.2 Wie äußert sich eine demyelinisierende Polyradikuloneuropathie beim Haushuhn klinisch?	72
4.1.3 Typische makroskopische Erkennungsmerkmale der AvIDP	73

4.1.4	Histologische Charakteristika der AvIDP	74
4.1.5	Immunbiologie der AvIDP	76
4.1.5.1	<i>Zell-vermittelte Immunantwort</i>	76
4.1.5.2	<i>Humorale Immunantwort</i>	77
4.1.5.3	<i>Übergang einer TH1- zu einer TH2-medierten Phase?</i>	78
4.1.6	Spezifisches Verteilungsmuster der Entzündung: Autoantikörper und Blut-Nerven-Schranke	78
4.1.7	Überlegungen zur Ätiologie	81
4.1.7.1	<i>Molekulare Mimikry</i>	81
4.1.7.2	<i>Abgrenzung zur Marekschen Krankheit</i>	82
4.1.7.3	<i>Genetische Vulnerabilität versus Resistenz gegenüber der AvDIP</i>	86
4.1.7.4	<i>Möglicher Zusammenhang mit vorausgegangenen Impfungen</i>	87
4.1.8	Vergleich mit anderen demyelinisierenden peripheren Neuropathien des Haushuhns	88
<b>4.2</b>	<b>Elektrophysiologie als Möglichkeit zur Langzeitüberwachung AvIDP erkrankter Hühner</b>	<b>91</b>
4.2.1	Überlegungen zur Auswahl geeigneter Untersuchungsmethoden für eine Langzeitüberwachung der AvIDP	91
4.2.2	Modifizierung vorheriger Protokolle zur Bestimmung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit	92
4.2.3	Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren der MNLG	92
4.2.4	Etablierung somatosensibel evozierter Potentiale (SSEPs) zur Beurteilung der sensiblen Leitungswege	95
4.2.4.1	<i>Die Gefahr der Missinterpretation lumbosakral abgeleiteter Potentiale: Cord-Dorsum-Potential versus Potentialentstehung via alternative Leitungsbahnen</i>	95
4.2.4.2	<i>Glaubwürdigkeit der kranialen somatosensibel evozierten Potentiale im Huhn</i>	96
4.2.5	Auswahl geeigneter Parameter zur Beurteilung der kranialen SSEPs	97
4.2.6	Erhebbarkeit von Interpeak-Intervallen	97
4.2.7	Erhebbarkeit von physiologischen Spätantworten	98
4.2.8	Etablierung eines standardisierten Aufbaus einer spinalen Magnetstimulation (sMS) beim Huhn	99
4.2.9	Überlegungen zur Notwendigkeit von Kontrollen	101
4.2.10	Diagnostischer Wert der elektrophysiologischen Methoden im Hinblick auf demyelinisierende Erkrankungen des Haushuhns	101

---

<b>4.3</b>	<b>AvIDP als mögliches spontanes Tiermodell für humane inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathien</b> .....	<b>103</b>
<b>4.4</b>	<b>AvIDP: Perspektive und zukünftige Projekte</b> .....	<b>106</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klassifikation des GBS und verwandter Syndrome von Hughes et al (Hughes et al. 1999) .....	4
Tabelle 2 Impfschema für Legehennen .....	88

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Klassifikation des GBS nach Griffin et al. ....	4
Abbildung 2 Grundprinzipien der zellulären und humoralen Immunantworten .....	6
Abbildung 3 Klinisches Bild der von AvIDP (A) beziehungsweise MD (B) betroffenen Hühnern .....	73
Abbildung 4 Diskriminierende PCR .....	84
Abbildung 5 Arbeitshypothese zur möglichen Pathogenese und Ätiologie der AvIDP .....	107

Die fortlaufende Nummerierung der Tabellen bzw. der Abbildungen bezieht sich nur auf die Literaturübersicht und die Diskussion. In den Artikeln 1 und 2 entsprechen der Text, die Tabellen sowie die Nummerierung der Abbildungen und Tabellen der veröffentlichten bzw. eingereichten Version.

## Abkürzungen

AT-EAN	<i>Adoptive Transfer-Experimental Autoimmune Neuritis</i>
AIDP	Akute Inflammatorische Demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
AMAN	Akute Motorische Axonale Neuropathie
AMSAN	Akute Motorisch-Sensible Axonale Neuropathie
APZ	Antigen-Präsentierende Zelle
AvIDP	Aviäre Inflammatorische Demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation (engl.)
CDP	Cord-Dorsum-Potential
CIDP	Chronische Inflammatorische Demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
CMAP	Compound Muscle Action Potential (engl.: Muskelsummenaktionspotential)
DML	Distal-Motorische Latenz
EAN	Experimentelle Allergische/Autoimmune Neuritis
et al.	et alii/ et aliae (lat.: und andere)
FFE	Federfollikelepithel
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IDP	Inflammatorische Demyelinisierende Poly(radikulo)neuropathie
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin (s. Antikörper)
IL	Interleukin
LOS	Lipooligosaccharid
M.	Musculus (lat.: Muskel)
MD	Marek-Krankheit ( <i>Marek's Disease</i> )
MDV	Marek's Disease Virus; gallines Herpesvirus Serotyp 2
MFS	Miller-Fisher-Syndrom
mglw.	möglicherweise

MHC	Major Histocompatibility Complex (engl.: Haupthistokompatibilitätskomplex)
MNLG	Motorische Nervenleitgeschwindigkeit
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (engl.: Boten-Riboneukleinsäure)
MSAP	Muskelsummenaktionspotential
MFS	Miller-Fisher-Syndrom
N.	Nervus (lat.: Nerv)
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.: Polymerase-Ketten-Reaktion)
PMP-22	Peripheres Myelinprotein 22
PN	Periphere Neuropathie
PNS	Peripheres Nervensystem
SD	Standard Deviation (engl.: Standardabweichung)
SEM	Standard Error of Mean (engl.: Standardfehler oder Stichprobenfehler)
sMS	spinale Magnetstimulation
SNLG	Sensible Nervenleitgeschwindigkeit
SPF	Spezifisch Pathogenfrei
spp.	species (lat.)
SSEP	Somatosensibel Evoziertes Potential
SSLG	Somatosensible Leitungsgeschwindigkeit
T	Tesla; abgeleitete SI-Einheit der magnetische Flussdichte oder Induktion
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle; CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten
V	Volt; SI-Einheit der elektrischen Spannung
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z. T.	zum Teil

Die in den Artikeln verwendeten Abkürzungen finden sich im Anschluss an den jeweiligen Artikels.

## 1 Einleitung

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist der derzeit häufigste Grund für akute schlaffe Paralysen beim Menschen (Hughes and Cornblath 2005). Die Ätiologie und der genaue Ablauf der Pathogenese dieser Erkrankung sind bisher nur unvollständig geklärt. Insbesondere über die demyelinisierende Form des GBS, die so genannte akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie oder AIDP, ist trotz ihrer Inzidenz in westlichen Ländern von bis zu 4 pro 100000 Einwohnern sehr wenig bekannt (Hughes and Cornblath 2005). Zwar stehen der Forschung zur Untersuchung und Identifikation möglicher pathogenetischer Abläufe experimentelle Tiermodelle wie die experimentelle autoimmune Neuritis bei Labornagern und Kaninchen zur Verfügung (Gold et al. 2000; Waksman and Adams 1955; 1956), ein spontanes Tiermodell, dessen natürliches Vorkommen eine Möglichkeit bietet, neben dem immunpathologischen Geschehen auch ätiologische Faktoren zu untersuchen, fehlte allerdings bisher.

Seit einigen Jahrzehnten wird ein paretisches Syndrom in juvenilen Weißen Leghorn-Hühnern beobachtet, das in kommerziellen Legehennenherden mit einer Inzidenz von bis zu 3 Prozent auftreten kann (Bacon et al. 2001; Julian 1992). Die Tiere erkranken während der Aufzuchtperiode im Alter von 6 bis 10 (maximal 13) Wochen an einer progressiven Parese der Extremitäten. Bereits im Jahre 2001 wurde diese Lähmungserscheinung unter dem Namen „Periphere Neuropathie“ (PN) histopathologisch, immunhistochemisch und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht (Bacon et al. 2001). Der Forschungsschwerpunkt lag dabei insbesondere in der Unterscheidung der PN von der durch das galline Herpesvirus 2 (alpha-Herpesvirinae) verursachten Marekschen Krankheit.

Ziel unserer Untersuchungen war es nicht nur, die neurologische Erkrankung des Weißen Leghorn-Huhns bezüglich ihrer Pathogenese und Ätiologie sondern vor allem auch hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit zu der AIDP des Menschen zu untersuchen und damit die Möglichkeit eines spontanen Tiermodells für inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathien (IDP) des Menschen zu erschließen. Hierbei umfasste die Studie zwei Schwerpunkte: zum ersten die Erforschung der Pathogenese – insbesondere der Immunpathologie – und möglichen Ätiologie; zum zweiten die klinische Charakterisierung der Erkrankung mittels elektrophysiologischer Messverfahren. Die enge Zusammenarbeit mit

Wissenschaftlern unterschiedlicher Spezialisierung sicherte die jeweils nötige Expertise und ermöglichte den Einsatz von einer beträchtlichen Bandbreite verschiedener Methoden.

Besonders im ersten Teil der Studie wurde die Kooperation einer Reihe von Instituten genutzt. Die neuropathologischen Untersuchungen fanden am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie des Institutes für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München statt. Dabei wurden zur Charakterisierung der Veränderungen insbesondere der peripheren Nerven umfangreiche morphologische Techniken genutzt, die auch Nervenfaserspinnpräparate und die Transmissionselektronenmikroskopie umfassten, und durch eine Immunzellphänotypisierung mittels immunhistochemischer Verfahren ergänzt wurde. Die Phänotypisierung infiltrierender Immunzellen, die durch die Arbeitsgruppe Kaspers am Institut für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München ermöglicht wurde, konnte anhand der Durchflusszytometrie abgesichert und quantifiziert werden. Die jahrelange intensive Beschäftigung dieser AG mit immunologischen Abläufen speziell im Huhn bot zudem die Möglichkeit, mittels einer PCR-Analyse das Zytokinexpressionsmusters in erkrankten Nerven zu bestimmen. Die Durchführung einer Blutgruppenhaplotypisierung am Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Löffler-Institutes in Neustadt sowie der Abteilung Tierzucht und Haustiergenetik der Georg-August-Universität in Göttingen lieferte Informationen über den genetischen Hintergrund erkrankter Tiere. Ein PCR-Screening auf den Serotyp 1 des gallinen Herpesvirus 2, das die notwendige Unterscheidung zwischen Impfvirus und Feldstamm erlaubte und am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen (ehemals Institut für medizinische Mikrobiologie infektiöse und epidemische Krankheiten) der LMU München entwickelt wurde, rundete diesen Teil der Untersuchungen schließlich ab. Die Ergebnisse sind in Artikel 1 zusammengefasst.

Der zweite Abschnitt der Studie befasste sich zunächst mit der Etablierung einer elektrophysiologischen Methodik, die eine Evaluierung der Leitfähigkeit der sensiblen und auch der motorischen Nervenfasern innerhalb lumbosakraler Nervenwurzeln durch Nadelelektroden- und spinale magnetische Stimulation erlaubt. Die Resultate finden sich Artikel 2.

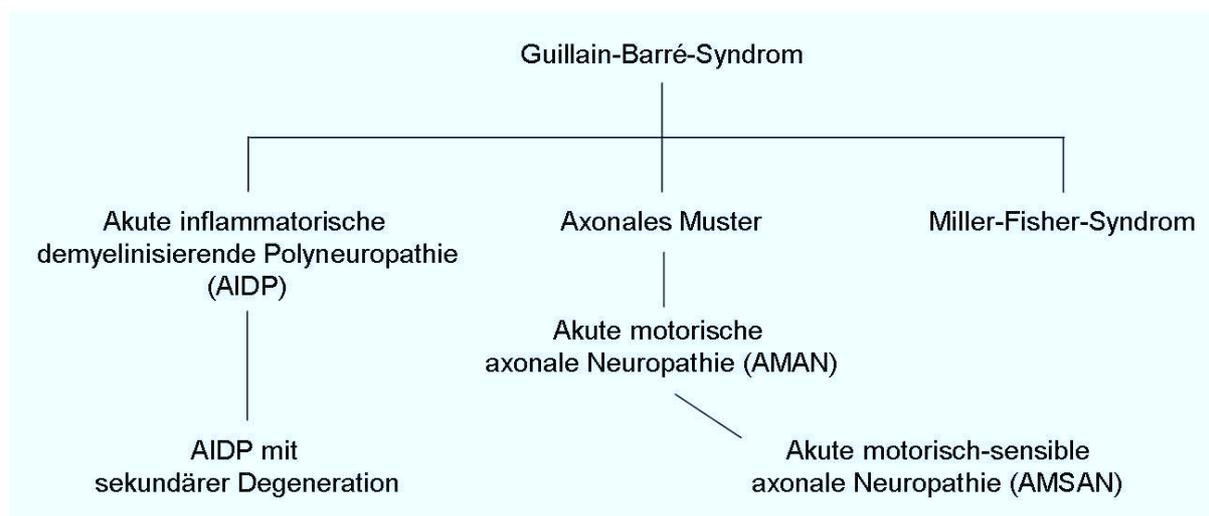
## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Guillain-Barré-Syndrom (GBS) oder akute idiopathische Polyradikuloneuritis des Menschen

Bei dem Guillain-Barré-Syndrom – oder auch Landry-Guillain-Barré-Strohl-Syndrom – des Menschen handelt es sich um eine vermutlich autoimmun bedingte Erkrankung des peripheren Nervensystems. Sie ist durch eine aufsteigende Schwäche und Taubheitsgefühle in den Extremitäten gekennzeichnet und kann innerhalb von wenigen Tagen zu einer vollständigen Paralyse der Gliedmaßen sowie der Atemmuskulatur und auch der Hirnnerven führen. Das GBS wurde erstmals im Jahre 1855 von dem französischen Arzt Landry beschrieben (Landry 1855). Namensgebend sind allerdings die französischen Ärzte Guillain und Barré, die zusammen mit ihrem Kollegen Strohl bei zwei Soldaten neben der Symptomatik der fortschreitenden Paralyse und Areflexie auch zum ersten Mal im Liquor die für GBS charakteristische Eiweißerhöhung bei normaler Zellzahl – die albuminzytologische Dissoziation – feststellten (Guillain et al. 1916). Die jährliche Inzidenz beträgt mit relativer Konstanz 1,2 bis 1,9 Fälle pro 100000 in Europa bzw. 0,6 bis 4 Fälle pro 100000 Einwohner weltweit (Hughes and Cornblath 2005; Hughes et al. 1999; Hughes and Rees 1997; Prevots and Sutter 1997), wobei sie sich mit steigendem Alter linear erhöht (Bogliun and Beghi 2004). Seit die Poliomyelitis in den meisten Teilen der Erde durch Vakzinierung weitgehend unter Kontrolle gebracht werden konnte, ist das GBS der häufigste Grund für eine akute, schlaffe Paralyse.

#### 2.1.1 GBS-Subtypen

Das Guillain-Barré-Syndrom ist eine facettenreiche Erkrankung, die klinisch, elektrophysiologisch und pathologisch verschiedene Muster aufweisen kann. Dies wiederum lässt eine Einteilung des GBS in mehrere Subtypen zu, die charakterisiert sind durch die hauptsächlich betroffene Nervenfasernqualität - motorisch und/oder sensibel – sowie die vorherrschende Art der Nervenfaserschädigung – Demyelinisierung oder axonale Degeneration (Griffin et al. 1996; Griffin et al. 1995; Hafer-Macko et al. 1996a; Hafer-Macko et al. 1996b; Ho et al. 1995). Eine vorläufige Klassifizierung (s. Abbildung 1) wurde mittels physiologischer und pathologischer Daten durch Griffin und Kollegen erstellt (Griffin et al. 1996). Darin wird zwischen der akuten inflammatorischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathie (AIDP), die mit über 90 % der Fälle die häufigste GBS-Form in



**Abbildung 1** Klassifikation des GBS nach Griffin et al.

Europa und Nordamerika [18, 19] darstellt, und der vor allem in China und Japan vorkommenden axonalen Form (Kuwabara 2004) unterschieden. Letztere wird aufgrund der betroffenen Faserqualitäten weiter unterteilt in akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) und akute motorisch-sensible axonale Neuropathie (AMSAN). Als weitere Variante des GBS gilt nach Griffin und Kollegen zudem das Miller-Fisher-Syndrom (MFS), das durch Ophthalmoplegie, Ataxie und Areflexie, aber meist fehlende Gliedmaßenschwäche charakterisiert ist. Eine mehr detaillierte Klassifikation folgte 1999 und berücksichtigte neben den bereits genannten Unterformen des GBS auch verschiedene Mischformen sowie verwandte subakute und chronische Erkrankungen (Tabelle 1) (Hughes et al. 1999).

**Tabelle 1** Klassifikation des GBS und verwandter Syndrome von Hughes et al. (Hughes et al. 1999)

Akut (0-4 Wochen bis zum Nadir)	Akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP) Akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) Akute motorisch-sensible axonale Neuropathie (AMSAN) Akute Pandysautonomie (Mericle and Triggs 1997) (Miller-)Fisher-Syndrom (MFS) Guillain-Barré-Fisher-Overlap-Syndrom
Subakut (4-8 Wochen bis zum Nadir)	Subakute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (Hughes et al. 1992)
Chronisch (> 8 Wochen bis zum Nadir, progressiv oder relapsierend)	Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP) Chronische inflammatorische axonale Neuropathie (Chroni et al. 1995)

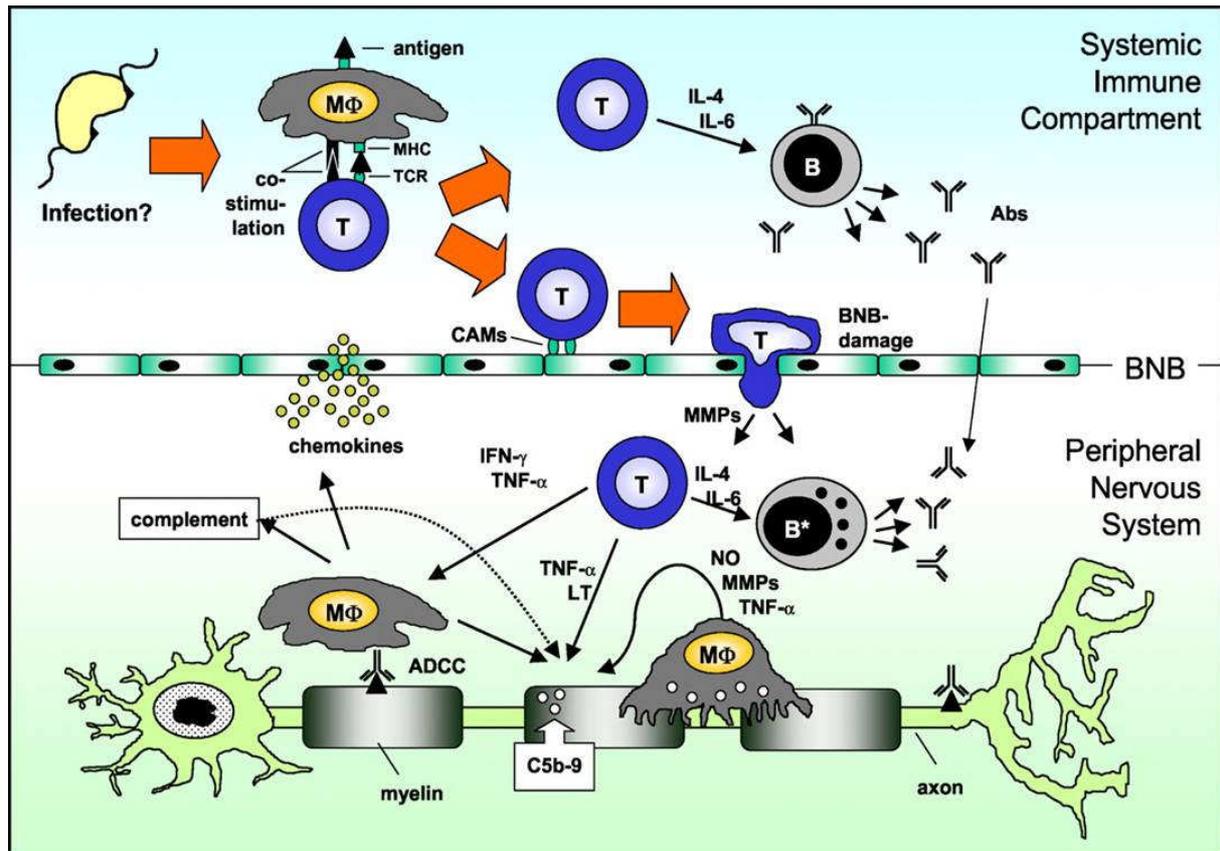
### 2.1.2 Klinisches Bild der AIDP

Die Klinik der in der Regel monophasisch verlaufenden AIDP beginnt mit distalen Parästhesien, Taubheit und/oder Schmerz mitsamt oder unmittelbar gefolgt von einer progressiven und relativ symmetrischen Schwäche der Gliedmaßen. Die Schwäche äußert

sich klassischer Weise in den distalen und proximalen Muskeln und gelangt bei 98 % der Erkrankten innerhalb von 4 Wochen zu ihrer maximalen Ausprägung. Eine Schwächung der respiratorischen Muskeln kann so schwerwiegend ausfallen, dass in bis zu 25 % der Patienten eine künstliche Beatmung notwendig wird (Cosi and Versino 2006). In der Regel kommt es zu einer ausgedehnten Areflexie oder Hyporeflexie. Ebenfalls beschrieben ist eine Beteiligung der Hirnnerven, wobei mit bis zu 50 (70) % der Betroffenen besonders häufig Fazialislähmungen (Vucic et al. 2009), seltener aber auch Paralysen der Nerven der extraokulären Augenmuskeln auftreten (Ito et al. 2008). Des Weiteren treten bei etwa 15 % der an AIDP Erkrankten Störungen des autonomen Nervensystems auf, die von Herzrhythmusstörungen über Hyper- oder Hypotension bis hin zu Ileus und Urinretention reichen können (Kuwabara 2004).

### 2.1.3 Pathologie und Pathogenese der AIDP

Das klassische histopathologische Bild der AIDP stellt sich mit primären segmentalen Demyelinisierungen sowie multifokaler, mononukleärer Zellinfiltration der peripheren Nerven dar. Die Demyelinisierungen können weitverstreut über die ganze Länge des Nerven auftreten oder, vor allem in der frühen Phase der AIDP, auf die proximal gelegenen Nervenwurzeln und die distalen terminalen intramuskulären Nerven beschränkt sein. Bewirkt werden sie durch das so genannte Makrophagen-mediierte Myelinstripping. Hierbei dringen Makrophagen mit ihren Zellfortsätzen durch die Basalmembran der Schwannzellen in das äußere Mesaxon ein, lösen und phagozytieren die Myelinlamellen vom Axon und legen es somit bloß. Signalgeber sind aktivierte T-Zellen, die die Makrophagen gezielt auf Antigene der Schwannzell-Oberfläche oder des Myelins ausrichten. Dies führte lange Zeit zu der Annahme, dass es sich bei der AIDP um eine rein T-Zell-mediierte Immunantwort handelt, was auch durch das Modell der experimentellen autoimmunen/allergischen Neuritis verstärkt wurde, bei dem die Erkrankung hauptsächlich durch eine T-Zell-mediierte Immunität gegen Myelinproteine verursacht wird (s. unten). Dem entgegen steht die Tatsache, dass eine Behandlung mit Plasmapherese zu einer deutlichen Besserung der Symptome führen kann. Da der therapeutische Effekt der „Blutwäsche“ in der Entfernung von humoralen Faktoren wie Antikörpern und Komplement vermutet wird und nicht in der von T-Zellen, scheinen auch erstere eine Rolle bei der Entstehung des GBS spielen. Weiter verstärkt wurde diese Theorie durch den Nachweis von durch Komplement aktivierten Produkten an der abaxonalen Zellmembran myelinisierter Schwannzellen kombiniert mit ausgedehnten, lymphozytären Infiltraten und großen Mengen schaumiger Makrophagen in frühen Stadien der AIDP (Hafer-



**Abbildung 2 Grundprinzipien der zellulären und humoralen Immunantworten** (Kieseier et al. 2002).

Autoreaktive T-Zellen (T) erkennen durch MHC II-Moleküle präsentierte, spezifische Autoantigene und setzen gleichzeitig kostimulierende Signale frei, die auf die Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen (MΦ) wirken. Möglicher Weise wird diese Reaktion durch eine Infektion ausgelöst, die eine molekulare Mimikry bedingt. Die aktivierten T-Zellen können die Blut-Nerven-Schranke kreuzen (BNB) und so in das PNS eindringen, wobei dieser Prozess z. T. durch Chemokine, zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAMs) und Matrix-Metallproteinase (MMPs) vermittelt wird. Innerhalb des PNS aktivieren die T-Zellen Makrophagen, die daraufhin ihre phagozytische Aktivität, die Zytokin-Produktion und die Freisetzung toxischer Mediatoren wie Stickstoffoxid (NO), MMPs und proinflammatorischer Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oder Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) verstärken. Autoantikörper (Abs), die die BNB kreuzen oder mglw. lokal von B-Zellen (B) produziert werden, wirken am Prozess der Demyelinisierung mit. Abs vermitteln Demyelinisierungen durch AK-abhängige, zelluläre Zytotoxizität (ADCC), blockieren mglw. Epitope, die funktionell für die Nervenleitung relevant sind, und aktivieren das Komplementsystem (C') über den klassischen Weg, wodurch proinflammatorische Mediatoren und der lytische C5b-9 Komplex freigesetzt werden. Die Beendigung der Entzündungsantwort wird unter anderem durch Makrophagen vermittelt, die die Induktion einer T-Zell-Apoptose und die Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-10 (IL-10) und *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF $\beta$ ) bedingen.

Macko et al. 1996b). Weiterhin konnten mittlerweile eine Vielzahl von Autoantikörpern im Serum von GBS-Patienten identifiziert werden, von denen einige spezifisch für einzelne Subtypen sind (Kaida et al. 2009). Ein entscheidender Schritt im immunpathologischen Geschehen könnte demnach die spezifische Bindung von Autoantikörpern an bisher nicht identifizierte Antigene der äußeren Schwannzellmembran sein, was im Folgenden zu einer sublytischen Komplement-Aktivierung führt. Die Rolle der T-Zellen wird hierbei in der Öffnung der Blut-Nerven-Schranke gesehen (Pollard et al. 1995), wobei in anderen Fällen die Demyelinisierungen durchaus direkt T-Zell-mediert sein mögen. Die Grundprinzipien der

Immunantworten, die zu einer Demyelinisierung führen können, sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

#### 2.1.4 Prognose bei AIDP

Die Prognose der AIDP ist umso besser, je eher es zu dem Prozess der Remyelinisierung und je weniger es zu sekundären axonalen Degenerationen kommt.

#### 2.1.5 Ätiologie

##### 2.1.5.1 Vorausgehende Infektionen

Die Entwicklung der demyelinisierenden sowie der axonalen Formen des GBS ist häufig assoziiert mit einer vorausgehenden Infektion durch Bakterien und/oder Viren, wobei hier vor allem signifikante Zusammenhänge mit den folgenden Erregern gefunden wurden (Hughes et al. 1999; Kuwabara 2004): *Campylobacter jejuni* (4-66%) (Enders et al. 1993; Hao et al. 1998; Kaldor et al. 1983; Kaldor and Speed 1984; Speed et al. 1984; Tam et al. 2007; Vriesendorp et al. 1995), Zytomegalievirus (5-15%) (Hao et al. 1998; Tabanella and Nowzari 2005), Epstein-Barr-Virus (2-19%) (Hao et al. 1998; Hojberg et al. 2005; Tam et al. 2007) und *Mycoplasma pneumoniae* (1-5%) (Hao et al. 1998). Bestimmte Erreger lösen nicht grundsätzlich einen bestimmten klinischen Subtyp des GBS aus, doch folgen schwere axonale Degenerationen tendenziell häufiger einer Ansteckung mit *C. jejuni* und schwere sensible Störungen bevorzugt einer Infektion mit Zytomegalieviren (Pritchard 2008; Visser et al. 1996) Weiterhin ist zu erwähnen, dass GBS bzw. eine GBS-ähnliche Erkrankung im Rahmen einer HIV-Infektion in der Phase der anti-HIV-Serokonversion ausgelöst werden kann (Brannagan and Zhou 2003; Kumar et al. 2003).

##### 2.1.5.2 Vorausgehende Impfungen

Neben vorausgehenden Infektionen wurde auch eine mögliche Assoziation zwischen GBS und Impfungen beschrieben, wobei jedoch bis heute Beweise fehlen, dass es sich hierbei um mehr als ein zufälliges Vorkommen handelt. 1976 konnte ein leichter Anstieg des GBS-Vorkommens nach der Impfung mit einem bestimmten Stamm der „Schweineinfluenza“-Vakzine beobachtet werden (Kaplan et al. 1982; Kaplan et al. 1983; Langmuir et al. 1984), dessen Ursache bis jetzt vollkommen unbekannt ist und der sich auch im Folgenden mit anderen Influenza-Vakzinen nicht wiederholte (Lasky et al. 1998). Dennoch sollte aus gegebenem aktuellem Anlass erwähnt werden, dass das Guillain-Barré-Syndrom auch heute

noch als sehr seltene (<1/10000) Nebenwirkung einer Impfung mit „Schweineinfluenza“-Vakzinen auf den Beipackzetteln genannt wird. Eine Reihe anderer Impfungen wurde in Fallkontrollstudien als statistisch nicht signifikant für die Entwicklung von GBS ausgeschlossen (Schattner 2005). Hierzu zählen Masernvakzine (Esteghamati et al. 2008; Patja et al. 2001), Tetanustoxoide (Tuttle et al. 1997) und orale Polioimpfstoffe (Kinnunen et al. 1998; Salisbury 1998). Nur das Auftreten von GBS in 1 von 1000 Fällen nach einer Tollwutimpfung mit einer Vakzine, die murines Myelin enthielt, scheint eine reelle Assoziation aufzuweisen, da hier eine Antikörperantwort gegen humanes basisches Protein sowie Galaktozerebroside in Serum und Liquor nachgewiesen werden konnte (Hemachudha et al. 1988). Zudem wird zurzeit in der „Food and Drug Administration“ und in den „Centers for Disease Control and Prevention“ in England ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von 29 GBS-Fällen (April 2009) nach der Impfung mit der tetravalenten Meningokokken-Konjugat-Vakzine A, C, Y und W135 untersucht.

#### **2.1.6 Die Theorie der „molekularen Mimikry“**

Eine weit verbreitete und viel diskutierte Theorie über den auslösenden Mechanismus des GBS ist die „molekulare Mimikry“: im Rahmen einer Infektion werden Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von Erregern gebildet, die sich Epitope mit körpereigenen Bestandteilen wie z. B. Myelinproteinen oder Gangliosiden teilen. Dies soll eine Kreuzreaktion auslösen, die in einer autoimmunen Attacke gegen diese körpereigenen Komponenten mündet. Untermuert wurde diese These durch die Tatsache, dass die Struktur der Lipooligosaccharide (LOS) bestimmter *C. jejuni*-Stämme Ganglioside imitieren (Shu et al. 2006), was wiederum den Verdacht zulässt, dass Anti-Gangliosid-Antikörper durch eine *C. jejuni*-Infektion induziert werden können (Ang et al. 2004).

#### **2.1.7 Elektrodiagnostik bei AIDP**

Elektrophysiologische Untersuchungen spielen eine wichtige Rolle in der Diagnose des GBS und der Klassifizierung der jeweiligen Subtypen. Bei regelgerechter Anwendung und Interpretation kann bestimmt werden, welcher Typ Nervenfasern betroffen ist und welche Art der Nervenschädigung vorliegt. Zudem lassen sich auf diese Art Ausmaß und Lokalisation der Läsionen ermitteln. Zu den routinemäßig eingesetzten Untersuchungsmethoden gehören die Bestimmung der distal-motorischen Latenz, der motorischen sowie der sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit, der F-Welle, des H-Reflexes und somatosensibel evozierter

Potentiale (SSEPs). Eine Untersuchung von jeweils mindestens drei motorischen und sensiblen Nerven wird hierbei empfohlen. Die Elektrophysiologie der AIDP stellt die klassischen Merkmale der Demyelinisierungen und Remyelinisierungen dar (Uncini and Yuki 2009), wobei sich das komplette Bild für gewöhnlich erst 2 bis 3 Wochen nach Auftreten der Erkrankung darstellt. In der akuten Phase, die in den ersten 7 bis 10 Tagen stattfindet und klinisch durch Muskelschwäche charakterisiert ist, treten Leitungsblöcke, verlängerte oder fehlende F-Wellen und/oder verlängerte distal-motorische Latenzen (DML) als elektrophysiologische Korrelate der segmentalen Demyelinisierungen auf. Die Leitungsblöcke sind definiert als die erfolglose Weiterleitung eines Aktionspotentials an einer bestimmten Stelle entlang eines intakten Axons (Kaji 2003) und zurückzuführen auf akute Demyelinisierungen und eventuell auch sekundäre axonale Degenerationen. Sie treten insbesondere in terminalen Nervenendigungen und in der Region der Spinalwurzel auf, was die Hypothese bestärkt, dass Regionen mit fehlender bzw. schwacher Blut-Nerven-Schranke besonders gefährdet sind (Brown and Snow 1991). Reduzierte motorische und/oder sensible Nervenleitgeschwindigkeit und deutlich verlängerte temporale Dispersion der motorischen Antworten sind wiederum charakteristisch für die Phase der Remyelinisierung. Auch hier kann klinisch noch Muskelschwäche auftreten, die jedoch eher mit einer heraufgesetzten Sicherheitsgrenze der Impulsleitung zusammenhängt, die durch eine aktivitätsabhängige Hyperpolarisation sowie Nervenblöcke, die während aufrechterhaltener, willkürlicher Bewegungen entstehen, bedingt ist (Cappelen-Smith et al. 2000).

## **2.2 Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)**

Die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie gilt als die „chronische Schwester“ der AIDP. Sie entwickelt sich für gewöhnlich über Monate und beeinträchtigt meist motorische und sensible Funktionen zugleich (Hughes et al. 2006). Im Gegensatz zum GBS konnten bisher nur wenige Infektionen identifiziert werden, die eindeutig der CIDP vorausgegangen sind. Histopathologisch stellt sich die CIDP durch Makrophagen-vermittelte Demyelinisierungen mit sekundären Remyelinisierungen dar, die von axonalen De- und schließlich Regenerationen begleitet werden können. Typisches Merkmal sind perivaskuläre Makrophagen-Ansammlungen in Biopsien des N. suralis (Sommer et al. 2005) sowie das Auftreten sogenannter *Onion Bulbs* als Zeichen wiederholter De- und Remyelinisierungen. Auch in der CIDP konnten im Serum der Patienten eine Vielzahl von Autoantikörpern gegen verschiedene Antigenen wie z. B. LM1, Sulfatide, Chondroitinsulfat C und  $\beta$ -Tubulin gefunden werden (Connolly et al. 1993; Fredman et al. 1991; Ilyas et al. 1991; Nemni et al.

1993). Allerdings konnte bisher keiner als spezifisch identifiziert werden, was die Heterogenität dieser Erkrankung deutlich widerspiegelt. Wie bei dem GBS deutet der Behandlungserfolg mit Plasmapherese und intravenösen Immunglobulinen darauf hin, dass es sich bei der CIDP um eine Autoimmunerkrankung handelt. Im Gegensatz zu GBS sprechen zudem einige Patienten sehr gut auf hohe Dosen von Kortikosteroiden an.

### **2.2.1 Elektrodiagnostik bei CIDP**

Elektrodiagnostische Studien zeigen demyelinisierende und remyelinisierende Prozesse sowohl von motorischen als auch von sensiblen Nervenfasern an. Dabei treten unter anderem fokale Leitungsblöcke und verlängerte distale Latenzen auf (s. AIDP).

## **2.3 Experimentelle allergische/autoimmune Neuritis (EAN) – Tiermodell des GBS**

Die experimentelle allergische/autoimmune Neuritis (EAN) ist ein etabliertes experimentell induziertes Tiermodell für das GBS. Erstmals beschrieben wurde sie 1955 von Waksman et al., denen es gelang, durch die Immunisierung mit einem Homogenat aus mit Adjuvantien versetztem peripheren Nervengewebe eine paralytische Erkrankung in Kaninchen auszulösen, deren histopathologisches Korrelat sich als Entzündungsreaktionen im peripheren Nervensystem (PNS) zeigte (Waksman and Adams 1955). Damit konnte erstmals die Idee einer autoimmunen Ätiologie des GBS gestärkt werden. Ein Jahr später wies dieselbe Arbeitsgruppe nach, dass die EAN auch in murinen Spezies sowie Meerschweinchen reproduziert werden kann (Waksman and Adams 1956). Heutzutage wird die EAN am häufigsten in vom Wistar-Stamm abstammenden Lewis-Ratten untersucht, die sich als besonders anfällig für autoimmune Reaktionen erwiesen haben (Gold et al. 2000).

Man unterscheidet heute zwei Arten der EAN in Tieren: die klassische EAN sowie die *Adoptive Transfer*-EAN (AT-EAN).

### **2.3.1 Klassische EAN**

Die klassische EAN wird in anfälligen Ratten oder Mäusen mittels aktiver Immunisierung mit peripherem Myelin-Extrakt, gereinigten bovinen oder auch humanen P2-Myelinprotein oder synthetischen P2-Peptiden jeweils versetzt mit komplettem Freund's Adjuvant induziert (Hahn 1996). Etwa 10 Tage nach der Immunisierung entwickeln die Tiere eine progressive

Paralyse, die ihren Höhepunkt ungefähr am 17. Tag erreicht. Es folgt eine sukzessive Erholung, die zum 21. Tag ihren Abschluss findet. Pathomorphologisch zeigen sich zu Beginn vor allem in den Spinalwurzeln, später auch in den peripheren Nerven Ödeme und lymphozytäre Infiltrate, denen eine mononukleäre Zellrekrutierung sowie eine Makrophagen-medierte primäre Demyelinisierung folgen (Hahn 1996; Toyka 1999).

### 2.3.2 AT-EAN

Um die AT-EAN auszulösen, werden Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus den Lymphknoten von an EAN erkrankten Tieren gewonnen und durch Zugabe des entsprechenden Antigens, von Interleukin 2 und Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) *in vitro* vermehrt (Toyka 1999). Diese werden anschließend intravenös in immunologisch naive, syngene Tiere injiziert. Vier Tage nach der Injektion beginnt sich die Krankheit klinisch durch das Auftreten von Paraparese bis -plegie, Tetraplegie und Schwanzatonie sowie histopathologisch mit den typischen Veränderungen wie Demyelinisierungen und endoneuralen Entzündungszellinfiltraten zu zeigen (Gold et al. 2000). Mittels einer Magnet-Resonanz-Neurographie mit dem Kontrastmittel Gadofluorin M konnte in der AT-EAN ermittelt werden, dass die Entwicklung der neuralen Läsionen weit proximal im PNS beginnt und sich erst im Verlauf der Erkrankung nach distal ausbreitet. Weiterhin erlaubte die AT-EAN die Identifizierung neuer Autoantigene, wie dem P0-Protein (Linington et al. 1992), dem Myelin-Basischen Protein (Abromson-Leeman et al. 1995), dem PMP-22 (Gabriel et al. 1998) und dem Myelin-assoziierten Glykoprotein (Weerth et al. 1999), die autoimmune Neuritiden in Ratten und Mäusen auslösen, die dem humanen GBS ähneln. Allerdings weisen die induzierten Neuropathien untereinander und zur GBS Abweichungen bezüglich des Auftritt-Zeitpunktes und der Schwere der Krankheit auf (Kieseier et al. 2004).

In beiden Modellen hängt die Schwere der induzierten Erkrankung von der injizierten Menge des jeweiligen Antigens bzw. der T-Zellen ab (Hahn et al. 1988). Anhand von histopathologischen und elektrodiagnostischen Untersuchungen wurde ermittelt, dass die mit der Aktivierung Antigen-spezifischer T- und B-Zelllinien einhergehende klassische EAN überzeugend die akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP) widerspiegelt, während die AT-EAN unter Umständen mehr Ähnlichkeiten zu den axonalen Formen des GBS aufweist (Taylor and Pollard 2001; 2003).

### 2.3.3 Chronische EAN

Neben der Entwicklung der bereits beschriebenen Formen der EAN als Modell für GBS wurde auch daran gearbeitet, eine chronische Form der EAN als Modell für die CIDP zu entwickeln. Um dies zu bewirken, wurden verschiedene Methoden getestet. In einer Studie von 1985 immunisierte man zwei Wochen alte Meerschweinchen. Im Gegensatz zu adulten Tieren, die eine typisch akute EAN mit monophasischem Verlauf entwickelten, zeigten die jungen Tiere eine chronische oder relapsierende EAN. Allerdings konnten die beiden Formen morphologisch nicht unterschieden werden. Als Ursache für die unterschiedliche klinische Ausprägung wurde eine juvenil-bedingte Immuninkompetenz vor allem im Bereich der zellulären Immunität vermutet (Suzumura et al. 1985). McCombe et al. gelang es einen klinisch der CIDP ähnelnden, chronisch-relapsierenden Verlauf in Lewisratten auszulösen (McCombe et al. 1992). Hierfür behandelten sie die Tiere nach der Inokulation von bovinem Myelin aus dem Nervenwurzelbereich und Adjuvantien subkutan mit Cyclosporin A (4 mg/kg, 3 Tage/Woche ab dem Tag der Inokulation bis Tag 29). Allerdings konnte auch hier die Morphologie der Ratten mit akuter EAN (Kontrolltiere ohne Cyclosporin A-Behandlung) und solcher mit chronischer (mit Cyclosporin A-Behandlung) in der ersten Episode nicht unterschieden werden. Beide Gruppen zeigten entzündliche Infiltrate sowie primäre Demyelinisierungen in Nervenwurzeln und Dorsalwurzelganglien. Alle Tiere, die die erste Episode überstanden hatten, wiesen Remyelinisierungen auf. Nur in den mit Cyclosporin A-behandelten Tieren folgte eine zweite Episode mit schweren Entzündungsreaktionen sowie De- und Remyelinisierungen der Nervenwurzeln und Spinalganglien. Vor allem in späteren Stadien dieser Episode kamen zudem noch signifikante De- und Remyelinisierungen in den Spinalnerven, dem N. ischiadicus sowie interessanter Weise auch im Hinterstrang des Rückenmarks hinzu. In späteren Rückfällen fanden sich deutlich weniger entzündliche Komponenten, aber anhaltende Demyelinisierungen sowie nun auch die für CIDP typischen *Onion Bulbs*. Letztere zeigten sich gelegentlich auch verhältnismäßig klein ausgebildet in Kontrolltieren, die mit einer sehr hohen Myelindosis geimpft worden waren. In den entzündlichen Läsionen der späteren Episoden fiel zudem eine große Beteiligung von Plasmazellen auf.

### 2.3.4 EAN in Hühnern

Neben den Studien in Mäusen, Ratten und Meerschweinchen wurde die EAN auch in Hühnern erforscht (Lampert et al. 1977a). Hierfür injizierten Lampert und Kollegen

intradermal ein Homogenat bestehend aus 10 % humanem peripheren Nerven, komplettem Freund´s Adjuvans und Pertussis-Vakzine. Zehn bis 21 Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere getötet und licht- sowie elektronenmikroskopisch untersucht. Eine klinische Symptomatik entwickelten die Tiere in diesem Zeitraum nicht, doch histopathologische Läsionen konnten ab dem 15. Tag in peripheren Nerven und hier vor allem in den Nervenwurzeln und Ganglien festgestellt werden. Es zeigten sich perivenuläre Infiltrate vermutlich lymphohistiozytärer Zellen, die sich im erweiterten, endoneuralen Gewebe zwischen myelinisierten Axonen ansammelten. Einige Myelinscheiden inmitten oder nahe der Infiltrate wiesen sich zentripetal fortsetzende, interlamelläre Aufweitungen auf, die durch ein Auseinanderweichen der *Intraperiod Line* bedingt waren.

Mononukleäre Zellen invadierten die Basallamina der Schwannzellscheide, trennten die Schwannzellen von ihrer Myelinscheide und zeigten sich in engem Kontakt mit Myelindisintegration und -lysis. Komplette demyelinisierte Axone waren umrundet von mit Myelindebris gefüllten Makrophagen. Schwannzellen innerhalb infiltrierter Bereiche zeigten reaktive oder proliferative, aber keinerlei degenerative Veränderungen. Die EAN des Huhns wies damit Veränderungen auf, die auch in der EAN bei klassischen Labortieren beschrieben sind und machten das Haushuhn zu einer interessanten Alternative für tierexperimentelle Studien im Rahmen der Erforschung GBS-ähnlicher Erkrankungen.

## **2.4 Demyelinisierende Neuropathien beim Huhn**

### **2.4.1 „Periphere Neuropathie“ (PN) bei Weißen Leghorn-Hühnern**

Seit den Mittsechzigern (Julian 1992) wird ein als „Periphere Neuropathie“ (PN) bezeichnetes neurologisches Syndrom in Weißen Leghorn-Hühnern beobachtet, welches mit niedriger Frequenz in kommerziellen Legehennen-Herden auftritt. Erstmals namentlich erwähnt wurde die PN 1992 in einem Abstract von Julian (Julian 1992), worin er zusätzlich zum klinischen Bild der progressiven Parese bis Paralyse eine augenfällige Vergrößerung peripherer Nerven sowie deren lymphozytäre Infiltration beschrieb. Damit gleichen die Veränderungen den so genannten B-Typ-Nervenläsionen der Marekschen Krankheit (*Marek´s Disease*, MD) und zeigten – bis auf das Fehlen neoplastischer Infiltrate – typische Anzeichen der klassischen oder Nerven-Form der MD. Dennoch zweifelte Julian die Infektion mit dem die MD verursachenden Virus (MDV) als Ursache an.

1994 wurde eher zufällig herausgefunden, dass die Inzidenz von Paralyse und Nervenvergrößerung in Hühnern stark vom Haupthistokompatibilitätskomplex (Abk. MHC von *Major Histocompatibility Complex*) beeinflusst wurde (Bacon and Witter 1994). Eigentliches Ziel der Untersuchungen war zu prüfen, ob bestimmte B-Haplotypen als Bestandteil des Hühner-MHC einen Einfluss auf die Impfmunität gegen MD hat. Hierfür wurden die Genotypen von klinisch scheinbar an MD-erkrankten sowie gesunden Tieren getestet mit dem Ergebnis, dass Tiere mit dem [B2/B19]-Genotyp einen höheren Anteil erkrankter Tiere aufwiesen als solche mit [B2/B21]. MDV hingegen konnte nicht isoliert werden, was wiederum die Frage aufwarf, ob es sich bei dieser neurologischen Erkrankung tatsächlich um Marek oder doch vielmehr um PN handelte.

In einer israelischen Studie von 1998 wurde ein Paralysesyndrom bei jungen Leghorn-Hennen auf PCR-Basis untersucht, bei dem es sich vermutlich ebenfalls um PN handelte (Davidson et al. 1998). Wiederum konnten in keinem der betroffenen Tier Serotyp-1-MDV-Feldstämme, die die Mareksche Krankheit auslösen, nachgewiesen werden.

Im Jahr 2001 untersuchten Bacon und Witter (Bacon et al. 2001) die PN gezielt auf die Frage hin, ob sie eine bisher unbekannte Form der MD darstellt. Hierfür wurden umfassende pathologische und virologische Tests und Übertragungsversuche durchgeführt sowie der Einfluss von verschiedenen MD-Vakzinen untersucht.

#### 2.4.1.1 Klinik

Klinisch präsentierte sich die PN durch verschiedene Grade der Lahmheit oder Lähmung sowie gelegentliche Inkoordination und Ataxie. Bei drei isoliert gehaltenen, erkrankten Hühnern blieben die klinischen Symptome auch 17 Tage nach Ausbruch der PN unverändert bestehen.

#### 2.4.1.2 Pathologie

Alle Feldfälle wiesen eine Vergrößerung peripherer Nerven auf, wobei der N. ischiadicus am stärksten betroffen war. Insbesondere beim N. vagus zeigten die Verdickungen zudem ein unregelmäßiges oder knotiges Erscheinungsbild. Die lymphatischen Gewebe Bursa, Thymus und Milz wiesen eine Atrophie auf. Histopathologische Untersuchungen der peripheren Nerven zeigten lymphozytäre und Plasmazell-Infiltrationen sowie in fortgeschrittenen Fällen ein endoneurales Ödem und damit ein Veränderungsmuster, das in der Diagnostik der MD als B-Typ-Nervenläsion beschrieben wird. Die Hirne zeigten gelegentlich eine milde Gliose

sowie eine Verdickung der Blutgefäßwände, waren aber ansonsten unverändert. Bursa, Thymus und Milz offenbarten eine lymphozytäre Depletion.

Immunhistochemisch setzten sich die zellulären Infiltrate aus T-Zellen und ihren Untergruppen, den T-Helfer-Zellen und den zytotoxischen T-Zellen, sowie einigen Makrophagen zusammen. Marker für B-Zellen wurden nicht verwendet.

#### *2.4.1.3 Virologische Untersuchungen*

Verschiedene virologische Tests (Inokulation empfänglicher Gewebekulturen, PCR, Immunfluoreszenz) auf krankheitserregendes Serotyp-1 MDV und das Retikuloendotheliose-Virus fielen bei allen Tieren negativ aus, wodurch eine Assoziation der PN mit diesen Viren als unwahrscheinlich ausgeschlossen wurde.

#### *2.4.1.4 Übertragungsversuche*

Bei den Inokulationsversuchen konnte festgestellt werden, dass die Übertragung von Vollblut oder weißen Blutkörperchen PN-erkrankter Tiere in bis zu einem Drittel der inokulierten Tiere zu klinischen Symptomen und den entsprechenden histopathologischen Veränderungen führte. Es bestätigte sich hier, dass Tiere mit dem Genotypen [B2/B19] statistisch signifikant häufiger an PN erkrankten ( $p < 0,05$ ) als solche mit dem Genotypen [B2/B21]. Dennoch schlugen Transferversuche mit [B19/B19]-Tieren fehl. Die Inokulation von Serum erkrankter Tiere führte nicht zu einer Übertragung der PN. Wenige Anhaltspunkte gab es zudem für eine Übertragung durch direkten Kontakt mit klinisch erkrankten Hühnern.

#### *2.4.1.5 Unterschiede der PN zur MD*

Nachdem ein Bezug zur MD als unwahrscheinlich ausgeschlossen wurde, suchten Bacon und Witter mögliche Differenzierungsmöglichkeiten der PN zur MD zu definieren und Einblicke in Pathogenese und mögliche Ätiologie durch experimentelle Reproduktion zu erlangen. Als Unterscheidungskriterien führten sie auf, dass klinische Symptome bei der PN im Feld bereits ab einem Alter von 6 Wochen beobachtet wurden, während MD für gewöhnlich erst ab der 8 bis 9 Lebenswoche auftritt (Calnek and Witter 1997). Weiter wiesen bei der PN pathohistologisch nahezu alle vergrößerten Nerven B-Typ-Läsionen, die durch eine fokale bis diffuse inflammatorische Infiltration von Lymphozyten and Plasmazellen sowie gelegentlich Ödem gekennzeichnet sind (Payne and Biggs 1967), nicht jedoch viszerale Lymphome auf. Im Gegensatz dazu präsentiert sich die MD typischerweise mit A-Typ-Nervenläsionen, charakterisiert durch die neoplastische Infiltration proliferierender, lymphoblastischer Zellen (Payne and Biggs 1967), und viszeralen Lymphomen. Wichtigstes Unterscheidungskriterium

war jedoch die Tatsache, dass Serotyp-1-MDV weder in den Tieren gefunden, noch aus ihnen isoliert werden konnte und die Gabe von MD-Vakzinen weder im Feld noch in experimentell induzierten Fällen Schutz gegen PN bot.

#### 2.4.1.6 Theorien zur Ätiologie

Die Ätiologie konnte bisher nicht geklärt werden, jedoch wird ein autoimmunes Geschehen vermutet (Bacon et al. 2001; Julian 1992; Witter and Bacon 1995), bei dem genetische (B19-Allel), bakterielle oder virale Faktoren sowie die in kommerziellen Betrieben vorgenommenen, multiplen Impfungen eine Rolle spielen könnten. Hinweisend hierfür ist unter anderem, dass in ungeimpften Tieren und spezifisch pathogenfreien (SPF) Hühnern keine PN-Erkrankungen auftreten. Des Weiteren konnten Bacon und Witter nicht ausschließen, dass Serotyp-2 und Serotyp-3 MD-Vakzine die beschriebene Symptomatik bei genetisch prädisponierten oder (z. B. durch multiple Impfungen) immunsupprimierten Tieren durch eine zellvermittelte, gegen Nervengewebe gerichtete Autoimmunität auslösen. Denn obwohl im Feld nur Serotyp-1-Stämme die Mareksche Krankheit auslösen, gelang es durch Inokulations-Versuche mit Serotyp-2- und Serotyp-3-MD-Vakzinen Nervenläsionen herbeizuführen, die denen der PN stark ähnelten (Calnek et al. 1980; Witter et al. 1990).

### 2.4.2 Mareksche Krankheit der Hühner (Marek's Disease, MD)

Obwohl bisherige Untersuchungen keine Assoziation des Erregers der Marekschen Krankheit mit dem in Weißen Leghorns auftretenden, paretischen Syndrom nachweisen konnten, erfordert die deutliche klinische und histopathologische Ähnlichkeit eine genaue Betrachtung dieser weit verbreiteten und häufig vorkommenden Geflügelerkrankung.

#### 2.4.2.1 Ätiologie

Die Mareksche Krankheit ist eine lymphoproliferative Erkrankung der Hühner, die durch eine mononukleäre Infiltration peripherer Nerven sowie verschiedener anderer Organe und Gewebe inklusive Iris und Haut charakterisiert ist. Ausgelöst wird sie durch ein gallines Herpesvirus, das sogenannte MDV (*Marek's Disease Virus*), das durch seine Genomstruktur den  $\alpha$ -Herpesviren, aufgrund seiner biologischen (lymphotropen) Fähigkeiten aber den  $\gamma$ -Herpesviren ähnelt, zu denen unter anderem auch das Epstein-Barr-Virus gehört (Buckmaster et al. 1988).

Man unterscheidet im Allgemeinen drei Serotypen, von denen allerdings nur der Serotyp 1 die Mareksche Krankheit auslöst. Serotyp 1 MDV ist hoch infektiös und kann zytolytische Infektionen der Lymphozyten sowie viszerale Tumoren und neurale Läsionen verursachen. Im Gegensatz dazu sind Serotyp 2 MDV sowie Serotyp 3, das so genannte Puten-Herpesvirus (*Turkey Herpesvirus*, HVT), natürlich auftretende, infektiöse Viren, die für Hühner apathogen oder nur schwach pathogen und insbesondere nicht onkogen sind. Da sie eine Immunität gegen alle MDV-Serotypen inklusive Serotyp 1 auslösen, werden sie im Rahmen der MD-Vakzinierung genutzt.

#### 2.4.2.2 *Klinisches Bild des Marekschen Krankheit*

Das klinische Bild der MD hat sich in den 100 Jahren seit der Erstbeschreibung durch József Marek (Marek 1907) dramatisch gewandelt und an Schwere zugenommen (Osterrieder et al. 2006). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts trat MD meist nur sporadisch auf und zeigte einen chronischen Verlauf. Diese heute als „klassische“ oder „Nervenform“ bezeichnete Ausprägung der MD äußerte sich klinisch als progressive, asymmetrische Parese bis Paralyse der Extremitäten (Abbildung 3 B), die durch eine periphere Neuritis bedingt war. Ab 1925 wurde zusätzlich zu den Nervenveränderungen das Auftreten von viszeralen Lymphomen beobachtet. Ab 1950 wich die klassische schließlich einer akuten Form der Krankheit mit aggressiveren und sich rascher entwickelnden Tumoren. Auch während der letzten 25 Jahre ist die Virulenz von MDV kontinuierlich weiter angestiegen und hat das Bild erneut verändert. Neben dem erhöhten Auftreten viszeraler Lymphome kam mit der „Transienten Paralyse“ eine Manifestation der MD im zentralen Nervensystem (ZNS) hinzu. Diese ging bei gesteigerter Mortalität und früher Sterblichkeit mit perakuten bis akuten Todesfällen selbst in vollvakzinierten Tieren einher und ließ vormals schützende Impfstoffe und Impfprogramme wirkungslos werden. Letzteres regte dazu an, ein Klassifikationsschema zur Virulenz einzelner MDV-Stämme zu entwickeln, das auf Isolaten von Impfdurchbrüchen und ihrer Antwort auf unterschiedliche, kommerziell verfügbare Vakzine sowie Impfstoffkombinationen basiert (Witter 1997). Es verfügt über vier Pathotypen: mild (m), virulent (v), very virulent (vv) und very virulent plus (vv+). Den mMDV-Stämmen wird die klassische oder Nerven-Form der MD zugeschrieben. Die mit der Intensivierung der Geflügelindustrie in den Vordergrund tretende akute MD wurde zunächst durch virulente MDV-Stämme verursacht. Diese wurden schließlich durch die vv sowie vv+ Stämme abgelöst, die bei steigender Virulenz eine ausgeprägte Pathogenität in vakzinierten Hühnern zeigen und neben den viszeralen Lymphomen auch die Transiente Paralyse verursachen können.

### 2.4.2.3 *Übertragung und Pathogenese des MDV*

Unter natürlichen Bedingungen wird die MD-Infektion in Ställen durch die Inhalation von Hautschuppen, Einstreu und Federn übertragen. MD-infizierte Tiere bilden im Federfollikel (FFE) über mehrere Wochen zellfreie, vollinfektiöse Viruspartikel, die vermutlich in zellulärem FFE-Debris gebunden sind und über Abschilferung in die Umwelt freigegeben werden. Nach der Aufnahme infektiöser MDV kommt es zunächst zu einer akuten zytolytischen Infektion des lymphoiden Gewebes vor allem in Bursa, Thymus und Milz (Payne and Rennie 1973), wobei die B-Zellen zunächst die primäre Zielzellen sind (Shek et al. 1983). T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) und zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) werden im Folgenden aktiviert und ebenfalls infiziert. Einige dieser aktivierten, infizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen unterliegen einer Transformation zu neoplastischen Zellen. In den betroffenen Organen sieht man eine ausgeprägte Zytolyse von B- und T-Lymphozyten und Retikulumzellen sowie teils zahlreiche intranukleäre Einschlusskörperchen. Zudem findet eine akute bis subakute inflammatorische Reaktion mit granulozytärer Infiltration und einem Anstieg an Retikulumzellen und Makrophagen statt. Während es in Bursa und Thymus zu einer massiven Regression der bursalen Lymphfollikel und der Thymusrinde kommt und zahlreiche Thymozyten durch Apoptose zugrunde gehen (Morimura et al. 1996), fehlen diese Veränderungen in der Milz. Sie zeigt ausschließlich entzündliche Reaktionen.

Es folgt eine persistierende, zellassozierte Virämie, wobei davon ausgegangen wird, dass die Viren durch infizierte Zellen in Knochenmark und FFE transportiert werden. Zudem gelangen die Viren – je nach Form der MD – auch in andere parenchymatöse Gewebe. Da für diese Studie allein die durch eine MDV-Infektion ausgelösten Veränderungen in peripheren Nerven interessant sind, wird im Folgenden ausschließlich auf die periphere Neuritis im Rahmen der klassischen bzw. Nervenform der MD eingegangen.

### 2.4.2.4 *Klassische bzw. Nervenform der MD (Mareksche Hühnerlähme; Fowl Paralysis; Range Paralysis)*

Die klassische MD ist charakterisiert durch eine zelluläre Infiltration der peripheren Nerven, die zu einer progressiven, asymmetrischen Paralyse der Hühner und einer makroskopischen Vergrößerung der Nerven führt. Die ersten histopathologisch erkennbaren Veränderungen zeigen sich fünf (elektronenmikroskopisch) bzw. zehn Tage (lichtmikroskopisch) nach Infektion in Form einer endoneuralen Infiltration, die sich vor allem aus Makrophagen und einigen Lymphozyten zusammensetzt (Lawn and Payne 1979; Payne and Rennie 1973). Es folgt eine Akkumulation und Proliferation lymphoider Zellen

und Makrophagen, die zu den so genannten A-Typ-Läsionen führen (Payne and Biggs 1967). Diese haben ein neoplastisches Erscheinungsbild – typischerweise bestehend aus einer gemischten Population kleiner, mittlerer und großer blastischer Lymphozyten, aktivierter Retikulumzellen sowie Makrophagen – und scheinen identisch zu sein mit den Tumoren, die sich in den lymphomatösen Formen der MD in einer Vielzahl von anderen Geweben entwickeln können. Über 75 % der infiltrierenden Zellen sind T-Zellen – wobei in hochanfälligen Tieren der Anteil an CD4-positiven Zellen höher ist als der an CD8-positiven Zellen –, der überwiegende Rest B-Zellen (Burgess et al. 2001). Voll entwickelte A-Typ-Läsionen werden von Zell-vermittelten, primären, segmentalen Demyelinisierungen begleitet, die in der 4. und 5. Woche nach Infektion ihre stärkste Ausprägung haben und mit dem klinischen Auftreten paralytischer Symptome korrelieren (Lawn and Payne 1979). Ultrastrukturell zeigt sich, dass sie durch Lymphozyten und Makrophagen verursacht werden, die durch die Basalmembran der Schwannzellen eindringen und die Myelinscheide der Nerven zerstören. Die Erkenntnisse früherer Studien, dass normales Myelin in MD eine Hypersensibilitätsreaktion der Haut auslöst und sowohl Zell-gebundene als auch Serum-Antikörper gegen Myelin vorhanden sind, deuten darauf, dass es sich bei dem Vorgang der Demyelinisierung um ein (auto)immunologisch mediiertes Geschehen handelt (Pepose et al. 1981; Schmahl et al. 1975). Damit ist der immunpathologische Prozess der Demyelinisierung ähnlich denen, die in der experimentellen allergischen Neuritis in Hühnern (Lampert et al. 1977a) und auch im Guillain-Barré-Syndrom des Menschen (Pepose et al. 1981) auftreten.

Neben der neoplastischen A-Typ-Läsion sind noch zwei weitere Varianten beschrieben worden (Payne and Biggs 1967). Die B-Typ-Läsionen werden durch ein endoneurales Ödem, lymphoplasmazelluläre Infiltration mit T- und auch B-Zellbeteiligung und primäre Demyelinisierungen charakterisiert und als entzündliche Reaktion angesehen. Es wird vermutet, dass sie auf eine A-Typ-Antwort folgen und Anzeichen der Regression darstellen (Burgess et al. 2001; Payne and Biggs 1967). Wie bereits in Abschnitt 2.4 beschrieben, ähneln diese Nervenveränderungen damit deutlich denen, die bei der peripheren Neuropathie beobachtet werden. Die dritte Variante, die so genannte C-Typ-Läsion, wird als milde entzündliche Reaktion gedeutet, die mit einer geringgradigen Infiltration kleiner Lymphozyten und weniger Plasmazellen einhergeht, den Nerven selbst jedoch unverändert lässt.

### 2.4.3 „Idiopathische Polyneuritis“ (IP) in SPF-Hühnern

In den 70er Jahren trat in England über eine Periode von acht Jahren sporadisch die so genannte „Idiopathische Polyneuritis“ (IP) in SPF gehaltenen Rhodeländer-Hühnern auf (Biggs et al. 1982). Die Tiere erkrankten in einem Alter von 5 bis 13 Wochen bei einer niedrigen Inzidenz bis höchstens 2,6 %. Klinisch präsentierte sich die IP mit einer Parese bis Paralyse vor allem der Beine sowie gelegentlich der oberen Augenlider. Makropathologisch zeigte sich eine Vergrößerung der peripheren Nerven, histopathologisch präsentierten sich die betroffenen Nerven mit Veränderungen ähnlich denen der bei der klassischen MD auftretenden B-Typ-Nervenläsionen der MD. Das ZNS war in keinem der Fälle betroffen. Als Ursache wurde eine autoimmune Reaktion gegen Bestandteile von Nervengewebe, eventuell bedingt durch einen genetisch-determinierten, immunologischen Defekt, in Betracht gezogen. MDV als ursächlicher Erreger wurde nach eingehenden Tests als unwahrscheinlich ausgeschlossen.

### 2.4.4 Durch Riboflavinmangel bedingte demyelinisierende aviäre periphere Neuropathie

Eine ebenfalls mit primärer Demyelinisierung einhergehende periphere Neuropathie ist bei schnell wachsenden Broilerrassen beschrieben worden, die ab dem Tag ihres Schlupfes Futter mit relativem Riboflavinmangel (Vitamin B2) erhalten (Bethke and Record 1942; Cai et al. 2006a; Cai et al. 2006b; Johnson and Storts 1988; Jortner et al. 1987; Phillips and Engel 1938a; b). Innerhalb der 2. Woche nach dem Schlupf entwickeln die Tiere eine charakteristische progressive, symmetrische Lähmung, die zu einem Einrollen der Zehen führt („*Curled Toe*“ *Paralysis*). Makropathologisch finden sich wiederum vergrößerte periphere Nerven. Mikroskopisch fallen segmentale Demyelinisierungen begleitet von Schwanzzellhypertrophie aber auch Schwanzzelldegenerationen, endoneuralem Ödem, perivaskulärer, leukozytärer Infiltration und gelegentlich sekundären axonalen Degenerationen auf. Remyelinisierungen der Nervenfasern können mit Eintritt der ersten klinischen Symptome beobachtet werden und werden in späteren Phasen von einer variierenden klinischen Verbesserung begleitet. Das Bild wird vervollständigt durch Myelinveränderungen wie Tomakulaformationen (redundante Myelinfaltungen) und Hypermyelinisierung (Cai et al. 2006a; Cai et al. 2006b) sowie ungewöhnliche fibroblastische *Onion Bulbs* (Cai et al. 2007). Das Verteilungsmuster der Läsionen zeigt ein selektives Auftreten im Verlauf der Nervenstämmen, während die proximal gelegenen Nervenwurzeln

und die distal gelegenen Gebiete der terminalen Nervenverzweigungen unversehrt bleiben (Cai et al. 2009). Ursache dieser Neuropathie ist vermutlich ein erniedrigter zellulärer Energiestoffwechsel durch erniedrigte Gewebekonzentrationen von auf Riboflavin basierenden Koenzymen, der in bestimmten kritischen Phasen des Wachstums eine schwere Schädigung der Schwanzzellen verursacht (Cai et al. 2007; Jortner et al. 1987). Die Zuführung von Riboflavin über die Nahrung führt zu einer rapide eintretenden klinischen Besserung. Ab der 3. Lebenswoche kann es auch zur spontanen Erholung kommen, vermutlich bedingt durch eine ab da ausreichende, endogene, mikrobielle Riboflavinsynthese im Darm der Tiere und dem Sinken des metabolischen Bedarfs im Rahmen der Myelinbildung durch eine erniedrigte Wachstumsrate (Summers et al. 1995).

### 3 Eigene Arbeiten

**Artikel 1: Studie zur Neuropathologie und Immunbiologie der AvIDP der Weißen Leghorn-Hühner (publiziert im *Journal of Neuroinflammation*): Acute parietic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans**

#### Abstract

#### Background

Sudden limb paresis is a common problem in White Leghorn flocks, affecting about 1% of the chicken population before achievement of sexual maturity. Previously, a similar clinical syndrome has been reported as being caused by inflammatory demyelination of peripheral nerve fibres. Here, we investigated in detail the immunopathology of this parietic syndrome and its possible resemblance to human neuropathies.

#### Methods

Neurologically affected chickens and control animals from one single flock underwent clinical and neuropathological examination. Peripheral nervous system (PNS) alterations were characterised using standard morphological techniques, including nerve fibre teasing and transmission electron microscopy. Infiltrating cells were phenotyped immunohistologically and quantified by flow cytometry. The cytokine expression pattern was assessed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). These investigations were accomplished by MHC genotyping and a PCR screen for Marek's disease virus (MDV).

#### Results

Spontaneous paresis of White Leghorns is caused by cell-mediated, inflammatory demyelination affecting multiple cranial and spinal nerves and nerve roots with a proximodistal tapering. Clinical manifestation coincides with the employment of humoral immune mechanisms, enrolling plasma cell recruitment, deposition of myelin-bound IgG and antibody-dependent macrophageal myelin-stripping. Disease development was significantly linked to a 539bp microsatellite in MHC locus LEI0258. An aetiological role for MDV was excluded.

**Conclusions**

The paretic phase of avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuritis immunobiologically resembles the late-acute disease stages of human acute inflammatory demyelinating polyneuropathy, and is characterised by a Th1-to-Th2 shift.

## Background

With an incidence of about 1.5 per 100.000 citizen, Guillain-Barré syndrome (GBS) is the most common cause of acute flaccid paralysis in the western hemisphere and probably worldwide (Yu et al. 2006). Amongst different GBS subtypes, acute inflammatory demyelinating polyneuropathy (AIDP) is the most prevalent form in Europe, North America and Australia. AIDP is histopathologically characterised by the combination of primary demyelination and infiltration by lymphocytes and macrophages (Hughes et al. 1999). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) is pathologically and epidemiologically (Latov 2002) similar to AIDP but it shows a protracted or relapsing disease course (McCombe et al. 1987), and is usually responsive to immunosuppression by glucocorticoid treatment (Hadden and Hughes 2003).

Both GBS and CIDP are immune-mediated disorders involving humoral and cellular effector mechanisms (Hughes et al. 1999). Thereby, both cascades appear to follow a stage-specific sequence. After exposure to a causative environmental (or endogenous) antigen, autoimmune mechanisms firstly are activated in a T-helper cell 1 (Th1)-specific manner (Csurhes et al. 2005). Even though, in clinical settings, the initial trigger usually remains unknown, certain specific infections and vaccinations have been found to precede episodes of GBS, and it has been hypothesized that the associated immunogens cross-react with epitopes of peripheral myelin by means of a molecular mimicry (Hadden and Hughes 2003; Hughes et al. 1999; Nachamkin et al. 1999; Shu et al. 2006). Recent studies have revealed that during the plateau or recovery period of late stages of GBS there is a shift from Th1 towards T-helper cell 2 (Th2)-guided events, which suggests that the myelin-specific, Th2-mediated humoral response might ameliorate the disease course (Dahle et al. 1997; Ekerfelt et al. 2001).

To date, most insights into the immunobiology of inflammatory demyelinating neuropathies (IDP) have been gained from experimental animal studies. The most frequently employed model for GBS is experimental autoimmune neuritis (EAN) generated in Lewis rats. These animals are immunized with peripheral myelin or with the purified myelin proteins P0, P2 and/or PMP22. Alternatively, EAN can be induced by adoptive transfer of activated P2-specific neuritogenic T-lymphocytes (Linington et al. 1984). Various different EAN subtypes mirror the different types and stages of natural IDP. Active EAN and “adoptive-transfer EAN”, for example, reflect the Th1-dominated stages of GBS (Gold et al. 2000; Maurer et al. 2002) whereas immunisation with a single large dose of PNS myelin or galactocerebrosides in complete Freund’s adjuvants lead to a chronic progressive or relapsing disease course, compatible with human CIDP (Hahn 1996). None of the experimental models, however, is

appropriate in all regards as they may include central nervous system (CNS) involvement, which is not typical of natural IDP (Gold et al. 2000). Moreover they involve well-defined immunogenic triggers that are more likely to be targets of secondary exposure than the disease-causing immunogen in natural IDP.

Hence, a spontaneous animal model would be useful to gain deeper insights into the complex immunological aspects of disease development, if it were to prove reproducible and broadly available for translational research.

To date, spontaneous forms of CIDP have been described in dogs and cats (Braund et al. 1996), but the apparently low prevalence in these species precludes in-depth research. Other types of polyradiculoneuritis, like coonhound paralysis, are comparable to the axonal but not the demyelinating form of the Guillain-Barré syndrome (Braund et al. 1996).

Being alerted by own observations and previous reports on a sporadic paretic syndrome in up to 4% of young White Leghorn layer chickens (Bacon et al. 2001), we addressed the question whether this disorder might resemble mammalian IDP, and performed detailed investigations on the disease phenotype, genetic background and exposure to relevant infective agents.

We demonstrate here that the avian neuropathic disease bears striking similarities to late stage of human AIDP. Even though the primary immunologic trigger has not been identified, we identified an MHC-linked genetic factor, rendering the animals susceptible to this avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AvIDP).

## **Methods**

### **Animal selection**

The present investigation enrolled 40 female White Leghorn chickens that originated from a commercial hybrid flock comprising 5000 individuals. The chickens were sorted into AvIDP-affected and disease-free individuals, following neurological examination (Clippinger et al. 2007). All animals were euthanized using a lethal dose of intravenous sodium pentobarbitone (2 ml/kg BM) (Erhardt et al. 2004).

### **Histopathology and transmission electron microscopy**

#### *Histotechnical processing*

The cranial vaults and cranial nerve emergences were carefully dissected and the brain and cranial nerve roots were inspected in situ. Thereafter, the trigeminal and oculomotor nerve roots were harvested for further processing.

The brains were gently removed and immersed in 10% neutral-buffered formalin for 48 hours. Fixed samples were trimmed in transverse sections at the following landmarks: (1) the caudal border of the olfactory bulbs, (2) the optic chiasm, (3) the emergence of the oculomotor nerve from the midbrain, (4) the cerebellar peduncles, and (5) the obex.

The entire spinal cord was approached through laminectomy. The spinal nerve roots and associated dorsal root ganglia (DRG) were freed from overlying soft tissue and inspected in situ. Samples of the spinal cord, nerve roots and DRG of three consecutive segments of the widest part of the cervical (C13, C14, Th1) and lumbosacral (S5, S6, S7) intumescence were taken for further investigations.

Morphological examination of the above mentioned cranial and spinal nerves, the brachial plexus, sciatic nerve and abdominal branch of vagus nerve included paraffin and semithin histology, teased fibre evaluation and transmission electron microscopy (TEM).

For routine histology, brain, spinal cord, DRG and peripheral nerves underwent fixation in 10% neutral-buffered formalin, processing in an automatic tissue processor, embedding in paraffin (Paraplast®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, U.S.A.), sectioning at 5 µm (PNS) and 8 µm (CNS), mounting on triethoxysilane-coated slides (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany) and staining with haematoxylin & eosin (HE).

Further samples of spinal nerve roots and DRG as well as the oculomotor nerve (CNIII), trigeminal nerve (CNV<sub>m/o</sub>), brachial plexus, sciatic and vagus nerve were cut into 1- to 2-cm segments and immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Soerensen's phosphate buffer (pH 7.4) for 1 hour. After fixation, the samples were rinsed with Soerensen's phosphate buffer containing 0.2 M buffered D(+)-saccharose. The spinal nerves were cut into 10-mm pieces for nerve fibre teasing and blocks of 2 mm length were harvested from all nerve and DRG probes for epoxy embedding.

Teasing samples were postfixated in 2% osmium tetroxide for 1 hour and, after repeated buffer rinses, placed into 100% water-free glycerol for 24 hours. After that, a total number of 50 single-nerve fibres and/or small fibre clusters were teased apart under a stereo magnifying glass (Olympus SZH, Zeiss Stemi DV4, Germany).

Evidence of increased endoneurial round cells and Schwann cell hyperplasia was further verified by toluidine blue staining and subsequent teasing in aqueous medium.

The 2-mm pieces were postfixated in 1% osmium tetroxide for 2 hours and underwent repeated buffer rinses and a graded alcohol series before being embedded in epoxy resin (Glycidether

100, Serva®, Heidelberg, Germany). Semithin sections (0.5 µm) were mounted on microscope slides and stained with azur II methylenblue and safranin O.

Moreover, ultrathin sections (80 nm) were mounted on copper rings covered by Formvar® foils (Plano, Wetzlar, Germany) and contrasted with lead-citrate and uranyl-acetate.

### *Morphological examination*

Light microscopical examination was performed on a Zeiss Axiophot® (Zeiss Instruments, Oberkochen, Germany) by two separate investigators (SB, KM) blinded for the origin of these samples. HE-stained paraffin sections were inspected for interstitial and vascular changes as well as for abnormalities affecting myelinated fibres and fibre groups. The histological assessment was accomplished using semithin sections that allowed a deeper insight into single fibre pathology through better preservation of the myelin substance, and served as scout samples for subsequent electron microscopy. Evaluation criteria were in accordance to established protocols for peripheral nerve examination (Dyck and Chalk 1992). Relevant abnormalities were scored semiquantitatively into: 0 (absent), 1 (mild; < 25% of fibres in a fascicle cross section affected), 2 (moderate; 25-50% of fibres affected), 3 (severe; >50% of fibres affected) as previously described by Maier et al. (Maier et al. 1997). In case of inter-rater discrepancy the slides were reviewed and the final results were recorded after an agreement was achieved.

Nerve fibre teasing was performed to assess longitudinal parameters and distribution patterns, to evaluate the state of axons and myelin sheaths at different sub-segmental levels, and to evaluate nodal gaps (Krinke et al. 2000; Mizisin et al. 2007).

Ultrastructural analysis was performed and documented photographically with a Zeiss EM 10® (Germany) at 80 kV at magnifications from 2.500X to 80.000X. Thereby, the myelin spirals could be evaluated in detail, as well as the nerve fibre axoplasm and Schwann cell perikarya (Midroni and Bilbao 1995). Moreover, TEM analysis allowed the evaluation of unmyelinated fibre clusters (Ochoa 1978).

### **Immune cell phenotyping**

#### *Immunohistochemistry (IHC)*

Fresh samples of spinal nerve roots and DRG, oculomotor nerve, brachial plexus and sciatic nerves were embedded into OCT compound medium (TissueTek®; Sakura Finetek, The Netherlands) prior to snap-freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C until further processing.

Sections of 12 µm were performed using a cryostat (Shandon Southern Products Ltd., Runcorn, Cheshire, UK) and these were mounted on SuperFrost®Plus-slides (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany).

Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 20 min before incubation with 10% normal goat serum (1:20) for 30 min. Primary antibodies were directed against: chB6 (AV20) (1:100) (Rothwell et al. 1996), CD3 (CT3) (1:5) (Chen et al. 1986), CD4 (2-6) (1:2) (Luhtala et al. 1993), CD8 (3-298) (1:50) (Luhtala et al. 1995), TCR $\gamma/\delta$  (TCR1) (1:100) (Sowder et al. 1988), TCR $\alpha/V\beta$ 1 (TCR2) (1:100) (Cihak et al. 1988), TCR $\alpha/V\beta$ 2 (TCR3) (1:100) (Char et al. 1990; Chen et al. 1989), macrophage (KUL01) (1:50) (Mast et al. 1998), MHCII (2G11) (1:500), IgG (G1) (1:300) and IgM (M1) (1:500) (Erhard et al. 1992). All antibodies were purified from cell culture supernatants. The antibodies were applied to the slides overnight, at 4°C, followed by a 30-min incubation with biotinylated secondary antibody (1:200; biotinylated goat-anti-mouse IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). ABC Kit (Vectastain®, Vector Laboratories, CA, USA; 30 min) and HistoGreen (Linaris Biologische Produkte GmbH, Germany) were used as detection kits. Sections were then counterstained with nuclear fast red, dehydrated and mounted with Histofluid® (Marienfeld, Germany). The density of respective immunopositive cells was assessed semiquantitatively using a modified protocol of Pavlakis et al. (Pavlakis et al. 2006): mild (1+): < 2% of the cells positive; moderate (2+): 2-10% of the cells positive; severe (3+): > 10 % of the cells positive. Localisation of the immune cells was evaluated in regard to infiltrated compartments and distribution patterns.

Furthermore, the biotinylated lectin *Ricinus communis* agglutinin-1 (RCA 120, 1:3000; Vector Laboratories, CA, USA) was used as a specific marker for microglial cells within the spinal cord (Shin et al. 2003). Eight-micrometer-thick sections of paraffin-embedded samples of the spinal cord of three consecutive segments of the widest part of the cervical (C13, C14, Th1) and lumbosacral (S5, S6, S7) intumescence were deparaffinised and hydrated through xylene and graded alcohol series. IHC was performed as recommended by the manufacturer.

#### *Flow cytometry*

Spinal nerve roots and DRG from eight affected birds were subjected to cell typing using flow cytometry. Spinal nerve roots, including DRG, were cut into small pieces with scalpel and tweezers. Tissue samples were digested with collagenase type IV (Sigma, Poole, UK) (0,05% in Hank's balanced salt solution (HBSS) with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> and 5% FCS) in a shaking water

bath at 37°C for 30 min, followed by homogenisation with a 1-ml syringe. After sedimentation of larger fragments on ice for 10 min, the supernatant was transferred to a new tube and cells were washed twice in PBS. Finally the cells were resuspended in PBS with 1% BSA and 0.01% NaN<sub>3</sub>.

Two-colour immunofluorescence staining of the cells was performed according to standard procedures (Watson 2004).

At first, cells were stained with a monoclonal antibody (mAb) against CD45 combined with mAbs against chB6 (AV20) (Rothwell et al. 1996; Tregaskes et al. 1996), IgM (M1) (Erhard et al. 1992), CD4 (2-6) (Luhtala et al. 1993), CD8 (3-298) (Luhtala et al. 1995), TCR $\gamma/\delta$  (TCR1) (Sowder et al. 1988), TCR $\alpha/V\beta$ 1 (TCR2) (Cihak et al. 1988), TCR $\alpha/V\beta$ 2 (TCR3) (Chen et al. 1989), MHCII (2G11) (Veromaa et al. 1988) and/or macrophage (KUL01) (Mast et al. 1998), followed by staining with an isotype-specific anti-mouse-IgG2a-FITC conjugate and an anti-mouse-IgG1 or IgG2b-phycoerythrin (PE) -conjugate (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, USA), respectively. Analysis was performed with a FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and FlowJo software (Tree Star Inc, Oregon, USA)

### **Fluorescence microscopy**

To demonstrate the spatial relationships between infiltrating cells and nerve fibres, unfixed samples of the sciatic nerve underwent whole-mount immunofluorescence investigations. The fascicles were grossly separated from epi- and endoneurium and gently teased apart under a stereo magnifying glass. They were mounted with normal goat serum (1:20) for 30 min followed by an incubation with rabbit anti-laminin antibody (1:200; Abcam, Cambridge, UK) overnight, at 4°C, and with fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-conjugated goat anti-rabbit antiserum (1:400, 30 min; Sigma, Poole, UK), thereafter. Finally, diamidino-2-phenylindol (1:50; DAPI BioChemica, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) was applied on the sample for 30 min.

The nerve fibre bundles were then teased in aqueous medium and examined with a scanning microscope Zeiss LSM ® 510 equipped with a Zeiss Axiovert 100M ®, a 488 nm argon laser and a 770 nm biphotonic laser. Settings were at 490 nm (track 1/FITC) and 365 nm (track 2/DAPI) wave-length.

Additionally to IHC, cryosections of sciatic nerve and spinal nerve roots, including DRG, were tested for presence of IgM and IgG with immunofluorescence. The slides were mounted with normal goat serum (1:20) for 30 min followed by an incubation with the particular primary antibody (mouse anti-IgM1 [1:500] or mouse anti-IgG1 [1:300]) for 2 h at room

temperature. Thereafter, R-phycoerythrin (RPE)-conjugated goat anti-mouse antiserum (1:400; Alexa Fluor, Eugene, Oregon, USA) and, at last, DAPI (1:50) were applied to the sample for 30 min.

Examination took place using the scanning microscope Zeiss LSM ® 510 (see above) at wavelength settings of 495 nm (track 1/RPE) and 365 nm (track 2/DAPI).

### Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Pieces of spinal nerve roots, including DRG, were extracted, immediately snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further processing. For RNA isolation, TRIzol™ Reagent® (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used according to the manufacturer's protocol. The quantity of extracted RNA was determined by photometry, while the RNA quality was analysed using a 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Böblingen, Germany). Only RNA samples with an RNA integrity number (RIN) exceeding 7.0 were used for qRT-PCR analysis.

Genomic DNA elimination and reverse transcription were performed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The reverse transcription reaction was carried out for 30 min at 42°C and terminated by incubating the samples for 3 min at 95°C.

Primers for qRT-PCR (Table 1) were designed using PrimerExpress software® (Applied Biosystems, Warrington, UK) and were obtained from MWG-Biotech® (Ebersberg, Germany).

**Table 1 – Primers used for RT-qPCR analysis**

Gene	Forward	Reverse
18S rRNA	TGTCTAAGTACACACGGGCGGTACA	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA
CD3ε	CATCGCTGCGGATCTTCTCA	GCTGCATCTTCTGGGCTCGT
chB6	GATCGCCTGCCCTCCAAT	TGGCTTTCCACGTCAGCTATC
Blimp-1	GTGGTATTGCCGAGACTTTGC	GGGTTTGTGTGAGGTTTCATCATT
AID	CGTCTGAAACCCAGCAAGAGT	TGTCCATGTCAGCTGGGTTCT
iNOS	AAGCAAACGGCCAAGATCCA	CCCACCTCAAGGAGCATGTTG
IFN $\gamma$	TGGCGTGAAGAAGGTGAAAGA	TCTGAGACTGGCTCCTTTTCT
IL-1	CTGAGTCATGCATCGTTTATGTTTC	AAATACCTCCACCCCGACAAG
IL-6	GCTTCGACGAGGAGAAATGC	GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA
IL-10	CGGGAGCTGAGGGTGAAGT	CAGCCAAAGGTCCCCTTAAAC
IL-13	GCCACAGTGCTGGACAACAT	ATGCCGTGCAGGCTCTTC

Quantitative RT-PCR was performed using a 7300 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Warrington, UK) with SYBR-Green as a double-stranded DNA-specific

fluorescent dye. Amplification mixes contained 1  $\mu$ L cDNA, 12.5  $\mu$ L QuantiTect SYBR Green PCR Kit® (Qiagen, Hilden, Germany), 1.5  $\mu$ L forward and reverse primer (final concentration 300 nM), and 8.5  $\mu$ L water. The detector system was programmed to start with an activation step for 15 min at 95°C followed by PCR program with 40 cycles of DNA denaturation (15 sec at 94°C), primer annealing (30 sec at 59°C), and elongation (30 sec at 72°C). Each qRT-PCR was run in triplicate. Specificity of the resulting qRT-PCR products was verified by melting curve analysis.

To normalize the data, the cycle threshold (CT) values of the housekeeping gene 18S rRNA were subtracted from the target gene CT value of the sample (= dCT).

### **Genotyping**

For MHC genotyping, commercial White Leghorn layer hybrids were used, all originating from the same variety of commercial hybrids. The first set of samples was collected from clinically affected chickens at an age of six weeks. Furthermore, a sampling from healthy animals was performed. In total, samples from 152 healthy and 113 affected chickens were collected.

The microsatellite marker LEI0258 is known to be located within the MHC, between the BG and BF regions, and an association between LEI0258 alleles and serologically defined MHC haplotype has been reported (Fulton et al. 2006). The aim of the genotyping was to evaluate a possible association between MHC and the occurrence of the paralytic syndrome as previously observed in peripheral neuropathy (Bacon et al. 2001).

A drop of blood was obtained from the wing vein of each bird and absorbed onto Whatman FTA® filter cards (Whatman International Ltd., Maidstone, UK), and dried and stored in an aluminium foil envelope at room temperature until analysis. DNA isolation was carried out using the phenol-chloroform method (Sambrook and Russell 2001).

PCR was performed using HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on an Eppendorf Mastercycler using 20ng DNA. To amplify locus LEI0258 the forward primer sequence was 5'cacgcagcagaacttggaagg 3', while the reverse primer sequence was 5'agctgtgctcagctcctcagtgc 3'. An initial denaturation was performed at 95°C for 15 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 1 min. The PCR finished with a final extension at 72°C for 10 min. DNA fragments were analyzed by electrophoresis on a 4% agarose gel for 3 h at 6V/cm, and visualized with ethidium bromide staining on UV light. Resulting fragments corresponded to alleles of 261 bp, 357 bp, and 539 bp, respectively.

*Statistical analyses*

The data were analyzed by a generalized linear model using proc LOGISTIC (SAS Institute, 2008) with genotype and farm as main effect. An Exact Conditional Test was performed for including variables in the model. Only genotype remained as a significant variable in the final model, using a significance level of  $p < 0.05$ . Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated for different levels of significant main effects using the pairwise CONTRAST statement. Wald statistics were used in determining the statistical significance of estimated odds ratios. The raw frequencies of genotypes were counted using Proc FREQ (SAS, SAS Institute, Heidelberg, Germany).

**PCR analysis for MDV strain discrimination**

Samples of spleen, sciatic nerve, and spinal nerve roots, including DRG, were collected from 10 AvIDP-affected and non-affected White Leghorn chickens, all of which were vaccinated against Marek's disease with avirulent MDV-CVI988/Rispens (AviPro MD RISPENS RL, Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Germany). Similarly, organ samples were collected from 10 six-week-old specific-pathogen-free (SPF) control chickens (Lohmann VALO SPF). Genomic DNA from 10 (spleen tissue) to 20 mg (nerve tissue) of each organ sample was isolated using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. DNA concentrations were measured using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) and adjusted to a final concentration of 100 ng/ $\mu$ l. One hundred ng of DNA of each sample were then analysed by conventional PCR (40 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, and 45 sec at 72°C) using the Thermoprime Plus Mastermix (ABgene, Surrey, UK) and the oligonucleotide primers given in Table 2. Primers UL49amp\_fw and UL49amp\_rv were designed to amplify a region of 618 base pairs (bp) in the UL49-ORF of MDV. Primers UL49disc\_fw and UL49disc\_rv span a fragment of 320 bp located within the 618 bp region and were conceived to discriminate CVI988/Rispens strains from virulent MDV field strains through a DNA polymorphism found in the UL49-ORF of CVI988/Rispens (Spatz and Silva 2007). Controls for the PCR analysis included MDV-DNA isolated from the very virulent MDV strain RB-1B- and from virulent MDV strain BC-1-transformed lymphoblastoid cell lines 54-O [Trapp et al., unpublished data] and MSB-1 (Akiyama and Kato 1974), as well as CVI988/Rispens-DNA isolated from two different commercially available vaccine preparations (AviPro MD RISPENS RL, Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Germany, and Nobilis Rismavac, Intervet International GmbH, Unterschleissheim Germany).

**Table 2 – Oligonucleotide primers used for Marek's disease virus PCR analysis**

UL49amp_fw	5'-ATGGCGACGCGAAGTTG-3'
UL49amp_rv	5'-CCATCAACACGTA <del>CT</del> CAGCGA-3'
UL49disc_fw	5'-CTTGTACGTT <del>CAG</del> ATTTGGTTG-3'
UL49disc_rv	5'-TCATCAGCATCTAGCACTTGG-3'

Letters in bold indicate three nucleotides at the 3'-end of UL49disc\_fw that mismatch with the UL49-sequence of MDV-CVI988/Rispens (...ACT-3').

## Results

### Clinical presentation

The 20 affected animals revealed histories of impaired limb movements with an onset prior to achievement of sexual maturity at an age between 5 and 13 weeks. All affected animals uniformly showed a progressive asymmetric paresis of one or multiple extremities on neurological examination. Wing and leg involvement was characterized by weakness progressing to flaccid paresis. In the due course of the disease the proximal limbs show intermittent relative extensor hypertonicity. In addition, limb weakness was accompanied by fasciculations of limb and neck musculature. Postural reactions in the affected legs were absent or markedly decreased.

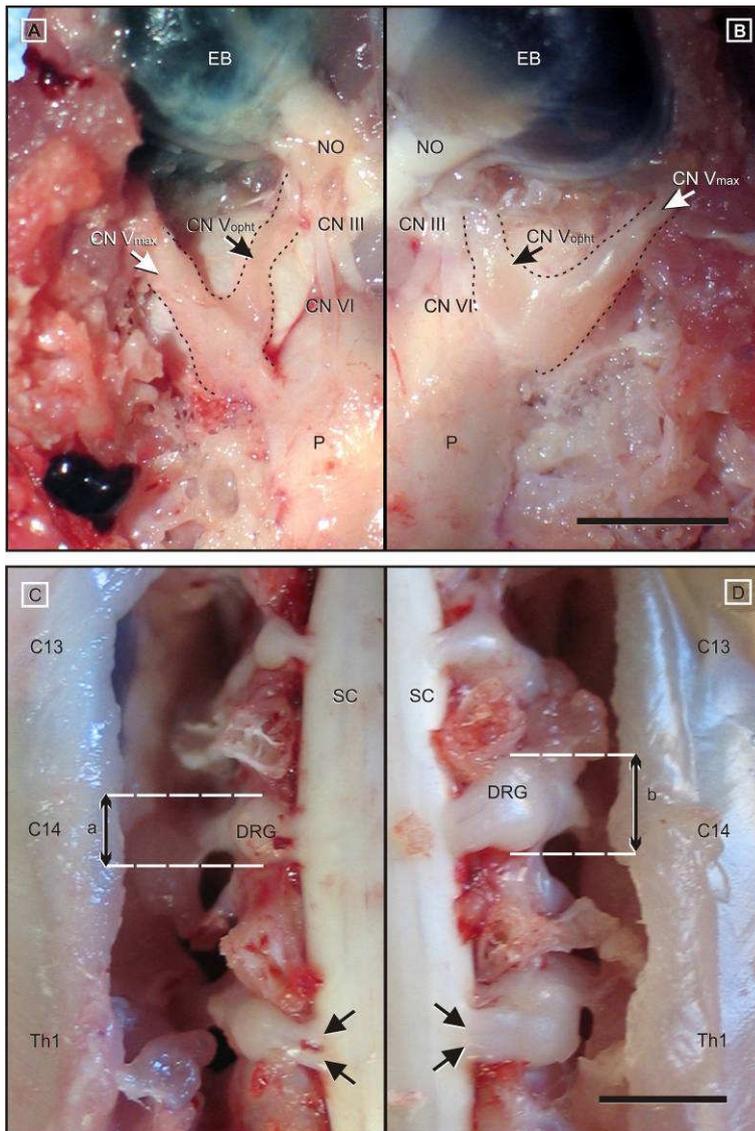
The 20 age-matched control chickens behaved normally during open-field observation and did not exhibit any dysfunctions on clinical and neurological examination.

### Morphological findings

On necropsy, all clinically ill chickens revealed a severe, bilaterally symmetrical oedematous thickening of the cranial and spinal nerve roots. Amongst cranial nerves, the maxillary and ophthalmic branches of CN V were most severely affected (Figure 1A and 1B). To a slightly lesser degree, the oculomotor (CN III) and facial nerve (CN VII) were involved.

In affected chickens, the spinal nerve roots emerging from the cervical and lumbosacral intumescences showed identical changes. Their diameters measured up to four times the normal calibre (Figure 1C and 1D). Thereby, the diameters tapered off centrifugally so that the nerves presented normal diameters immediately distal to the intervertebral foramen.

Microscopically, all examined parts of the peripheral nervous system of ill animals showed concurrent inflammation and demyelination. Thereby, the former was characterised by multifocal lymphohistiocytic infiltrates, with some perivascular cuffing – particularly frequent and most severe in the ganglia – and scattered plasma cells throughout the endoneurium of the nerves and ganglia. Inflammation seemed to start directly at the CNS-PNS transition, without



**Figure 1 – Gross findings in AvIDP-affected chickens.**

Compared to controls (A, C) a marked thickening of craniospinal nerve roots was recognized in all affected birds (B, D).

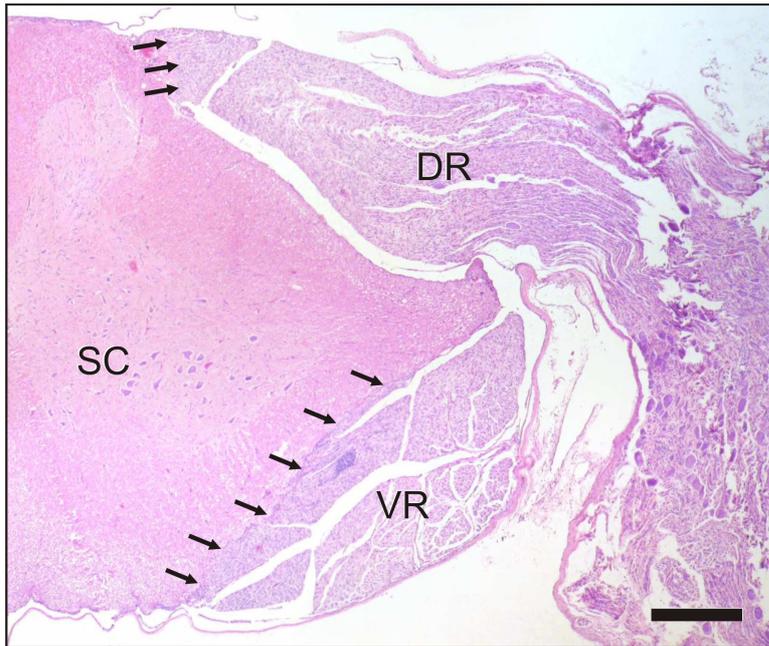
A, B: Inspection of the ventral brain surface reveals severely enlarged maxillary (CN V<sub>max</sub>) and ophthalmic (CN V<sub>opht</sub>) nerve branches. The oculomotor (CN III) and abducens (CN VI) nerve are also thickened to a lesser extend, and show a mild greyish discoloration.

C, D: The dorsal view at the cervical intumescence between C13 and Th1 indicates severe enlargement of the dorsal rootlets (arrows) and the associated dorsal root ganglia (DRG). Affected ganglia (b) measure up to fourfold of the diameters of unaffected control nerves (a).

A, B: EB = eye ball; NO = optic nerve; P = Pons; scale bar = 1.0 cm. C, D: SC: spinal cord; scale bar 0.5 cm.

involving the central neuroparenchyma (Figure 2, 3, 4 and 5), culminated in the roots, and tapered off from proximal to distal (Figure 2, 3 and 4). Hence, the prevertebral and cranial nerve ganglia were amongst the hot spots. Both dorsal and ventral roots revealed similar inflammation scores. Clinically healthy chickens sometimes revealed follicular lymphocytic infiltrates within the dorsal ganglia consistent with findings of other groups (Bacon et al. 2001; Doi et al. 1973; Sharma 1973).

In affected chickens, at most 50% of the cross sectional area of CNs III and V, the brachial plexus, and the sciatic nerve were pathologically altered, especially in the most proximal parts. Only the vagus nerve was lacking length-dependent features and presented with a diffuse inflammation of the entire endoneurium in all samples. Notably, the infiltration foci colocalised with large clusters of nude and hypomyelinated axons. Teased preparations of affected nerves revealed a multisegmental and, infrequently, also paranodal cell-mediated



**Figure 2 - CNS-PNS transition as the border of inflammation.**

The arrows point to the CNS – PNS boundary of the spinal roots. Despite the severe involvement of both dorsal (DR) and ventral (VR) nerve roots, the inflammatory infiltration spares the adjacent central white matter and does not pass the PNS-CNS transition. Scale bar = 0.5 mm.

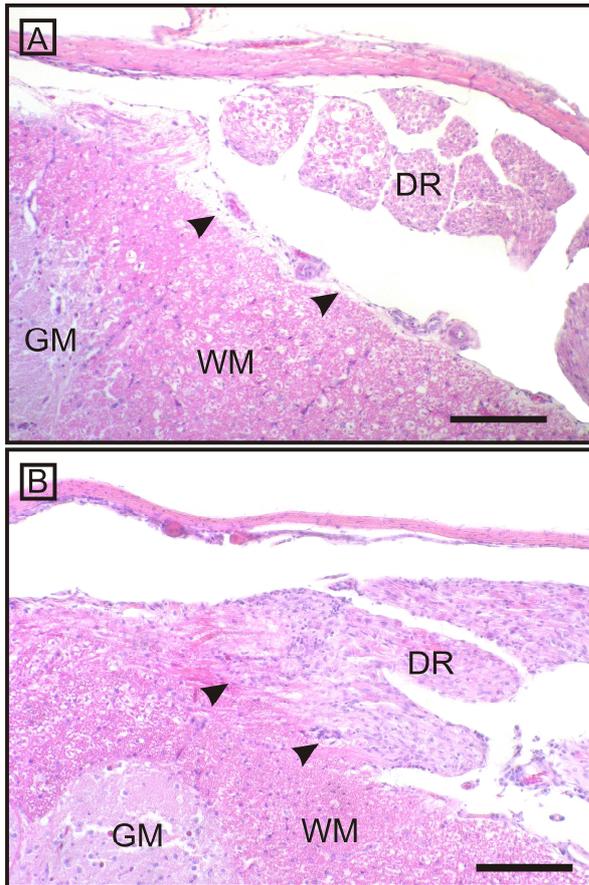
demyelination involving numerous mononuclear cells with macrophage characteristics that penetrated the Schwann cell basal lamina at the Schmidt-Lanterman incisures. Consistent with ongoing remyelination, inappropriately thin myelinated fibres were recognised in many areas. These remyelinating segments and many demyelinated axons were encircled by supernumerary Schwann cell processes.

Myelin sheath alterations were accompanied by a significant expansion of the collagenous inner endoneurial sheath (Figure 6). This increase of extracellular matrix compensated for the decreased nerve fibre diameters following myelin loss.

Transmission electron microscopy of the affected peripheral nerves basically confirmed the light microscopic features. Macrophages multifocally were invading the myelin spiral at the outer mesaxon (Figure 7). Schwann cell nuclei and perikarya showed no signs of degeneration (Figure 8). Apart from a very mild decrease of diameter and slightly more densely packed neurofilaments, the axons retained their normal ultrastructural architecture throughout all affected areas. Similar findings were not recognised in age-matched control animals.

### **Immunostaining**

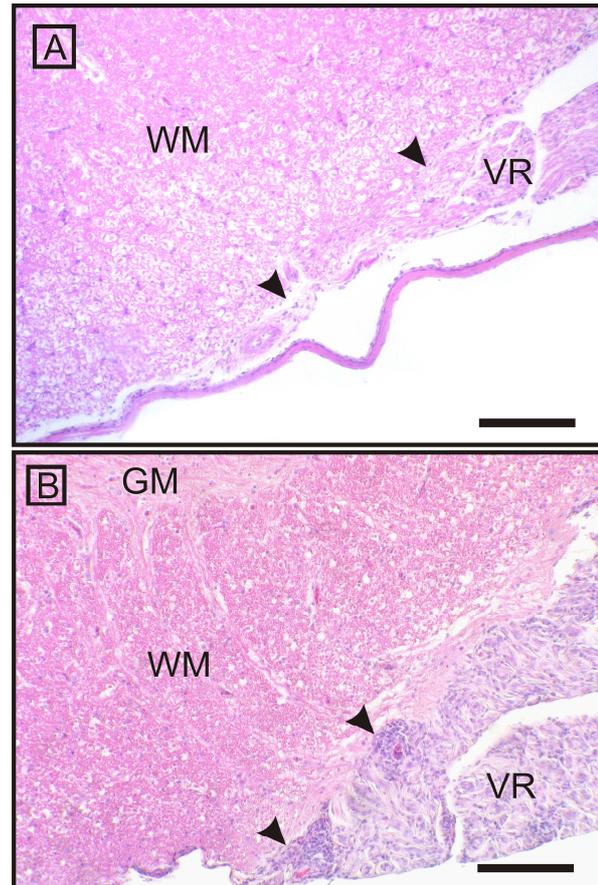
IHC revealed a similar inflammatory cell composition in the samples of spinal nerve roots and associated DRG, CN III, brachial plexus and sciatic nerves. IgM-positive plasma cells were diffusely scattered amongst the endoneurial compartment. Furthermore, the affected nerves showed a moderate multifocal infiltration of chB6-positive B-cells and a severe multifocal infiltration by the latter appeared about twice as severe as the degree of B-cell involvement.



**Figure 3 – CNS-PNS transition at the dorsal nerve root as the border of inflammation.**

On closer inspection, the dorsal root (DR) of an affected animal (B) shows a mononuclear infiltration in comparison to a control chicken (A). The arrows point to the CNS – PNS boundary. Note that the adjacent white (WM) and grey matters (GM) are not affected.

Scale bar = 1 mm.



**Figure 4 – CNS-PNS transition at the ventral nerve root as the border of inflammation.**

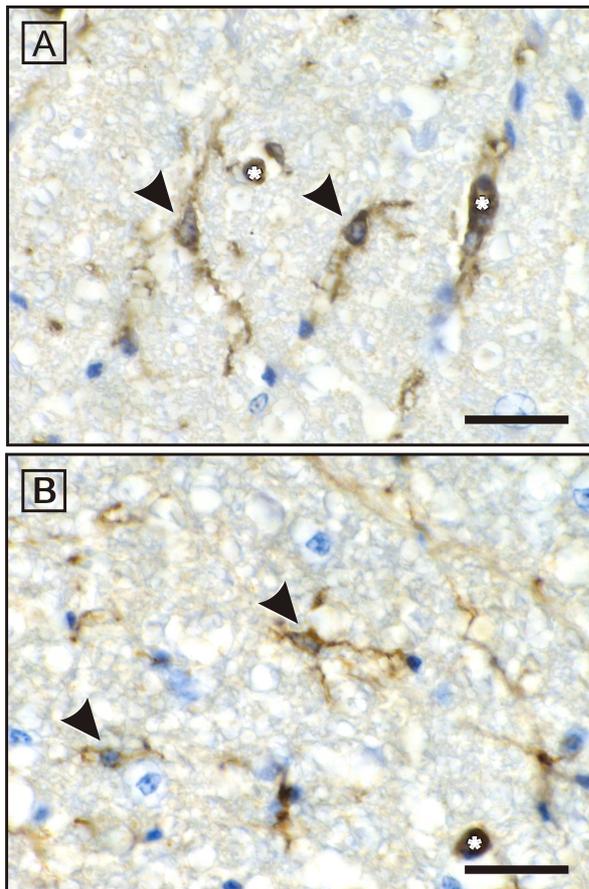
The ventral nerve root (VR) of an affected animal (B) presents with a severe mononuclear infiltration and thickening in comparison to a control chicken (A). The arrows point to the CNS – PNS boundary. Again, the inflammatory infiltration spares the adjacent central white (WM) and grey matters (GM) and does not pass the PNS-CNS transition.

Scale bar = 1 mm.

Overall, the extent of infiltration by the latter appeared about twice as severe as the degree of B-cell involvement. Large perivascular clusters showed an intermingled cell composition of mainly CD3- and chB6-positive cells interspersed with a few KUL01-positive macrophages (Figure 9). All control chickens displayed a few isolated B-cells and T-cells per fascicular cross section surrounding venules, compatible with score of 1+ (data not shown).

Empirically, the T-cell population in affected animals consisted of equal fractions of T-helper cells (CD4<sup>+</sup>) and cytotoxic T-cells (CD8<sup>+</sup>). Most of the T-cells carried  $\alpha\beta$  T-cell receptor, while a small minority stained positively for TCR1 ( $\gamma\delta$  T-cells). These T-cell phenotypes intermingled intensely and there was no spatial organisation.

In ill birds, KUL01-positive histiocytes and macrophages were seen frequently in the perineurium and subperineurial spaces, and they intermingled with lymphocytes in large perivascular infiltrates. Compared to control tissue, where we could find single positive cells



**Figure 5 – Immunohistochemical illustration of *Ricinus communis* agglutinin-1 (RCA-1) - positive microglial cells in the white matter of spinal cord.**

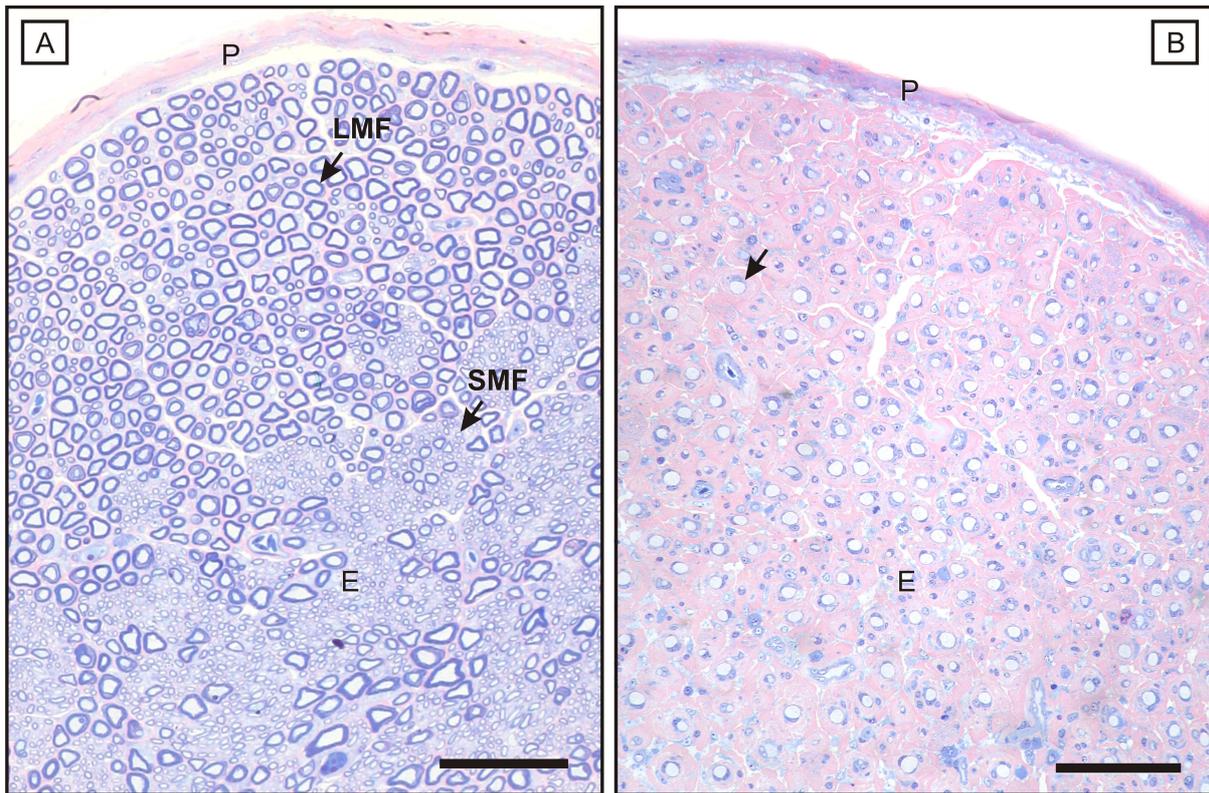
The RCA-1-positive microglial cells (arrowheads) in both healthy (A) and AvIDP-affected (B) chicken show inconspicuous ramified microglial cells. Activated microglial cells or an increased number were not observed. A, B: asterisk = endothelium (also stains RCA-1 positive); scale bar = 25  $\mu\text{m}$ .

with the same distribution pattern, the overall density was mildly to moderately increased. The distribution of MHCII-expressing, antigen-presenting cells extended over both macrophage populations and those areas occupied by lymphocytes, showing a severe rise compared to control animals.

Apart from cell-associated immunoglobulin staining, patchy IgG-positive signals were confined to the myelin sheaths of large myelinated fibres in spinal nerve roots, including DRG, and peripheral nerve segments (Figure 10).

Flow cytometry identified large numbers of the isolated cells from spinal nerve roots, including DRG, that were CD45-positive leukocytes (Fig. 11 A middle panel). The composition of this leukocyte population basically matched the IHC results. The lymphocyte population consisted of 42% B-cells (AV20<sup>+</sup>) and approximately 43% T-cells. The T-cell population split into cytotoxic T-cells and T-helper cells at a ratio of 1:0.94 or, relating to the T-cell receptor, at a ratio of 1:0.18 for  $\alpha\beta$  T-cells (TCR2 and TCR3) to  $\gamma\delta$  T-cells (TCR1; Fig. 11 B).

About 4% of the isolated leukocytes were monocytes and macrophages (KUL01<sup>+</sup>) and a majority – more than 57% – of the cells carried MHC class II antigens.



**Figure 6 – AvIDP: typical histological PNS findings.**

The histological appearance of a healthy mixed fascicular nerve is displayed in figure A. Its endoneurium (E) contains large (LMF) and small (SMF) myelinated fibres that are confined by a peripheral rim of blue (azurophilic) compacted myelin.

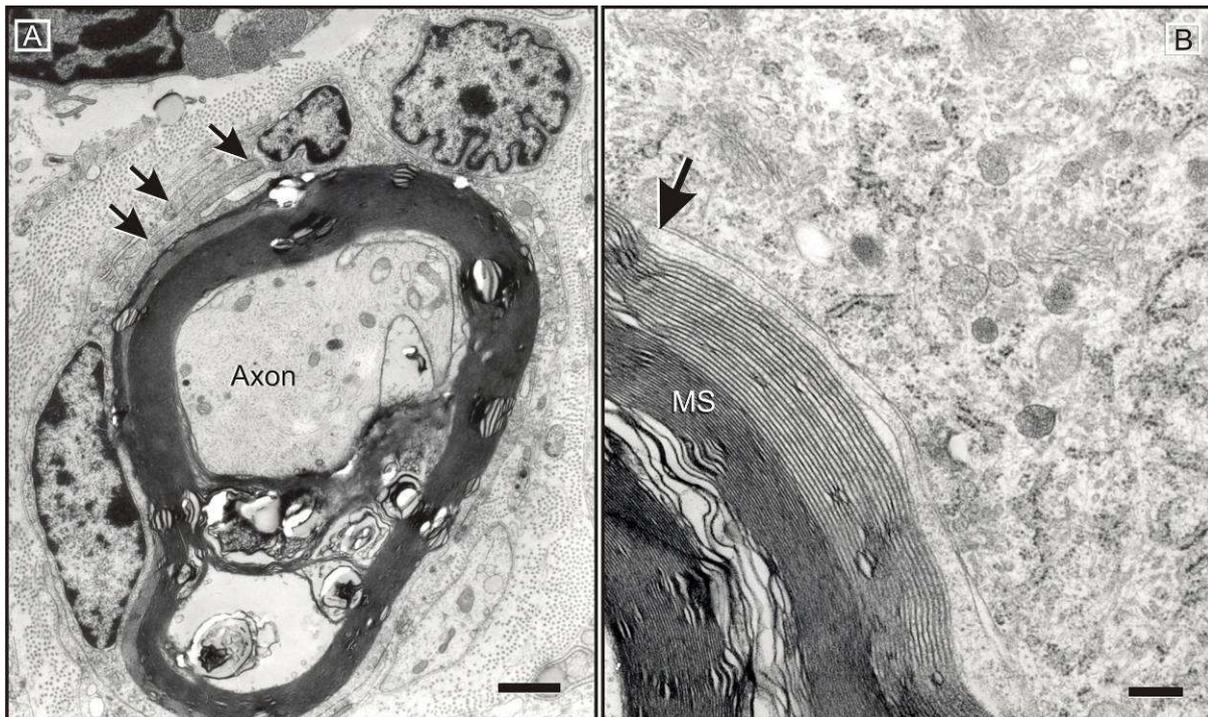
B: AvIDP leads to a breakdown of the myelin sheath while leaving the axons mainly untouched. Concomitantly with the myelin loss (arrow), an expansion of the eosinophilic extracellular matrix of the endoneurial sheath develops which results in a decrease of nerve fibre density. A, B: P = perineurium; scale bar = 100  $\mu$ m.

### Fluorescence microscopy

In addition to Schwann cells, further DAPI-stained nuclei were detected under the laminin-stained basal lamina of the inner endoneurial sheath. In agreement with the results of the transmission electron microscopy, they were considered to be invading macrophages. As in the IHC samples, IF revealed positive signals for IgG on the surface of myelin sheaths of multiple large myelinated fibres in spinal nerve roots, including DRG, and distal nerve segments.

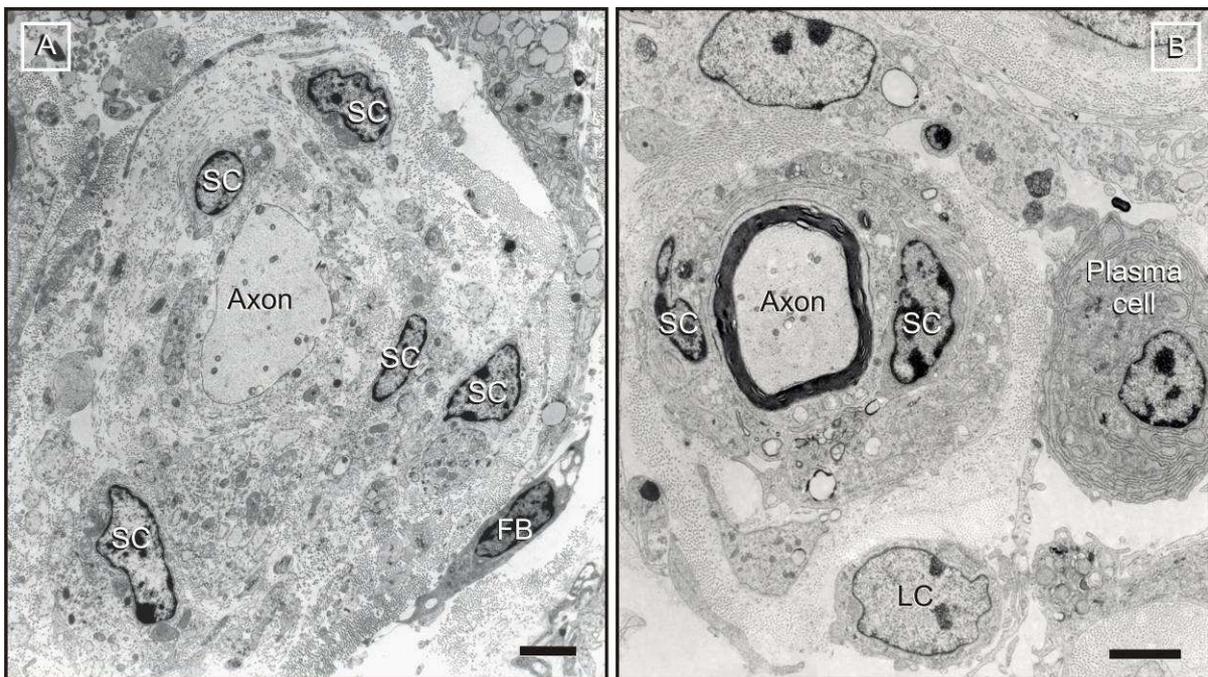
### Quantitative RT-PCR

Expression levels of characteristic T- and B-cell genes were significantly increased in spinal ganglia of affected birds in comparison with controls (Figure 12). Averaged differences of 2 and 3.5 CT values (equivalent to a 9-fold and 13-fold increase) were observed for CD3 $\epsilon$  and chB6 (a chicken B-cell antigen), respectively, thus confirming the histological and flow cytometric results. In addition to chB6 expression as a marker for immature, mature, and



**Figure 7– Macrophage-mediated myelin stripping.**

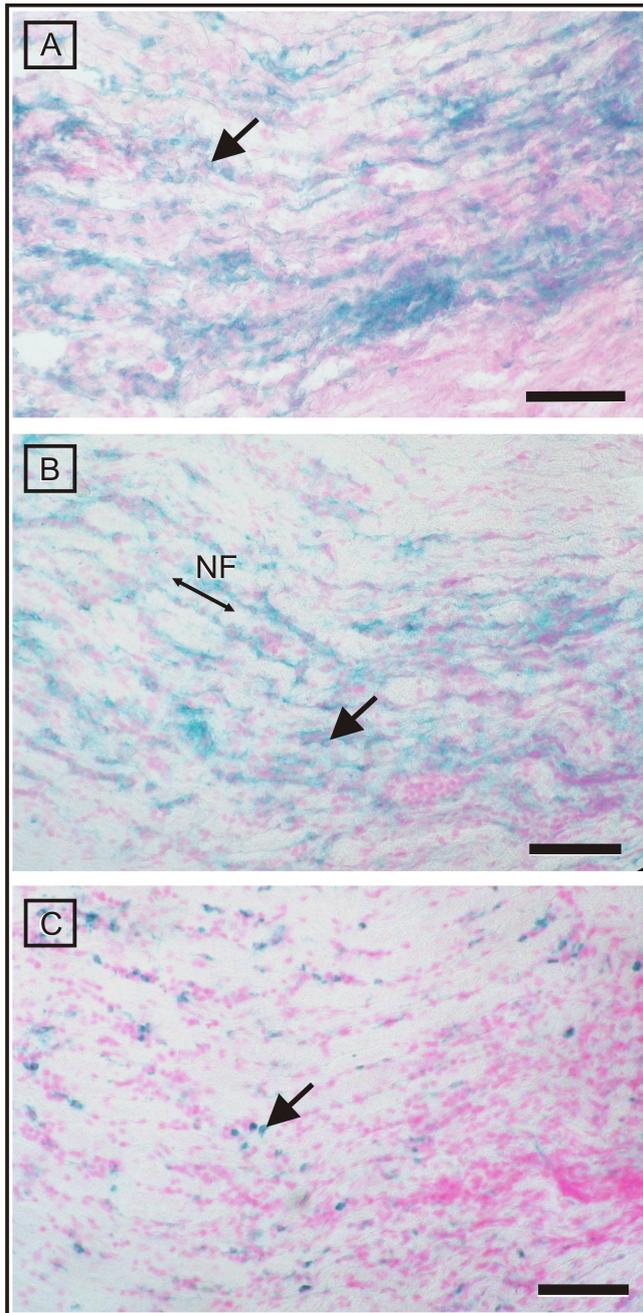
A: Upon invasion of the Schwann cell tubes, macrophage processes (arrows) split the outer mesaxon in order to gain entry to the myelin spiral. B: They invade the myelin following the intraperiod line (arrow). Widening propagates centripetally towards the inner mesaxon. B: MS = myelin sheath; Scale bar = 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 8 - Ongoing demyelination/remyelination.**

A: Demyelination is accompanied by proliferation of Schwann cells (SC), formation of supernumerary processes, and a significant expansion of the collagenous inner endoneurial sheath. Schwann cells show no sign of degeneration. B: Inappropriately thin myelin sheaths and redundant Schwann cells are consistent with ongoing remyelination. Apart from macrophages, the endoneurium of affected nerves shows significant infiltration by plasma cells and lymphocytes (LC). A: FB = fibroblast; Scale bars = 1  $\mu\text{m}$  (A), 250 nm (B).

differentiating B-cells in germinal centres (GC), the elevated expression of Blimp-1 and AID with 3 and 1 CTs difference between control and diseased birds indicated that there was also a



**Figure 9 – Immunohistochemical evidence of infiltration by T-cells (CD3<sup>+</sup>), B-cells (chB6<sup>+</sup>) and macrophages (Kul01<sup>+</sup>).**

Immunophenotyping identified the majority of infiltrating lymphocytes as being CD3-positive T-cells (A). They show a characteristic multifocal distribution pattern.

With similar spatial characteristics, chB6-positive B-cells comprise the second largest fraction of infiltrating cells (B). Compared to the lymphocytes, the density of Kul01-positive macrophages appears much lower (C). The arrows point to immunopositive cells. All sections were prepared from the same region of the sciatic nerve. The orientation of the nerve fibres (NF) is indicated.

Scale bar = 35 µm.

significant plasma cell activation and induction of hypermutation and class switching events in the analysed spinal ganglia and associated nerve roots.

No differences were observed in the expression levels of the inflammatory cytokines IL-1 and IL-6. Likewise, inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression as a marker for activated macrophages showed no significant difference between the two groups. The elevated error bar in the control group originates from a single bird with very low iNOS mRNA levels. Without this animal statistical analysis shows identical expression levels for iNOS in affected and control organs.

Further analysis of cytokine gene expression revealed a significant induction of IFN- $\gamma$  mRNA in diseased organs (3 CT values corresponding to a 7-fold increases) while the Th2 cytokine

IL13 was unchanged. The regulatory cytokine IL-10 was significantly upregulated in ganglia of affected birds (3 CT values, corresponding to 7-fold increase).

**Table 3 - Allele frequency in healthy and clinically AvIDP-diseased animals**

	Genotype			
	[261/261]	[261/539]	[357/539]	[261/357]
Healthy	15 (83.3)	53 (35.3)	7 (58.3)	77 (90.6)
Diseased	3 (16.7)	97 (64.7)	5 (41.7)	8 (9.4)
Total	18	150	12	85

### Genotyping

The three alleles at locus LEI0258 found in the chicken flock under study corresponded to allele sizes of 261 bp, 357 bp, and 539 bp, respectively (Figure 13). According to this the following genotypes were observed: Genotype [261/261]; Genotype [261/539]; Genotype [357/539]; Genotype [261/357]. The frequency of these different genotypes in association with healthy and clinically diseased animals is presented in Table 3. Genotypes [261/539] and [261/357] occurred in significantly higher numbers of observation (150, 85) than genotypes [261/261] and [357/539] (18, 12). There was a marked difference between the genotypes in the occurrence of AvIDP symptoms. While the percentage of sick animals was 16.7% and 9.4% in genotypes [261/261] and [261/357], this proportion was significantly higher in genotypes [261/539] and [357/539], with frequencies of 64.7% and 41.7%, respectively.

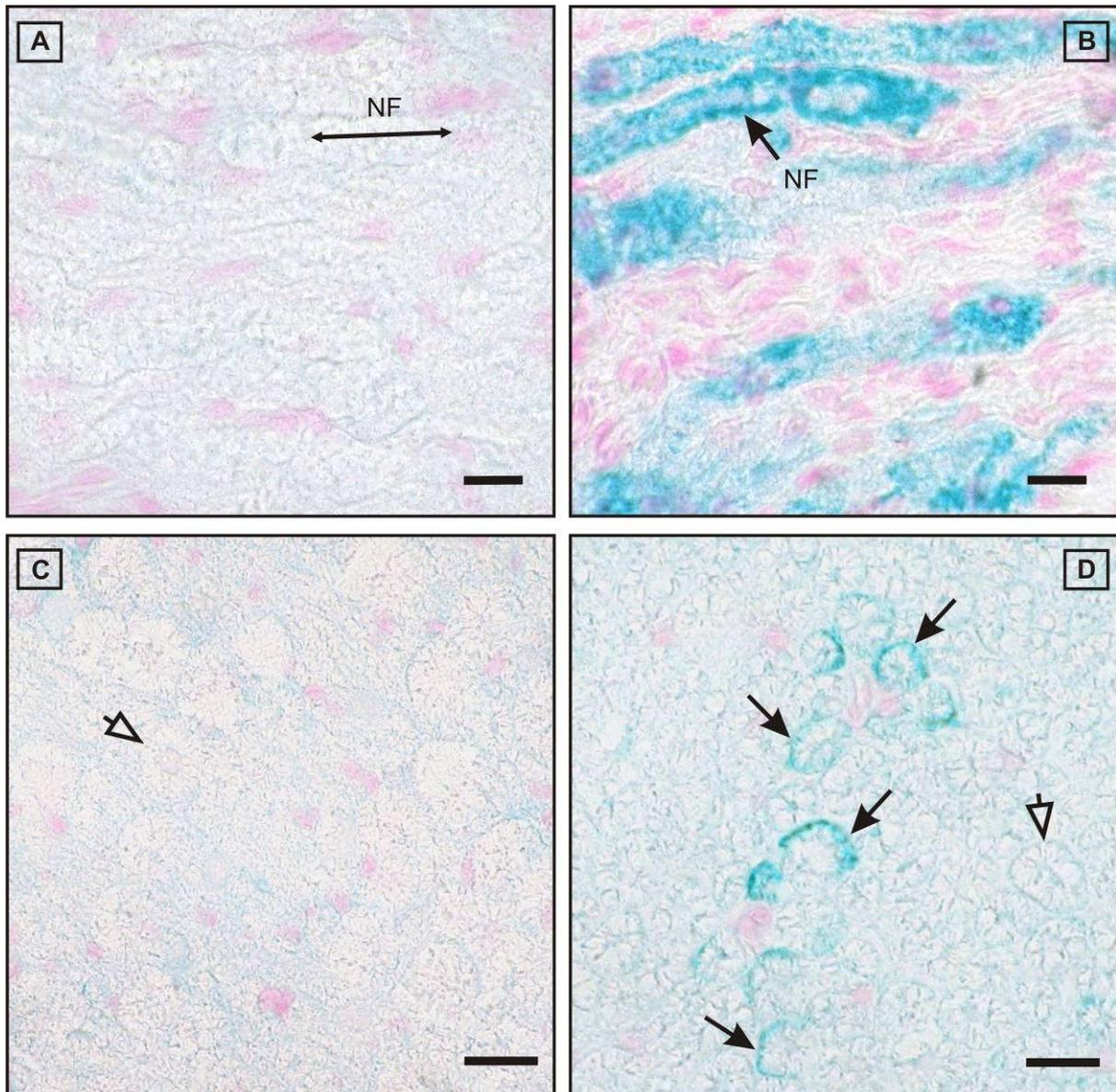
Results of a likelihood ratio test revealed a highly significant effect ( $p < 0.001$ ) of explanatory variables. The factor 'Genotype' is the only one that can be significantly substantiated ( $p < 0.0001$ ).

Animals of the [261/539] genotype had a 9.15-fold higher risk of AvIDP compared to genotype [261/261] (CI 2.50-33.04). Compared to genotype [261/357], the risk of showing AvIDP symptoms was even higher for genotype [261/539] (17.6-fold, CI 7.9-39.7). Furthermore, the likelihood of genotype [357/539] to be affected by AvIDP was higher than those of genotype [261/357] by a factor of 6.8. There were neither significant difference between animals of the genotype [357/539] and [261/539], nor between animals of the genotypes [261/357] and [261/261] (Table 4).

**Table 4 – Odds Ratios in pair-wise comparisons for association between genotype and diseases incidence**

Genotype	Odds Ratio and 95 % CI*	$\chi^2$	p
[261/261] vs. [261/539]	9.15 (2.50-33.04)	11.4	0.0007
[261/261] vs. [357/539]	3.57 (0.65-19.34)	2.18	0.1397
[357/539] vs. [261/539]	2.56 (0.77-8.46)	2.37	0.1229
[261/357] vs. [261/261]	1.92 (0.45-8.10)	0.79	0.3719
[261/357] vs. [261/539]	17.61 (7.90-39.25)	49.2	<0.0001
[261/357] vs. [357/539]	6.87 (1.76-26.76)	7.72	0.0054

\*CI - Wald confidence interval



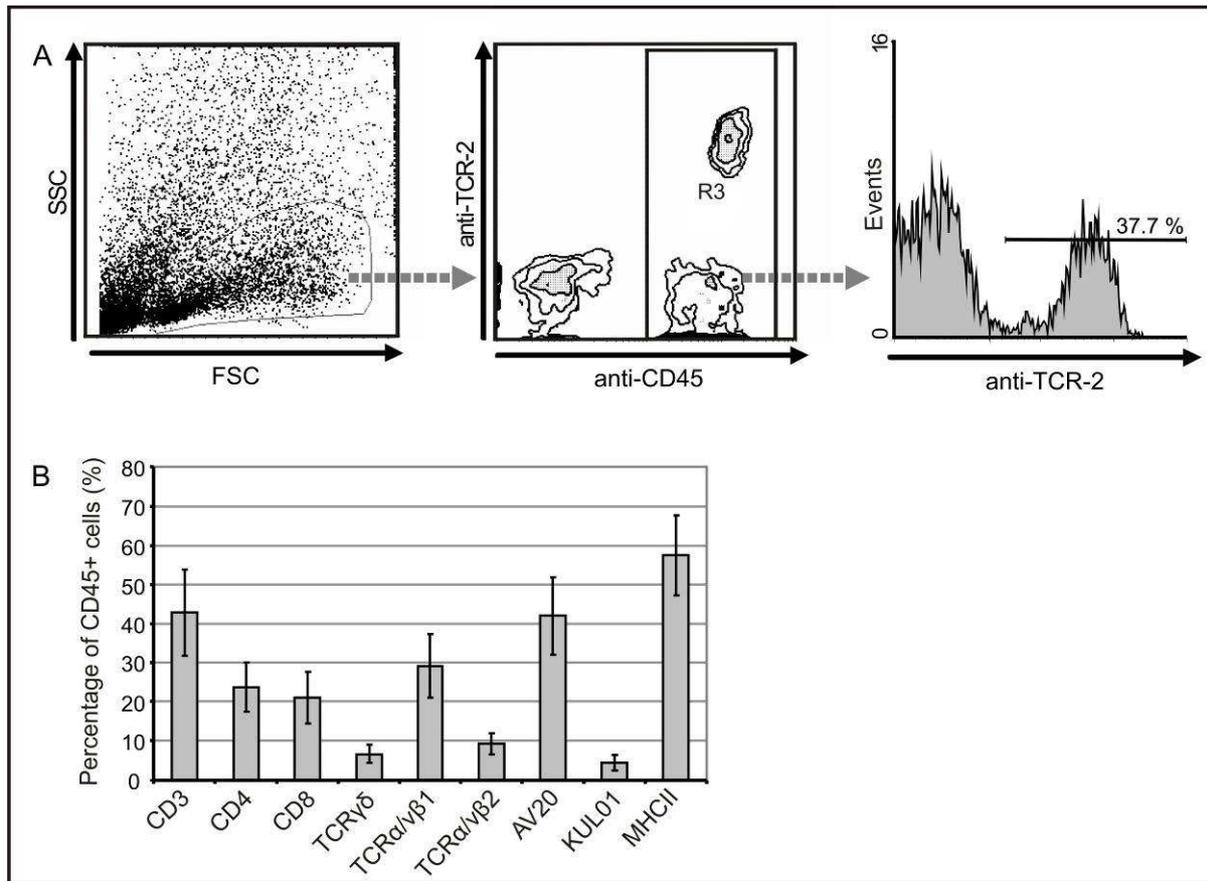
**Figure 10 – Deposition of IgG within the myelin sheath of affected fibres.**

Longitudinal (A) and cross (C) sections of unaffected samples show immunonegative nerve fibres (NF) throughout (empty arrow), whereas inflamed specimens reveal a significant intramyelinic IgG-deposition (B, D; black arrows) in many fibres within (B) or even outside (D) of significantly infiltrated foci. The longitudinal orientation of the nerve fibers is indicated by the double-headed arrow (A).

Scale bars = 10  $\mu$ m (A, B), 15  $\mu$ m (C, D)

### PCR analysis for MDV strain discrimination

PCR analysis of the various organ samples revealed all spleens and some nerve tissues of the vaccinated chickens to be positive for MDV-DNA. However, none of the organ samples scored positive for MDV field strain-DNA in the discriminating PCR. As a proof of principle, all viral DNAs used as controls scored positive for MDV-UL49, but only those from the non-vaccine virus strains RB-1B and BC-1 allowed specific binding of the discrimination primer (UL49disc\_fw) and amplification of detectable PCR-products.



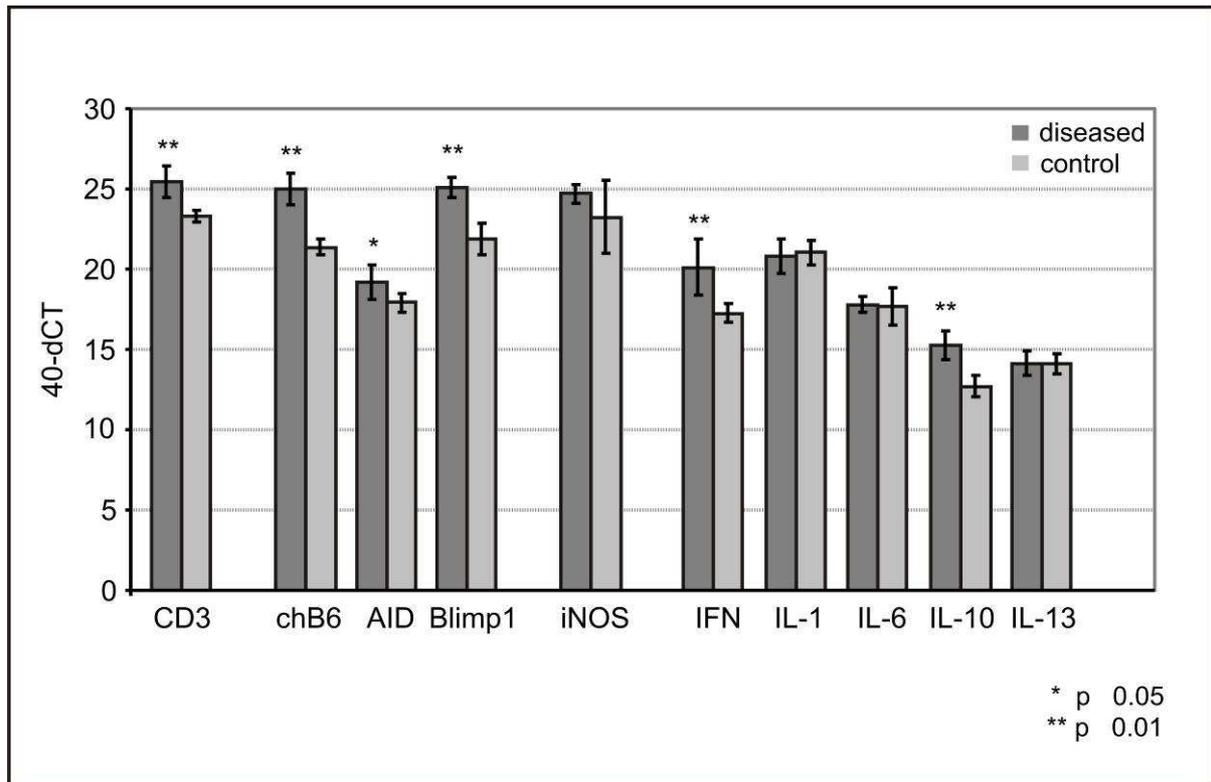
**Figure 11 – Leukocytes in spinal ganglia from diseased birds consist of different subpopulations.**

For flow cytometric analysis, single cell suspensions from spinal ganglia of diseased birds were stained with a Pan-Leukocyte marker (CD45) and antibodies for T cells (CD3), cytotoxic T cells (CD8), T helper cells (CD4), T cell receptor types TCR1, TCR2 and TCR3 (TCR $\gamma\delta$ , TCR $\alpha/\beta$ 1, TCR $\alpha/\beta$ 2), B cells (AV20), macrophages (Kul01) and MHC class II (2G11). (A) Gating was first performed on cells with leukocyte scatter characteristics, secondly on CD45+ cells before the proportion of different lymphocyte subpopulations of all CD45+ leukocytes was determined. (B) Data expressed as mean  $\pm$  SD for different subpopulations for five birds analysed.

## Discussion

During the last decade, an acute paretic syndrome of unclear origin was increasingly reported from flocks of White Leghorn chickens worldwide (Bacon et al. 2001). In an effort to elucidate the underlying cause and pathobiology of this syndrome we performed an extensive pathohistological and immunological investigation.

All birds of our collective that presented with limb paresis showed severe demyelination of peripheral nerves, with a predilection for craniospinal nerve roots and associated ganglia. This demyelination was associated with multifocal endoneurial infiltration by lymphocytes, plasma cells and macrophages. TEM provided evidence of macrophages invading myelin spirals at the outer mesaxon, between the paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures, leading to stripping off of myelin lamellae from morphologically intact axons. This picture closely

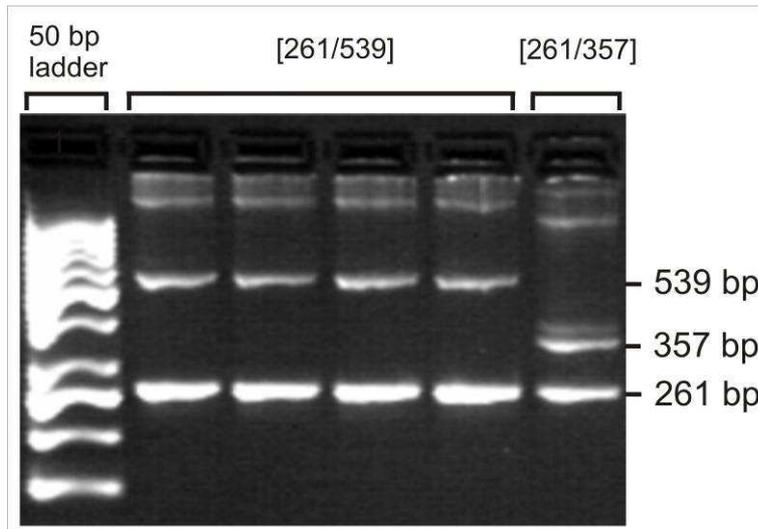


**Figure 12 – Relative gene expression in spinal ganglia of chickens.**

The mRNA abundance of candidate genes using quantitative RT-PCR was analysed in ganglia of affected and non-affected chickens of the same age, originated from the same flock. Gene expression, measured using SYBR Green primer assays and Ct values, were normalised against 18S rRNA (= dCT). Data shown as mean  $\pm$  SD for 40-dCT values for eight animals per group (\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$ ).

resembles human AIDP, which leads us to denote this disease as avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuritis (AvIDP) (Hafer-Macko et al. 1996b; Schwerer 2002).

Several pathways have been proposed by which the attention of macrophages is directed towards the myelin sheath. Firstly, autoreactive T-helper cells may secrete chemokines attracting macrophages to the endoneurium and, subsequently, activate them via macrophage-activating factors. Activated macrophages also are capable of recognising the Fc-region of auto-antibodies that opsonise myelin epitopes and/or activate the complement system (Willison and Yuki 2002). In AvIDP there is a considerable body of evidence for employment of both pathways. Immunohistological, flow cytometrical and gene expression studies confirm the presence of significant numbers of  $\alpha\beta$  T-cells of both T-helper and cytotoxic T-cell (CTL) phenotypes. Gene expression profiling further indicated a dominance of a Th1-like immune response as demonstrated by a significant upregulation of IFN $\gamma$  mRNA and no changes in IL-13 mRNA levels in affected nerves in comparison to healthy controls (Bradley et al. 1996; McKenzie et al. 1998). Th1-like immune responses have been described as taking



**Figure 13 – Fragment length polymorphism of LEI0258.**

Blood group genotyping revealed an association between AvIDP and MHC haplotype with a fragment size of 539 bp. The individual with genotype [261/357] was healthy.

part in acute EAN and in the initial stages of AIDP; findings which further underline the similarity between AIDP and AvIDP (Jander and Stoll 2001; Zhu et al. 1994).

On the other hand, one may ask if the high density of endoneurial plasma cells and deposition of myelin-bound IgG lend credence to a simultaneous recruitment of humoral effector mechanisms (Koski et al. 1989). IL-10 expression suggests a Th-cell-dependency rather than a primary humoral response (Fiorentino et al. 1989). Morphological examination suggests, and quantitative PCR confirms, that humoral pathways seem to predominate at the stage of AvIDP disease investigated in this study. B-cell and plasma cell activation is reflected by high mRNA expression levels of chB6 (Bu-1) and B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) in the affected spinal ganglia (Shaffer et al. 2002; Tregaskes et al. 1996). Interestingly, IL-13 was – despite the indications for a predominantly humoral pathway – not significantly elevated (Cocks et al. 1993; Defrance et al. 1994), which may be explained by the stage of disease (see below).

The increase in mRNA expression of IL-10 is suggestive of down-regulation of the immune response (de Waal Malefyt et al. 1991; Fiorentino et al. 1989; Fiorentino et al. 1991) and it is in line with the observation of a remission of the clinical deficits soon after the paralytic phase in an additional group of animals subjected to long-term trials (unpublished data; see below).

Furthermore, there was no elevation of IL-1 and IL-6, which contrasts with common observations of an acute inflammatory reaction (Heinrich et al. 1990; Prowse and Baumann 1989). Even though there is an increase in IFN $\gamma$ -level, it seems not to have led to the transformation of macrophages into inflammatory macrophages that would have produced higher levels of iNOS in addition to IL-1 and IL-6 (Nathan et al. 1983; Teng et al. 2002).

In accord with recent data on AIDP and on rodent GBS models (Ekerfelt et al. 2001), it may be concluded that the paraparetic birds in this study were just about to leave a Th1-driven initial stage for a Th2-dominated plateau or even recovery phase. It is very likely that the occurrence of neurological deficits coincides with late a Th1-stage or a Th1-to-Th2-transition, which implies the existence of a considerable preclinical period in disease progression. Because of the spontaneous appearance of disease, and the low incidence (1 per 100 animals) at earlier stages of AvIDP would be very difficult to assess through random sampling in preparetic chickens.

Concerning the natural history of the disease, however, we have launched preliminary longitudinal trials in order to clarify whether AvIDP resembles an acute monophasic disease or a chronic progressive, stagnant or even remitting-relapsing disease with sudden onset. Our preliminary observations indicate that remission and relapse of clinical signs is possible.

In GBS and CIDP, several auto-antibodies have been demonstrated to react with myelin proteins and peripheral nerve gangliosides. Auto-antibodies against myelin proteins P0, P2 and PMP-22 (Inglis et al. 2007) are associated with AIDP and CIDP in humans. These proteins are uniformly distributed throughout the PNS and do not explain either the proximodistal gradient of inflammatory demyelination or the variations in degree of involvement amongst different nerves. Ganglioside composition, however, does vary among different cranial nerves (Chiba et al. 1997). It therefore has been shown in AIDP and CIDP in humans, and in corresponding animal models in laboratory animals, that the profile of anti-ganglioside antibodies may predict the clinical phenotype (Kaida et al. 2009; Yoshino et al. 2000). Hence, oculomotor nerve involvement is a characteristic feature of the Miller-Fisher syndrome and of GBS with ophthalmoplegia associated with antibodies directed against the ganglioside GQ1b that is particularly abundant in CNIII (Chiba et al. 1997; Willison 2006). The binding partners for IgG in AvIDP remain to be identified but the remarkable involvement of CNIII and CNV render similarly distributed avian gangliosides likely target molecules for immunoaggression, even though Miller-Fisher syndrome and GBS with ophthalmoplegia are axonal diseases (Fross and Daube 1987; Willison and Yuki 2002).

In analogy to EAN models, the main fraction of recruited T-cells carried  $\alpha\beta$  T-cell receptors (Hadden and Gregson 2001). Even though a contribution of  $\gamma\delta$  T-cells to human IDP has been documented, indicating a role of non-peptide antigens as triggers for autoaggression (Allison and Garboczi 2002; Winer et al. 2002), the prevalence of at least 10%  $\gamma\delta$  T-cells in AvIDP

has to be interpreted with caution since this T-cell population represents about 20 to 50% of the circulating T-cell pool in chickens under physiological conditions (Bridle et al. 2006). In contrast, human  $\gamma\delta$  T-cells represent approximately 1 to 15% of peripheral blood lymphocytes (Robak et al. 2001).

So far, the aetiology of AvIDP is still undetermined. Preceding events associated with the onset of GBS range from viral, mycoplasmal and bacterial infections to surgery, vaccination, fever treatment and other stressful conditions (Arnason 1975; Hadden et al. 2001). All chickens, affected and unaffected, originated from one single flock and were raised in an identical environment regarding diet, housing and exposure to environmental pathogens. In contrast to SPF-animals, these chickens are exposed to permanent infection pressures that remain to be controlled by tight polyvaccination management.

Thus, an association with preceding infection, as well as with vaccination, may be involved in disease development via molecular mimicry as has been documented in GBS [158, 159].

Outbreaks of viral, mycoplasmal and bacterial infections in chicken flocks are generally limited by strict vaccination programs and by routine health monitoring. However, worldwide distribution, paired with neurotropism and some overlapping clinical and histopathological features, render Marek's disease herpesvirus an important candidate amongst avian infectious agents (Osterrieder et al. 2006). Previous studies already have emphasised the similarity of demyelination in Marek's disease (MD) and in EAN (Lampert et al. 1977a; Lampert et al. 1977b; Pepose 1982; Pepose et al. 1981). Moreover, GBS has been associated with a panel of human herpesviruses, namely Varicella-zoster virus (Jacobs et al. 1998; Pavone et al. 2002; Roccatagliata et al. 2001), cytomegalovirus (Dowling et al. 1982; Dowling and Cook 1981; Jacobs et al. 1998), Herpes simplex virus (Jacobs et al. 1998) and more frequently Epstein Barr virus (Dowling et al. 1982; Dowling and Cook 1981; Jacobs et al. 1998). We therefore employed a PCR protocol that allows for the discrimination of MDV vaccine and field strains. The results of this PCR analysis strongly suggest that infections with virulent MDV strains should not be considered as the cause of AIDP.

In addition to preceding infections, vaccinations have been reported risk factors for GBS and CIDP in humans. Antecedent immunizations with vaccines against influenza, hepatitis, measles, mumps, and rubella and others infrequently have been associated with GBS ((CDC) 2006; Schattner 2005; Siddiqui et al. 2005; Souayah et al. 2007). All chickens in this study

were vaccinated in the first few weeks post hatching with inactivated or live vaccines against MDV, Newcastle disease virus, infectious bursal disease virus, avian infectious bronchitis virus, *Salmonella* spp., and coccidiosis. Hence, multivaccination appears a possible immunological trigger. The potential contribution of infections and/or immunizations to disease development is supported by the observation that SPF animals of the same genetic background do not develop AvIDP. Further trials on a population of unvaccinated chickens are mandatory to evaluate the possible role of vaccination programs for AvIDP development.

While external triggers still remain uncertain, we were able to identify a genetic susceptibility factor confined to the avian major histocompatibility complex (MHC), the so called B-complex. The four genotypes studied displayed marked differences in risk of being affected by AvIDP. Most obvious was the increased risk of genotype [261/539] compared to others. In addition, genotype [357/539] also showed higher risk of AvIDP compared to genotype [261/357], and, to a lesser extent, compared to genotype [261/261] as well.

Moreover, the percentage of AvIDP-affected animals was significantly higher for genotypes [261/539] and [357/539] than for the other two haplotype combinations. Results suggest an association of marker LEI0258, located in the MHC region of the chicken, with the occurrence of AvIDP as earlier indicated by Bacon et al. (Bacon et al. 2001). Thereby, the allele with a fragment size of 539 bp seems to be linked to an elevated risk of developing this disease.

Likewise, in the highly susceptible Lewis rats that are commonly used in EAN trials, a certain allele of a MHC-linked gene – amongst further, non-MHC regions – is necessary in the MHC or RT1 region to confer EAE susceptibility in the F2 progeny (Roth et al. 1999). Furthermore, HLA-DR2 is associated with a higher susceptibility to CIDP in humans (McCombe et al. 2006). In GBS, a genetic background is also suspected but has not yet been confirmed (Geleijns et al. 2004; van Sorge et al. 2005).

To date, EAN is the most frequently used animal model for investigation of immunopathological mechanisms in acute inflammatory demyelinating diseases of the PNS (Maurer et al. 2002). Even though it strongly resembles AIDP histopathologically, there are several disadvantages and dissimilarities to the human disease in terms of CNS involvement – which is very rare in GBS (Maier et al. 1997; Muller et al. 2003) – and a monocausal neuritogenic trigger, that poorly reflects the natural disease development (Maurer et al. 2002). Like AIDP and EAN, AvIDP is characterised by infiltration of nerve roots and peripheral nerves with macrophages and lymphocytes and, most importantly, a cell-mediated

demyelination (Hughes and Cornblath 2005; Maurer et al. 2002). In AvIDP the CNS is not involved at any time, as is described for the vast majority of GBS cases (Maier et al. 1997; Muller et al. 2003).

Compared to experimental immunization with mimicked epitopes, the spontaneous disease development of AvIDP is much closer to the field situation and provides an opportunity to investigate aetiological factors through purpose-based exposure and manipulations of the environment.

A drawback of AvIDP as a disease model lays in the difficulty to identify pre- or subclinical animals and thereby the very early stages of immunopathology, before switching from Th1- to Th2-mediated cascades. However, scientific approaches to AvIDP are facilitated by its availability, reproducibility and economic considerations. In a flock of up to 5000 animals, a mean number of 50 to 200 chickens is affected per 18 weeks of the breeding cycle. In addition, the availability of the chicken genome sequence now greatly facilitates genetic and immunological studies and has led to the availability of numerous molecular tools for detailed studies (Consortium 2004). This and the possibility to select susceptible and resistant birds make the AvIDP-chicken a valuable model system for further studies of inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathies.

## Conclusions

Sporadic paralysis in juvenile White Leghorn chickens is caused by an inflammatory demyelination of cranial and peripheral nerves. Paralytic stages are associated with humoral immune events that resemble the late stage of AIDP in humans. The natural development of AvIDP is an advantage over EAN regarding research on disease causing factors. MHC-related genetic factors are involved in disease susceptibility. Taken together, AvIDP may serve as a valuable model for further investigations on the aetiology and immunobiology of AIDP as well as its therapy.

## Abbreviations

Acute inflammatory demyelinating polyneuropathy (AIDP); avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuritis (AvIDP); central nervous system (CNS); cranial nerve (CN); cytotoxic T cell (CTL); dorsal root ganglion (DRG); chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP); experimental autoimmune neuritis (EAN); germinal centre (GC); Guillain-Barré syndrome (GSB); monoclonal antibody (mAb); inducible nitric oxide synthase (iNOS); major histocompatibility complex (MHC); Marek's disease (MD);

Marek's disease herpesvirus (MDV); peripheral nervous system (PNS); T-cell receptor (TCR); T helper cell (Th)

## **Artikel 2: Etablierung elektrophysiologischer Methoden zur Untersuchung neurologisch erkrankter Hühner in Langzeitstudien (eingereicht): Evaluation of lumbosacral nerve root conductance in chickens by electrophysiological testing and high-resolution spinal magnetic stimulation**

### **Abstract**

The value of avian models of peripheral nerve research recently became substantiated by the immunobiological similarity of avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuritis (AvDIP) to human Guillain-Barré syndrome providing an alternative animal model for experimental autoimmune neuritis. As electrophysiologic evaluation of nerve roots is essential part of the diagnosis of polyradiculoneuropathies in humans, it would be favourable to have similar research methods available for chickens. Hence, this study was performed (1) to establish a tool-set that allows for reproducible evaluation of the tibial/sciatic nerve and its nerve roots, (2) to achieve age-matched reference values, and (3) to trace the kinetics of peripheral nerve maturation within chickens.

Nine chickens underwent serial electrodiagnostic examinations between the age of 6 and 15 weeks. Several methods of sensory and motor nerve fiber stimulation of the tibial/sciatic nerve were tested and modified or established according to requirements. Ultimately, cranial somatosensory evoked potentials, compound muscle action potentials elicited by electrical as well as spinal magnetic stimulation and motor nerve conduction velocity were available for tibial/sciatic nerve and nerve root evaluation in chickens. Base values were obtained for all investigations and parameters. Results indicated that the maturation of the nerve fibers is incomplete up to the age of 15 weeks.

The methods tested here provide an excellent tool-set for quantitative tibial/sciatic nerve and nerve root assessment in avian polyradiculoneuropathies, especially within the scope of longitudinal monitoring of the disease course.

## Introduction

Electrodiagnostic evaluation of spinal nerves and nerve roots, as aspired in diagnosis and monitoring of human polyradiculoneuropathies like Guillain-Barré syndrome (GBS) (Gupta et al. 2008; Kalita et al. 2008), is routinely performed to determine and assess the function of proximal sensory and motor nerve fibers. Examination of the nerve roots hampers from the difficulty to access the particular anatomic structures since deep location and surrounding bones at the emergences complicate the controlled application of stimuli and, moreover, render these areas less suitable for taking nerve biopsies for morphological disease monitoring.

Currently, the nerve root function may be assessed electrodiagnostically by H reflexes, F wave, and somatosensory evoked potentials (SSEPs) with varying feasibility. Furthermore, there are at least two more ways to assess the status of the ventral nerve roots and the most proximal parts of the motor nerve fibers directly without including parts of the CNS as in the case of F waves: high-voltage percutaneous electrical stimulation and paravertebral magnetic stimulation.

Just recently, the value of chickens in neurological research has been consistently increasing since diseases like the GBS-like dysimmune avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuritis (AvIDP) (Bader et al.) or the classical form of Marek's disease (Pepose et al. 1981; Stevens et al. 1981) provide interesting, naturally occurring alternatives to experimental animal models for human inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathies (IDPs). The great benefit of chickens as experimental animals is given by economical aspects, easy handling, and a body size that outreaches that of the routinely used rodents like mice and rats. Therefore, peripheral nerve and nerve root research in chickens edges ever close to the spotlight.

There is a considerable lack of electrophysiologic data on age and breed dependent variations in normal chickens even though basic investigations for chickens and/or other avian species have been carried out, including establishment of electrodiagnostic techniques to measure motor nerve conduction velocity (MNCV) (Bagley et al. 1995; Bagley et al. 1992; Kornegay et al. 1983b; Maguire et al. 1998; Massicotte et al. 2001; Platt et al. 1999), F waves (Bagley et al. 1993), sensory nerve conduction velocity (SNCV) (Brenner et al. 2008), cortical SSEPs (Gregory and Wotton 1989; Machida et al. 1994) and cord dorsum potentials (Brenner et al. 2008). In contrast to electrodiagnostic measurements, spinal magnetic stimulation (sMS) has not yet been performed in birds. Our preliminary studies already revealed that motor potentials can be evoked by spinal magnetic stimulation under isoflurane

anaesthesia (data not shown). Based on this observation we aimed to establish a specific protocol and reference values for electrodiagnostic evaluation and spinal magnetic stimulation of lumbosacral nerve roots in chickens.

## **Material and Methods**

### **Animals**

Twelve female White Leghorn chickens were obtained from a commercial breeder (LSL, Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, Germany) at an age of 6 weeks. Physical and neurological examinations were performed on each chicken as described previously (Clippinger et al. 2007) to evaluate the general health status. All animal experiments were performed in accordance with the German Protection of Animals Act and approved by the government of Upper Bavaria, Germany (55.2.1.54-2531-91-08).

### **Study protocol**

Nine chickens were used for sequential electrophysiologic testing at the ages of 6 weeks, 8 weeks, 10 weeks, and 15 weeks. Additionally, confirmatory explorations were performed in three additional animals.

### **Anesthesia**

All electrophysiologic measurements were performed under anesthesia. The chickens were manually restrained, while anesthesia was induced with 5% isoflurane administered via a purpose built face mask. Once relaxation of the muscles had occurred and the corneal reflexes were sluggish, the chickens were positioned in lateral recumbency and obtained 1.5 to 3% of isoflurane in oxygen via inhalation for the duration of the procedure. Body temperature was continually measured and maintained at 37° to 40°C supported by the subcutaneous administration of warm physiological saline and an underlain hot gel pad. The depth of anesthesia was monitored using muscle tone, withdrawal reflexes, corneal reflexes, breath and heart rate, variations of which lead to according changes in the concentration of isoflurane.

### **Technical equipment**

Electric stimulation and all recordings were performed with a Viking Quest™ neurodiagnostic system, Version 11.0.0 (Viasys Healthcare Neurocare Group, Judex A/S). For spinal magnetic stimulation, a 2 Tesla PowerMAG magnetic stimulator (MAG & More GmbH, Munich, Germany) was connected to the above described EMG device for assessment of the evoked nerve responses.

## **Motor nerve conduction velocity (MNCV) and compound muscle action potentials (CMAPs)**

*Stimulation.* Percutaneously, sciatic/tibial nerve stimulation was performed with 2 monopolar Teflon-coated needle electrodes<sup>1</sup> at a proximal and a distal stimulation site. Proximally, the cathode was inserted 1 cm caudal to the femoral trochanter. The anode was positioned subcutaneously 1 cm caudal to the cathode. Distally, the cathode was inserted in the popliteal fossa close to the tibial nerve and the anode was positioned subcutaneously 1 cm proximal to the cathode. The appropriate position of the electrodes was adjusted during low intensity stimulation at 1 Hz and confirmed by backward movement of the lower limb.

Stimulation was achieved by rectangular pulses of 0.2 ms duration, a frequency of 1Hz, at an intensity 15-20% greater than that required for maximal CMAP amplitude.

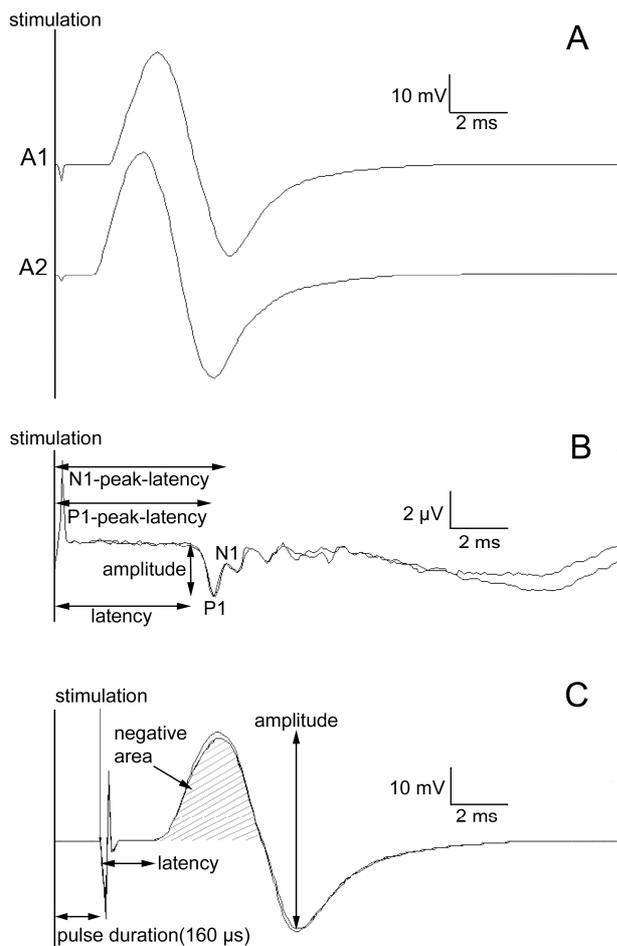
*Recording.* The CMAP was recorded from the gastrocnemius muscles (GM) with two subdermal platinum needle electrodes<sup>2</sup>. The active electrode (cathode) was placed percutaneously over the motor point area of the GM and the reference electrode (anode) subcutaneously over the ankle tendon (belly-tendon-montage). The electrodes were positioned in this manner to achieve a CMAP having a sharp initial negative deflection, followed by a positive deflection. The ground electrode was placed subcutaneously between the stimulating and the recording electrodes, overlying the lateral epicondyle of the femur. Signals were amplified by filters set at a band pass of 20 Hz to 10 kHz. A sequence of 10 impulses was averaged.

*Parameters.* The following parameters were measured from the CMAPs of the proximal and the distal stimulation site (Figure 1 A): onset latency (ms), peak-to-peak amplitude (mV), negative area (mVms) and CMAP duration (ms). Onset latency was defined as the time between the stimulus artefact and the first negative deflection from the base line. The cursors of the amplitudes were set peak to peak. The negative area and the CMAP duration were measured between cursors positioned at the first negative deflection and the first baseline crossing. In order to obtain motor nerve conduction velocity (MNCV; m/s) the distance between proximal and distal stimulation site was measured manually with a flexible reference tape and feed into the computer program. Motor nerve conduction velocity was determined by the computer software following the standard formula:

---

<sup>1</sup> Teflon-coated needle electrodes: diameter: 0.36 mm (28 G), length: 25 mm; Viasys Healthcare GmbH, Hoechberg, Germany

<sup>2</sup> Platinum needle electrodes: length of 12 mm; Cardinal Health, Hoechberg, Germany



**Figure 1**

**A:** Two recordings of electrically evoked CMAP elicited by proximal (line a) and distal (line b) tibial/sciatic nerve stimulation. CMAP parameters were onset latency, peak-to-peak amplitude, negative area, and CMAP duration. Furthermore, the tibial/sciatic motor nerve conduction velocity was evaluated.

**B:** Recorded cranial SSEPs after stimulation of the tibial nerve. The peak after the first distinct positive deviation and the following negative peak are denoted as P1 and N1. Onset latency and amplitude were used for analysis.

**C:** CMAPs due to spinal magnetic stimulation of sciatic motor nerve fibers were repeated thrice. Note the similar morphology if compared to the electrically evoked CMAPs.

$MNCV = \text{distance between proximal and distal stimulation site} / (\text{latency}_{\text{prox}} - \text{latency}_{\text{dist}})$ .

### Cranial somatosensory evoked potentials (SSEPs)

*Stimulation.* Tibial nerve (TN) stimulation was achieved percutaneously with 2 monopolar needle electrodes<sup>1</sup>. The cathode was inserted in the popliteal fossa close to the tibial nerve. The anode was positioned subcutaneously 1 cm lateral to the cathode. Stimulation was achieved with a rectangular electric stimulus of 0.2 ms duration at a frequency of 2 Hz and submaximal intensity. The appropriate position of the electrodes was adjusted by low intensity stimulation and confirmed by backward movement of the lower limb during stimulation.

*Recording.* Upon preliminary testing of different recording sites (see discussion) all SSEPs were recorded from the vertex with two subdermal Platinum needle electrodes<sup>2</sup> that were attached to a 4-channel EMG/EP device (Viking Quest, Viasys).

The active electrode (cathode) was placed at the vertex close to the caudal end of the comb. The reference electrode (anode) was subcutaneously inserted in the contralateral mandible two thirds of the distance caudally.

The ground electrode was positioned subcutaneously laterodorsal the processus acrocoracoideus of the coracoid of the contralateral side. The stimulus started data acquisition by the computer, functioning as an averager. High pass and low pass filters for the recordings

were set at 2 Hz to 3 kHz. Two hundred individual trials were averaged and two separate runs were utilized at each side to ensure reproducibility.

*Parameters.* SSEP onset latency (ms) was defined as the time between stimulation artefact and the first distinct positive deviation of the potential from the baseline; P1-peak latency (ms) was defined as the time between stimulation artefact and the first distinct positive peak (P1); N1-peak latency (ms) was defined as the time between stimulation artefact and the first distinct negative peak (N1) that followed the positive peak; SSEP amplitude ( $\mu\text{V}$ ) was measured from baseline to P1 (Uzuka et al. 1987) (Figure 1 B).

In order to compensate geometrical/anatomical size differences the data were normalized for the overall distance between stimulating and recording electrode defined as firstly the distance between the stimulation site and the site of the sciatic nerve emergence and secondly the distance between the sciatic nerve emergence and the recording site. To achieve somatosensory conduction velocity (SSCV; m/s), the following formula was used:

$$\text{SSCV} = \text{stimulus to recording site distance} / \text{onset latency.}$$

### **Spinal magnetic stimulation (sMS)**

*Stimulation.* A butterfly coil (510518, Magnetic and Life Science Systems, Munich, Germany) with an outer longitudinal diameter of 104 mm was applied. The coil consisted of two asymmetrically wound copper coils with a stimulation area of 104 mm x 56 mm. Each of the two coils had a diameter of 45 mm. The area of optimal depolarisation and of the highest range of penetration depth was defined to be 12 mm from the front border of the coil opposite to the handhold (unpublished pilot work). For sMS the synsacral area of the chickens was tilted horizontally whereas the rest of the body persisted in a lateral position. The coil was positioned in a longitudinal manner dorsal to the synsacrum with the handhold opposite to the recording side. The focus was centred above a site immediately caudal the caudal end of the iliosynsacral crista and the coil was tilted about 20° to the side of the stimulated leg, in order to achieve a maximal amplitude. The stimulus consisted of a single bipolar, sinusoidal pulse of 0.2 ms duration. The eddy current pulse induced by this stimulator was 160  $\mu\text{s}$  in duration with a rising time of 40  $\mu\text{s}$ . As in the electrostimulation a supramaximal stimulus intensity was used.

*Recording.* The magnetically evoked CMAPs were recorded from the GM with the identical electrode setup as described previously for MNCV. Signals were amplified by filters set at 20 Hz and 3 kHz. Three impulses of each side were recorded to assure reproducibility.

*Parameters.* sMS onset latency, peak-to-peak amplitude, negative area, and CMAP duration were defined as described previously for the electrically induced CMAPs (Figure 1 C).

For calculations to compensate geometrical/anatomical size differences two further distances were measured in mm: firstly, the way between the stimulation to recording point; secondly the leg length which was defined as the distance between the femoral trochanter and the point of the third toe.

### **Confirmatory tests**

*SSEP after conduction block, neurectomy and rhizotomy.* To verify that the SSEPs are induced by a current within sensory fibers and not a result of direct muscle stimulation a lidocaine nerve block and a neurectomy of the sciatic nerve was performed in two animals.

After establishment of an SSEP with the intact nerve, a conduction block was set in one chicken by epineurial injection of 1% lidocaine without altering the position of the chicken or of the electrodes. Afterwards the electrodiagnostic procedures were repeated.

In a second chicken neurectomy of the sciatic nerve was performed. An additional analgesic was administered 20 min before the surgery (butorphanol: 2 mg/kg i.m., meloxicam: 0.5 mg/kg i.m.). The chicken was positioned in lateral recumbency. After placement of the electrodes as described before, initial electrophysiological measurement was achieved. A 1.5 cm skin incision was made subsequently in the middle of the thigh about 1.5 cm caudal to the femoral bone – again without altering the position of the leg or of the electrodes. Via careful blunt dissection of the subcutaneous tissue the iliotibial muscle was exposed and transected followed by a cut through the iliofibular muscle with special attention to the sciatic artery. The sciatic nerve was exposed and transected and the electrodiagnostic procedures were repeated. Thereafter, the iliotibial and iliofibular muscles were completely transected and the measurements performed again – this time by direct stimulation of the distal blunt of the dissected sciatic nerve. Subsequently, the chicken was euthanatized with pentobarbitone and rhizotomy was performed as described before followed by a final measurement.

*Magnetic stimulation after rhizotomy.* To confirm that the magnetic stimulation induced a current in the spinal roots of the sciatic nerve and not in circumjacent excitable tissues we performed a rhizotomy at the exit of the roots of the lumbosacral plexus in a third additional chicken. Magnetic stimulation was performed on the right leg as described before. A second stimulation was performed immediately after application of a lethal dose of pentobarbitone (2

ml/kg) to the jugular vein and rhizotomy. For the latter a transcoelomic approach was chosen: the intestinal peritoneal cavity was opened in the ventral midline, the intestinal organs were placed aside and the kidneys were removed carefully so that spinal roots of the right sciatic nerve were exposed. The roots were transected at their exit from the spinal canal. Subsequently, the magnetic stimulation was performed with the same pulse characteristics as described before.

*Histological investigation.* Peripheral nerves, nerve roots including dorsal root ganglia, spinal cord, and brain were harvested immediately after euthanasia. The samples were routinely subjected to paraffin histology, epoxy embedding and nerve fibre teasing as described in detail earlier (Bader et al.), Light microscopical examination was carried out on a Zeiss Axiophot® (Zeiss Instruments, Oberkochen, Germany) by two independent investigators experienced in CNS and peripheral nerve pathology (SB, KM).

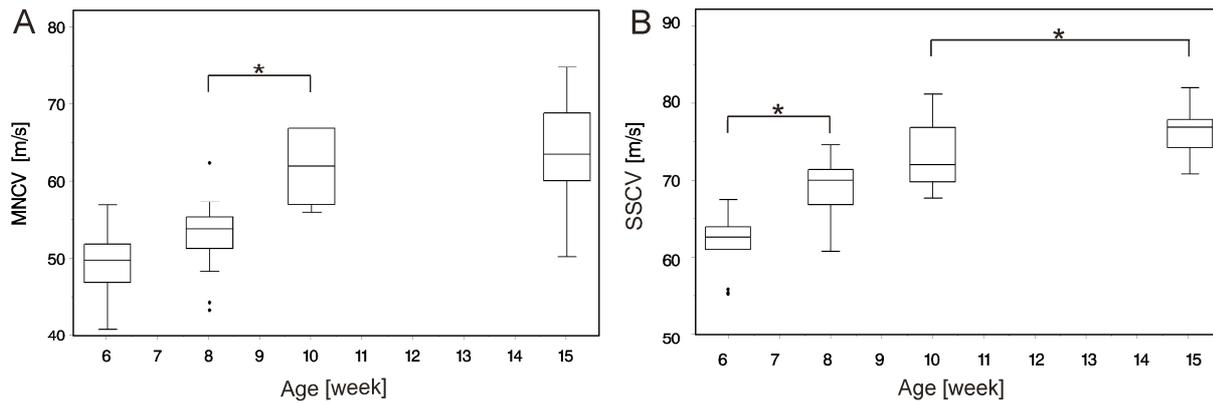
### **Statistical analyses**

Gaussian distribution was assessed for statistical comparisons and t tests were performed to compare between the data obtained by the right and the left side and between the values of two consecutive ages. Pearson correlation coefficients were calculated between parameters and age, distances, and/or temperature. Results were considered to be significant at a value of  $p \leq 0.05$ . Group data are represented as means  $\pm$  SD in the text and tables.

### **Results**

Physical and neurological examination did not reveal clinical and neurologic abnormalities in any of the birds. MNCV, CMAPs elicited by electrical and/or magnetic stimulation as well as a SSEP recorded over the scalp were consistently obtainable in all chickens on both sides of the body and at each of the four independent sessions.

Since t test did not show significant differences between the data obtained from the right and the left side of any chicken we averaged the electrophysiologic values derived from the two legs and mean value  $\pm$  SD was used for overall analysis.



**Figure 2**

**A:** Motor nerve conduction velocity was highly correlated with age ( $p < 0.0001$ ). Asterisks label statistically significant differences between the age-groups;  $N = 9$ .

**B:** Somatosensory conduction velocity was determined to achieve information about the functionality of sensory fiber conductance between stimulation point (popliteal fossa) and recording site (vertex) independent of the body size. SSCV correlated highly with preceding age ( $p < 0.0001$ ); statistically significant differences (asterisks) emerge between the 6<sup>th</sup> and the 8<sup>th</sup> posthatching week ( $p = 0.0005$ ) and between the 10<sup>th</sup> and the 15<sup>th</sup> posthatching week ( $p = 0.0014$ ).  $N = 9$ .

### Electrical motor nerve stimulation

In all chickens and with optimal needle position maximal amplitudes were reached at a stimulus intensity of 3 mA. Consequently, to ensure that all nerve fibers were stimulated intensity was increased by additional 0.5 mA.

MNCV was highly correlated with age ( $p < 0.0001$ ). It rose from a mean tibial MNCV of  $49.8 \pm 4.5$  m/s (range 41 to 57 m/s) at an age of 6 weeks to a mean of  $53.8 \pm 4.6$  m/s (range 44 to 63 m/s) at an age of 8 weeks, increased further to a mean of  $61.9 \pm 4.1$  m/s (range 56.0 to 67 m/s) at an age of 10 weeks, and finally reached a mean of  $63.5 \pm 6.5$  m/s (range 50 to 75 m/s) at an age of 15 weeks (Figure 2 A). T test revealed that just the increase in the period from the 8<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> posthatching week was significant ( $p < 0.001$ ) whereas between the 6<sup>th</sup> and the 8<sup>th</sup> and the 10<sup>th</sup> and the 15<sup>th</sup> week of age the rising was not ( $p = 0.07$  and  $p = 0.55$ , respectively). Furthermore, there was a significant age-related increase in temperature ( $p = 0.0004$ ) and leg length measured between the femoral trochanter and the third toe ( $p < 0.0001$ ), respectively. However, there was no statistically significant correlation between temperature and MNCV in the particular age-groups.

Electrically elicited CMAPs were consistently recorded from the GM in response to proximal and distal tibial nerve stimulation. Correlation of the proximal onset latency showed a significant age-dependent increase ( $p = 0.0169$ ) starting with a mean of  $1.78 \pm 0.16$  ms and subsequently rising to a mean of  $1.92 \pm 0.11$  ms at the age of 15 weeks (Table 1) whereas distal onset latency did not. A comparison between the parameters of the CMAPs elicited at

the proximal stimulation and that possessed by distal stimulation offered no significant differences.

Table 1 *Electrical motor nerve stimulation data of the tibial/sciatic nerve in White Leghorn chickens*

	6 weeks of age	8 weeks of age	10 weeks of age	15 weeks of age	Correlation of age and parameter
Onset latency <sub>prox</sub> (ms)	1.78 ± 0.16	1.84 ± 0.17	1.87 ± 0.09	1.92 ± 0.11	p = 0.0169*
Onset latency <sub>dist</sub> (ms)	1.21 ± 0.14	1.26 ± 0.12	1.29 ± 0.07	1.26 ± 0.11	p = 0.3172
Amplitude <sub>prox</sub> (mV)	46.1 ± 8.2	45.5 ± 6.6	43.6 ± 4.1	44.0 ± 4.3	p = 0.3711
Amplitude <sub>dist</sub> (mV)	47.1 ± 9.1	47.6 ± 8.51	45.2 ± 5.8	41.9 ± 6.7	p = 0.0463*
Negative area <sub>prox</sub> (mVms)	45.2 ± 7.7	43.1 ± 5.7	41.2 ± 6.0	42.3 ± 4.2	p = 0.2674
Negative area <sub>dist</sub> (mVms)	44.4 ± 9.4	45.5 ± 6.6	39.7 ± 6.5	37.6 ± 6.2	p = 0.0033*
CMAP duration <sub>prox</sub> (ms)	3.0 ± 0.2	2.84 ± 0.26	2.88 ± 0.16	2.92 ± 0.16	p = 0.853
CMAP duration <sub>dist</sub> (ms)	3.0 ± 0.25	2.90 ± 0.27	2.77 ± 0.13	2.79 ± 0.24	p = 0.035*
MNCV (m/s)	49.8 ± 4.5	53.8 ± 4.6	61.9 ± 4.1	63.5 ± 6.5	p < 0.0001*
Interelectrode distance (mm)	27.9 ± 2.6	32.1 ± 3.9	35.7 ± 4.6	40.9 ± 6.1	p < 0.0001*
Leg length (mm) (femoral trochanter to 3rd toe)	212 (201-223)	246 (234-256)	282 (274-295)	307 (300-320)	p < 0.0001
Temperature (°C)	38.1 (36.8-39.5)	38.6 (36.8-40.4)	39.2 (37.7-40.1)	39.2 (38.3-40.6)	p = 0.0004*

Values are expressed as means ± SD (n = 9) except of "leg length" and "temperature" where mean and range are shown. See METHODS for calculations. Statistical significances are represented by asterisk.

### Cranial somatosensory evoked potentials

A submaximal intensity of 2.7 mA was used in all trials. Cranial SSEPs after tibial nerve stimulation were recorded consistently in all chickens. Onset latency showed a significant age-correlated increase (p < 0.0001) in which the mean measured at the 6<sup>th</sup> and at the 8<sup>th</sup> week of age were similar with 4.19 ± 0.25 ms and 4.21 ± 0.24 ms, but then increased at the age of 10 weeks to 4.45 ± 0.27 ms and at an age of 15 weeks to 4.82 ± 0.16 ms (Table 2). The values of the peak latencies were more variable but correlation with age showed also a significant increase (P1-peak latency: p = 0.0005; N1-peak latency: p = 0.0008). Mean P1-peak latency presented with 5.46 ± 0.27 ms at an age of 6 weeks, 5.33 ± 0.23 ms at an age of 8 weeks, 5.52 ± 0.22 ms at an age of 10 weeks, and 5.75 ± 0.18 ms at an age of 15 weeks; mean N1-peak latency displayed 5.96 ± 0.31 ms at 6 weeks of age, 5.84 ± 0.26 ms at 8 weeks of age, 6.03 ± 0.27 ms at 10 weeks of age, and 6.3 ± 0.19 ms at an age of 15 weeks. The amplitude showed an inverse correlation relating to rising age (6 weeks of age: 2.71 ± 0.93 µV; 8 weeks of age: 2.69 ± 0.81 µV; 10 weeks of age: 2.31 ± 0.51 µV; 15 weeks of age: 2.1 ± 0.71 µV; p = 0.0092). SSCV was positively correlated with age (p < 0.0001; Table 2 and Figure 2 B). It started with a conduction velocity of 62.5 ± 4.0 m/s, subsequently increased to 69.7 ± 3.8 m/s, thereafter accelerated to 71.7 ± 4.2 m/s and finally reached a velocity of 77.2 ± 2.8 m/s.

Table 2 Sensory nerve stimulation data of the tibial nerve in White Leghorn chickens

	6 weeks of age	8 weeks of age	10 weeks of age	15 weeks of age	Correlation of age and parameter
Onset latency (ms)	4.19 ± 0.25	4.21 ± 0.24	4.45 ± 0.27	4.82 ± 0.16	p < 0.0001*
P1-peak latency (ms)	5.46 ± 0.27	5.33 ± 0.23	5.52 ± 0.22	5.75 ± 0.18	p = 0.0005*
N1-peak latency (ms)	5.96 ± 0.31	5.84 ± 0.26	6.03 ± 0.27	6.3 ± 0.19	p = 0.0008*
Amplitude (µV)	2.71 ± 0.93	2.69 ± 0.81	2.31 ± 0.51	2.1 ± 0.71	p = 0.0092
SSCV (m/s)	62.5 ± 4.0	69.7 ± 3.8	71.7 ± 3.7	77.2 ± 2.1	p < 0.0001*
Stimulation to recording point distance (mm)	261 ± 7.5	292.7 ± 4.7	318.6 ± 6.4	373.3 ± 9.2	p < 0.0001
Temperature (°C)	38.6 (36.7-39.7)	38.6 (36.9-40.5)	39.1 (37.7-40.4)	39.4 (38.3-40.5)	p = 0.0068*

Values are expressed as means ± SD except of "temperature" were mean and range are shown (n = 9). See METHODS for calculations. Statistical significances are represented by asterisk.

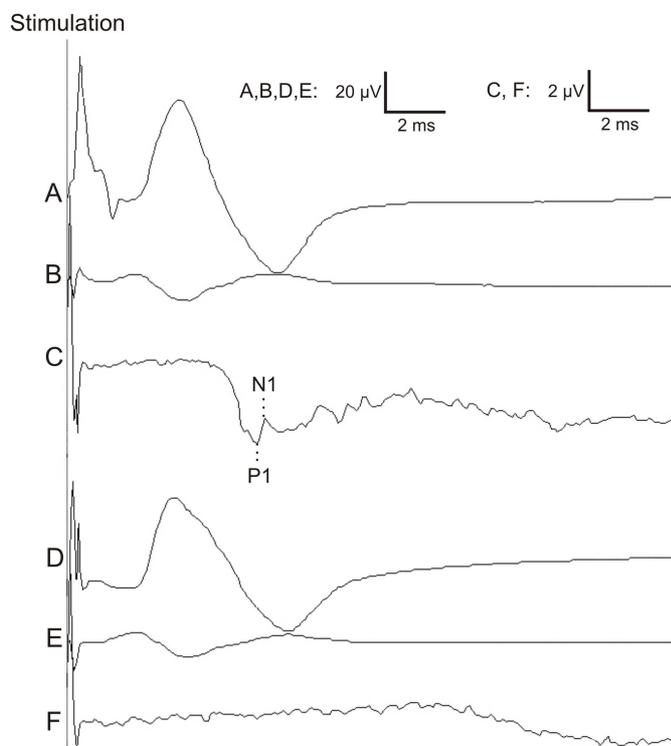


Figure 3

**A:** Potentials recorded in preliminary tests over the spine and vertex after tibial nerve stimulation before (A to C) and after (D to F) nerve block due to lidocaine administration. Line A displays the signal recorded on the synsacrum in the middle of an imaginary line between the cranial borders of the femoral heads. It starts with a small triphasic potential followed by a larger negative wave and a subsequent positive deviation until it returns to baseline. Therefore, this wave form resembles cord dorsum potentials (CDP) described in humans and other mammals like dog and cat. The signal illustrated in line B was recorded at the intervertebral ligament of the last cervical and first thoracic vertebrae. In mammals similar potentials have been described to demonstrate far-field potentials. Line C displays the cranial SSEP recorded over the vertex (see Figure 1 B).

After subcutaneous administration of lidocaine the potentials recorded over the spine (A, B) could still be observed which excludes a pure sensory generation due to tibial nerve stimulation. Whereas the lumbosacral recorded signal (A) slightly changed its wave form in terms of losing its triphasic initial potential and decreasing in height (D), the cervicothoracally recorded signal (B) remained constant (E). Just the potential recorded over the vertex was completely abolished (F). The same phenomenon has been found after neurectomy of the sciatic nerve and even rhizotomy of the lumbosacral nerve roots which lead us to the decision to exclude the spinally recorded potential from further analysis.

*SSEP after conduction block, neurectomy and rhizotomy.* As described above, initially a lidocaine nerve block and a neurectomy followed by transection of the nerve roots of the sciatic nerve were performed to assess the effect on the achieved potentials. Preliminary tests included two further potentials: one recorded within the ligamentum intervertebrale between the last cervical and first thoracic vertebrae, and another one dorsal of the synsacrum in the mid of an imaginary line between the cranial

border of femoral head (Figure 3, lines A and B). Neither nerve block nor neurectomy or rhizotomy resulted in abolishment or a significant modification of these two signals (Figure 3, lines D and E). Just the SSEPs measured over the scalp were completely abolished (Figure 3, line C and F). Therefore, it was decided to include just these cranial potentials in the analysis (see above).

### Spinal magnetic stimulation

A stimulation intensity of 65% was used, which has been detected to be supramaximal in preliminary tests performed on ten 11-weeks old chickens (data not shown).

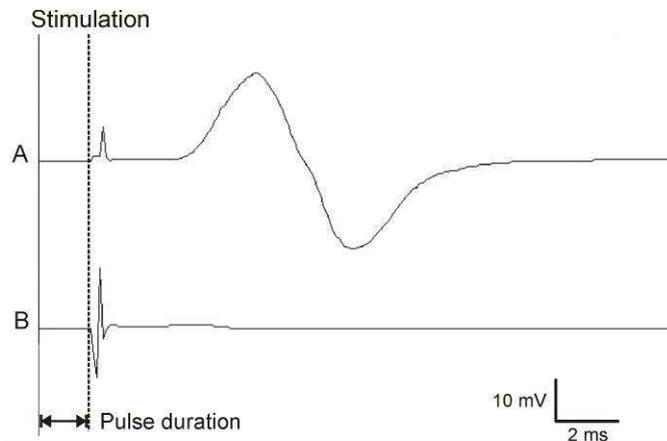
In all chickens, potentials were recorded consistently for each side (Figure 8). Peak-to-peak amplitude, negative area and duration were not significantly different at the varying ages. At an age of 6 weeks, averaged peak-to-peak amplitude was  $41.0 \pm 5.2$  mV, negative area  $43.5 \pm 4.0$  mVms and CMAP duration  $3.45 \pm 0.35$  ms (Table 3). The values measured at 8 weeks of age differed just slightly compared to that received at 6 weeks of age (peak-to-peak amplitude:  $47.8 \pm 6.6$  mV; negative area:  $49.0 \pm 8.0$  mVms; CMAP duration:  $3.41 \pm 0.36$  ms) This also applied for the values gained at the ages of 10 and 15 weeks, respectively, concerning peak-to-peak amplitude ( $43.5 \pm 7.3$  mV and  $43.6 \pm 6.9$  mV), negative area ( $45.1 \pm 9.3$  mVms and  $45.7 \pm 7.8$  mVms), and CMAP duration ( $3.41 \pm 0.33$  ms and  $3.4 \pm 0.25$  ms). In contrast, correlation of onset latencies showed a significant increase with rising age (Pearson correlation,  $p = 0.0006$ ) and leg length (Pearson correlation,  $p = 0.003$ ) from  $2.25 \pm 0.17$  ms at the age of 6 weeks to  $2.47 \pm 0.17$  ms at the age of 15 weeks.

Table 3 Data of the spinal magnetic stimulation of the lumbosacral motor nerve roots of the tibial/sciatic nerve in White Leghorn chickens

	6 weeks of age	8 weeks of age	10 weeks of age	15 weeks of age	Correlation of age and parameter
Onset latency (ms)	$2.25 \pm 0.17$	$2.26 \pm 0.24$	$2.36 \pm 0.19$	$2.47 \pm 0.17$	$p = 0.0006^*$
Amplitude (mV)	$41.0 \pm 5.2$	$47.8 \pm 6.6$	$43.5 \pm 7.3$	$43.6 \pm 6.9$	$p = 0.9091$
Negative area (mVms)	$43.5 \pm 4.0$	$49.0 \pm 8.0$	$45.1 \pm 9.3$	$45.7 \pm 7.8$	$p = 0.7382$
CMAP duration (ms)	$3.45 \pm 0.35$	$3.41 \pm 0.36$	$3.41 \pm 0.33$	$3.4 \pm 0.25$	$p = 0.668$
Stimulation to recording point distance (mm)	$79.7 \pm 4.1$	$90.4 \pm 3.6$	$101.4 \pm 4.5$	$126.1 \pm 8.0$	$p < 0.0001$

Values are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 9$ ). See METHODS for calculations. Statistical significances are represented by asterisk.

*Magnetic stimulation after rhizotomy.* After rhizotomy of the sacral nerve roots no CMAPs were recorded in the GM on spinal magnetic stimulation, even if intensity was increased to 100 % (Figure 4).



**Figure 4**  
Magnetically evoked CMAPs (line A) were completely abolished after rhizotomy (B) of the lumbosacral nerves. Therefore, the potentials were exclusively generated by motor nerve fiber stimulation.

### Comparison of CMAPs by proximal electrical and magnetic stimulation

There was a correlation between peak-to-peak amplitudes gained from the CMAPs elicited by magnetic and by electrical proximal stimulation at an age of 15 weeks ( $p = 0.013$ ) but not at the other measurement points. Similarly, negative area of the CMAPs elicited by sMS and proximal electrical stimulation significantly correlated at the ages of 10 and 15 weeks, respectively, but not in the remaining both age groups. CAMP duration of both was correlated in all age groups.

CMAPs excited by magnetically induced electrical stimulation showed a similar wave form (Figure 1 C) compared to that elicited by electrical stimulation (Figure 1 A). The onset latencies of the CMAPs elicited magnetically lasted on average about 0.3 to 0.4 ms longer than that of the proximal electrical stimulation.

*Histological investigation.* Neither the CNS nor peripheral nerves and nerve roots showed any indication of demyelinating or axonal fibre pathology. Likewise, the dorsal root ganglia and grey matter of the spinal cord and brain were within physiological limits. No changes were noted in the vascular systems associated with the peripheral nerves, nerve roots and the CNS.

## Discussion

Recent work on the resemblance of the avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuritis to human Guillain-Barré syndrome (Bader et al.) enforced the need for proper evaluation tools in avian neurology as well as translational and longitudinal research. Until recently electrophysiological examination of spinal nerve roots in birds was considered to be of low clinical relevance, which may have contributed to the delay of development and standardisation of diagnostic tests and the lack of age-matched electrophysiological reference values. For this reason, we established a straightforward test panel for motor and sensory nerve and nerve root function in chickens by modification of previously published protocols and by introduction of spinal magnetic stimulation.

Tibial/sciatic MNCV was consistently recorded in all chickens. However, initial testings revealed the need for modification of previously published methods (Bagley et al. 1995; Bagley et al. 1992; Clippinger et al. 2000; Kornegay et al. 1983a; Kornegay et al. 1983b; Massicotte et al. 2001; Platt et al. 1999) in terms of utilization of a belly-tendon montage in the GM, as recordable potentials could not be reproduced in the very small and quite tendinous abductor muscles of digit IV (Bagley et al. 1992; Kornegay et al. 1983b). The belly-tendon montage has been described to be one of the most favourable recording sites in electrical and magnetic motor stimulation in humans and it is assumed to feature the motor point endplate region (Kincaid et al. 1993). The corresponding site in the chickens' GM was determined in each individual setting on base of the characteristic potentials. CMAPs recorded from end plate region mirror the behavior of the extracellular currents during stimulation. The rising negative slope represents the initial standing wave of muscle fiber action potentials at the end-plate region beneath the recording electrode (Bromberg and Spiegelberg 1997). The following positive deflection is considered to be either due to repolarisation by effluxing potassium ions or a direction change of the extracellular electrical field with a voltage-drop close to the recording electrode (Dumitru and DeLisa 1991).

Stimulation points were clearly defined by the anatomical landmarks described above which enabled us to identify the correct needle position routinely and on separate sessions. Consequently, the interelectrode distance increased uniformly with age and increasing body size. The reliability of the needle placement on serial investigations in the growing animals was documented by the high level of homology amongst the distinct age groups.

MNCV was positively correlated with age (Figure 2 A). The gain of MNCV was highly significant ( $p < 0.0001$ ) between 6 weeks of age ( $49.8 \pm 4.5$  m/s) and 15 weeks of age ( $63.5 \pm 6.5$  m/s). However this acceleration of impulse conduction was not linear but started

insignificantly between the 6<sup>th</sup> posthatching week and the 8<sup>th</sup> posthatching week ( $p = 0.07$ ). It then became statistically significant between the 8<sup>th</sup> posthatching week and the 10<sup>th</sup> posthatching week ( $p < 0.0001$ ). No significant increase was noted in MNCV between the 10<sup>th</sup> and the 15<sup>th</sup> week ( $p = 0.55$ ). In another preliminary investigation on long term variations we observed an increase in MNCV up to the 25<sup>th</sup> posthatching week (unpublished data). We therefore consider it necessary to establish age-matched control values at least up to an age of 25 weeks which contrasts to former recommendations that suggested developmental changes up to the 15<sup>th</sup> posthatching week only (Bagley et al. 1992)

The age at which full maturation of tibial/sciatic MNCV values has been reached differs considerably, even within clades and species. Reported values of the MNCV measured for the rat are  $52.6 \pm 0.33$  (SEM) m/s at the age of 13 months (Birren and Wall 1956); in the dog, approximately  $60 \pm 10$  m/s (SD) are reached between six months and one year of age (Swallow and Griffiths 1977); in the minipig the MNCV reaches  $70.9 \pm 1.1$  m/s (SEM) at the age of 16 months (Hort-Legrand et al. 2006); in the baboon the MNCV reaches  $72.5 \pm 7$  m/s (SD) at an age of 5 years (Birrell et al. 2000); and in humans  $46.1 \pm 4.1$  m/s (SD) are measured between 15 and 35 years. Apart from the above mentioned study (Bagley et al. 1992), further data on avian species are not available.

Nerve conduction velocity is approximately proportional to the diameter of an axon (Cottrell 1940). Therefore, axonal growth may partially explain the MCVN increase as described for mammals such as dogs, horses and humans (Braund et al. 1982; Cho 1987; Wheeler and Plummer 1989). Secondly, saltatory conduction depends on insulation by myelin sheaths (Huxley and Stämpfli 1949) and site specific clustering of ion channels within the paranode-node-paranode palindrome structures (Scherer 1996). Whether the increase in MNCV in late adolescent chickens is solely attributable to apposition of myelin layers (Berthold et al. 1983; Schroder et al. 1978) remains to be further investigated by morphometrical assessments.

In contrast to the conduction velocity, the peak-to-peak amplitude, negative area and CMAP duration did not vary significantly at the different ages in this investigation. Therefore, the number of excitable nerve fibers and muscle fibers seems to be rather constant from an age of 6 weeks on.

MNCV measured in these chickens was about 10 m/s faster than described by Bagley et al. (Bagley et al. 1992). This difference was consistent throughout the different age groups (6 weeks:  $49.8 \pm 4.5$  m/s versus  $38.7 \pm 2.4$  m/s, 8 weeks:  $53.8 \pm 4.6$  m/s versus  $43.2 \pm 2.7$  m/s, 10 weeks:  $61.9 \pm 4.1$  m/s versus  $50.1 \pm 4.0$  m/s, 15 weeks:  $63.5 \pm 6.5$  m/s versus  $52.7 \pm 1.0$

m/s). However, different breeds and cross-breeds of chickens possibly show variations in the maturation kinetics and/or in the absolute diameter of mature axons and associated myelin sheaths and consequently in the capacity of the conducting motor fibers at the given age. Furthermore, the lower MNCV in Bagley et al.'s study (Bagley et al. 1992) may be due to the farther distal recording site, which may influence the MNCV inversely by distal fiber tapering. In humans, this explains the decrements in conduction velocity from proximal to distal nerve segments and from upper to lower extremities (Campbell et al. 1981).

The range of body temperature during anesthesia was kept rather constant and therefore it did not influence the nerve conduction velocity which rendered a correction formula unnecessary. The length of the chickens' legs just enabled interelectrode distances of 2.5 to 5.0 cm. Maynard and Stolov have demonstrated that distances less than 10 cm may result in errors up to 25% of the calculated MNCV (Maynard and Stolov 1972). In our investigation, the homogenous distribution within the particular age groups does not imply significant reading errors.

The experimental setup for assessment of sensory impulse conduction was based on recommendations made for chickens, ducks and turkeys as well as dogs and cats to measure sensory nerve conduction velocity (SNCV) (Cuddon et al. 1999), lumbar and thoracic cord dorsum potentials (Besalti et al. 2007; Brenner et al. 2008; Cuddon et al. 1999), and cortical SSEPs (Besalti et al. 2007; Gregory and Wotton 1989; Machida et al. 1994; Mouchoniere et al. 2000; Uzuka et al. 1987). Signals were consistently recordable from the following sites: (1) the scalp, (2) the interarcuate gap between the last cervical and first thoracic vertebrae and (3) the synsacrum, whereas no potentials could be recorded from the sciatic nerve.

The lumbosacrally recorded signal strikingly displays the wave morphology (Figure 3 A, line a) described for lumbar cord dorsum potentials (CDP) in humans and other mammals (Besalti et al. 2007; Cuddon et al. 1999; Powers et al. 1982). In comparison the wave morphology taken from cervicothoracic area showed a variable onset and shape which made it difficult to interpret. Notably, the cervicothoracic and lumbosacral signals were not abolished after sciatic neurectomy, rhizotomy of the respective nerve roots and/or lidocaine nerve block (Figure 3 A, line d and e). Persistence of a recordable potential renders an alternative pathway to the spinal cord rather than the lumbosacral plexus roots probable. Their real origin is still unclear and may have represented far field volume conducted potentials via skin, muscle and/or body fluids. Therefore, we excluded these potentials as diagnostic parameter from our screening protocol.

In contrast, the signals recorded from the scalp all had been abolished after both nerve conduction block and/or neurectomy (Figure 3 B, line b). This indicates a purely sciatic/tibial origin and is considered to be the most reliable recording site for the SSEPs in this setting.

The shape of the cranial SSEPs shows a uniform appearance in all chickens and at all ages. It consists of an initial positive peak and a subsequent negative one, which has been similarly described for humans (Strahm et al. 2003). According to the international nomenclature (Strahm et al. 2003) they were designated P1 and N1, respectively. After P1 and N1 further positive and negative deflections followed that were not consistently recorded and therefore not further analyzed.

Commonly used diagnostic parameters in cranially recorded SSEPs are onset latency, peak latencies, interpeak intervals, and peak amplitudes (Strahm et al. 2003; Uzuka et al. 1987). Of these, onset and peak latencies all reflect the conductive capacity of the sensory fibers from stimulation site to cortex. Like in peripheral nerves, the myelination and axonal diameter of central nerve fibers underlie developmental changes (Paus et al. 1999). Therefore an increase in the conductive velocity of the sensory fibers can be expected. All latencies increased with age, which was most likely due to the rising body size. To cope with geometrical/anatomical size differences amongst the animals and amongst the distinct age groups we established the somatosensory nerve conduction as additional parameter. In contrast to MNCV, SSCV includes both peripheral and central sensory pathways. In general, these components are separated by subtracting the onset latency of the cord dorsum potential – which mirrors the peripheral part of the sensory pathway – from the sensory conduction time recorded cortically. The remaining time reflects the central conduction time. Since cord dorsum potentials could not be achieved in this study (see above) central conduction time was not determined. The SSCV however was reproducibly calculated and appeared with a maximum SD of 4 m/s rather homogenous within the distinct age groups (Table 2). Similar to MNCV, SSCV increased progressively with age as it has been previously described for SNCV in humans (Garcia et al. 2000) and other mammals like the horse (Wheeler 1990). Furthermore, preliminary tests revealed a continuing increase up to 90 m/s in the 25<sup>th</sup> posthatching week which parallels the observations made in the MNCV measurement and supports an ongoing maturation of sensory fibers.

In consideration of the difficulties to record a cord dorsum potential there is so far no possibility to assess the function of the sensory nerve root of a defined segment. In contrast, high resolution spinal magnetic stimulation proved successful in evoking compound muscle action potential upon stimulation of lumbosacral motor nerve roots. To our knowledge,

magnetic stimulation has not yet been described in chickens. For the whole duration of general isoflurane anesthesia potentials were obtainable and did not show attenuation.

The penetration depth of the focal butterfly coil is obviously sufficient to elicit a maximal potential in chickens and the output of the magnetic stimulation was not even maxed out. The bony landmarks described above facilitated proper coil position. Attempts to evoke motor potentials by stimulating descending motor fibers at thoracic level and after rhizotomy at the intervertebral foramen (Figure 4) narrows the receptive area to the lower motor neuron in terms of either the nerve cell body in the ventral horn, the intramedullary fibers or the flexuous initial segments of the intraspinal nerve roots before or directly at their emerging from the exit zone of the intervertebral foramen. Additionally, direct stimulation of the muscle was excluded by the abolishment of any CMAP after rhizotomy. Therefore, spinal magnetic stimulation is excellently suitable for testing conductance in the most proximal parts of the motor nerve roots which is particularly relevant in radiculoneuropathies that present with a proximo-distal gradient, like in GBS-related diseases. Certainly, this demands a standardized setting which especially applies for keeping the coil-nerve relationship constant since minimal deviations of its position and the stimulation angle and distance immediately results in CMAP changes.

In each individual chicken we tested various filter settings and different duration of pulses. The stimulus intensity was increased stepwise until supramaximal stimulation was ensured. Our results indicate that a stimulus intensity of 65% resulted in supramaximal amplitudes which was confirmed by a comparison of the magnetically evoked CMAPs with that of the electrically elicited ones. In humans, paravertebral magnetic stimulation has been demonstrated to be a reliable method of stimulating the proximal segments of peripheral nerves (Bischoff et al. 1993; Britton et al. 1990; Chokroverty et al. 1989). However, compared to electrical high-voltage stimulation of nerve roots it has the disadvantage that even by using 100% stimulus intensity maximal responses can not be elicited (Chokroverty et al. 1993). In chickens, maximal potentials were achieved using a stimulation intensity of just about 55% already which may be explained by the smaller body size and the lower thickness of the underlying musculature in comparison to humans.

In line with electrical motor nerve stimulation, the amplitude parameters showed no significant age-dependent variations. Hence, at 6 weeks chicken motor nerves have reached the maximal number of recruited motor nerve fibers. In contrast, there was a significant increase in onset latency which may be due to the rising leg length. Onset latency is not suitable to determine the MNCV appropriately as it includes not only the actual conduction

time but also a significant synaptic delay time at the neuromuscular junction, and conduction time along the innervated muscle fibers (Robinson and Snyder-Mackler 2007). However, the ratio of the leg length to the onset latency was also consistently increasing (data not shown) and therefore mirrored the rising velocity of motor nerve fiber conduction.

In a set of PNS diseases the distinction and separate assessment of proximal and distal nerve conductance impairment is of diagnostic relevance. Therefore, we modified methods to evoke CAMP due to electrical tibial/sciatic nerve stimulation in the chickens. In particular, CMAPs evoked by electrical proximal and distal nerve stimulation can help to uncover partial nerve blocks as described for the acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in which demyelination starts in the nerve roots and subsequently proceeds distally (Uncini and Yuki 2009). Combined evaluation of CMAPs and MNCV can further help to narrow the character of a neuropathy in terms of demyelination as compared to axonal degeneration. However, a proof for nerve root involvement can not be established as F waves were not recordable from the GM. This was probably due to the short distance between distal stimulation, spinal cord and recording site that may have lead to an absorption of late responses by the preceding motor potentials. Therefore, we were able to establish cranial SSEPs and sMS for proximal assessment of sensory and motor nerve conduction in chickens. Compared to proximal electrical stimulation the far more proximal parts of the lumbosacral nerve roots could be activated by sMS which was proven by rhizotomy and the fact that the onset latencies lasted in average 0.3 to 0.4 ms longer. Therefore, sMS offers a valuable tool to assess motor nerve root function in chickens. Advantages of the sMS are certainly its relative painlessness, the fact that it is not invasive, its easy handling and reproducibility. However, sMS provides an insight into the conductance of motor nerve fibers only and central signal propagation is not featured. Reading of SSEPs, on the other hand, is able to complement motor nerve data by centripetal conduction properties of sensory afferents and central nervous impulse conveyance. An alteration of cranial SSEP parameters in terms of prolongation or lack of the latencies is supposed to identify a sensory dysfunction. Now, further studies in neurologically affected chickens are required to assess the value of this electrophysiological tool set. However, we propose that these methods will be of great benefit in characterizing clinical courses of GBS-like polyradiculoneuropathies such as AvIDP (Bader et al.) or classical Marek's disease (PePOSE et al. 1981; Stevens et al. 1981) in long term examinations.

**Abbreviations**

Avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AVIDP); Guillain-Barré syndrome (GBS); gastrocnemius muscle (GM); cord dorsum potential (CDP); compound muscle action potential (CMAP); motor nerve conduction velocity (MNCV); spinal magnetic stimulation (SMS); somatosensory evoked potential (SSEP); somatosensory velocity (SSV); tibial nerve (TN).

## 4 Diskussion

Bereits seit einiger Zeit wird ein paretisches Syndrom in Weißen Leghorn-Hühnern beschrieben, das klinisch und histopathologisch der Marekschen Krankheit ähnelt, aber auch an inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathien des Menschen und anderer Säugetiere erinnert (Bacon et al. 2001; Julian 1992). Schwerpunkt dieser Studie war die histo- und immunpathologische Charakterisierung dieser bisher unter dem Namen „Periphere Neuropathie“ beschriebenen Erkrankung. Zudem wurde der vermutete Zusammenhang der Erkrankung mit bestimmten genetischen Suszeptibilitätsfaktoren genauer untersucht. Ziel war zum einen die Abgrenzung zur MD sowie zum anderen ein Vergleich mit den inflammatorischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathien (IDP) des Menschen mit Hinblick auf eine mögliche Etablierung dieser Erkrankung als Tiermodell z. B. für die translationale Forschung (Artikel 1). Um Letzteres voran zu treiben, ist es notwendig, neben der (Immun-)Pathogenese auch den klinischen Verlauf der Erkrankung zu untersuchen. Hierfür mussten Methoden entwickelt werden, die eine quantifizierbare Darstellung im Rahmen von Langzeituntersuchungen erlauben. Die Wahl fiel auf die Nutzung der Elektrophysiologie, wobei es gelang eine Auswahl an verschiedenen Methoden zur Beurteilung sowohl sensibler als auch motorischer Nervenfasern des Huhnes zu etablieren (Artikel 2). Eine Langzeitüberwachung erkrankter Hühner mittels eben dieser Methoden konnte ebenfalls bereits erfolgreich durchgeführt werden, wobei die Daten jedoch nicht mehr Teil dieser Dissertation sind.

## **4.1 AvIDP – eine eigene Entität?**

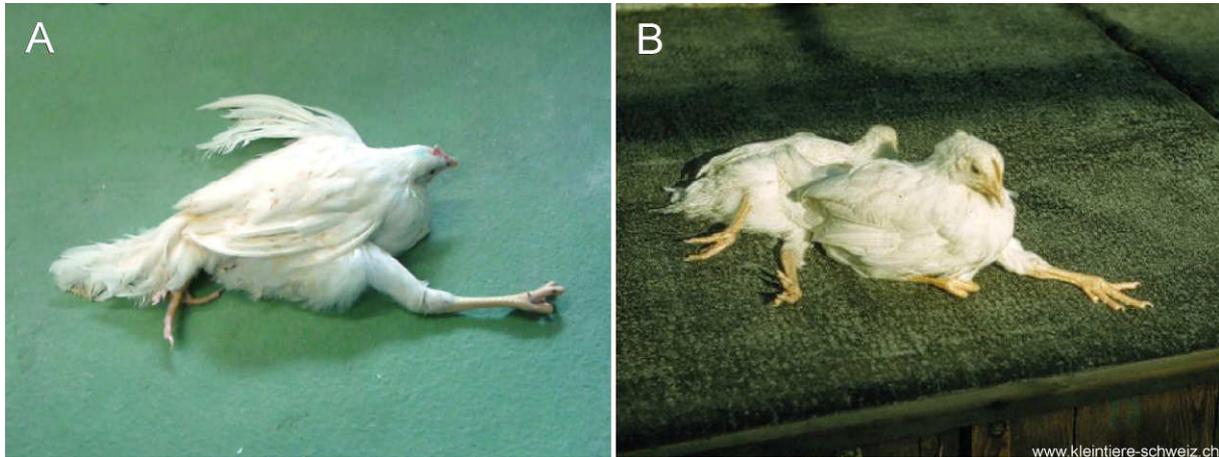
### **4.1.1 Entscheidungskriterien zur Umbenennung der „Peripheren Neuropathie“ in „Aviäre Inflammatorische Demyelinisierende Polyradikuloneuropathie“ (AvIDP)**

Im Rahmen der morphologischen und immunpathologischen Untersuchungen fanden sich deutliche Parallelen zwischen der vormals als „Periphere Neuropathie“ bezeichneten Erkrankung der Weißen Leghorn-Hühner und den inflammatorischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathien der Säugetiere und des Menschen. Da der Begriff „Periphere Neuropathie“ sehr unspezifisch ist und weder Klinik noch Pathologie oder auch Pathogenese der Krankheit widerspiegelt, sollte PN durch einen systematischen Terminus ersetzt werden. Dabei bietet sich aufgrund der Ähnlichkeit zu den IDPs der Säugetiere die Bezeichnung „Aviäre Inflammatorische Demyelinisierende Polyradikuloneuropathie“ oder AvIDP an, der im Titel dieser Doktorarbeit und in den Überschriften vorweg genommen wurde. Der Analogieschluss, dass es sich bei AvIDP und PN um eine einheitliche Erkrankung handelt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nicht mit endgültiger Sicherheit geführt werden, da getrennte Kollektive mit unterschiedlichen Methoden untersucht wurden. Die dargestellte Pathologie der PN gleicht der AvIDP jedoch sehr weitgehend. Die schwächere Gewichtung der Myelinscheidenpathologie in den bisherigen Studien zur PN ist den unterschiedlichen Untersuchungsschwerpunkt zuzuschreiben und begründet sich außerdem in dem Fehlen von Untersuchungen an geteasten Nervenfasern, die einen weitaus detaillierteren Einblick in die Feinstruktur des kompaktierten Myelins liefern. Ein Vergleich zum humanen GBS wurde allerdings auch schon von den Untersuchern der PN gezogen (Bacon et al. 2001).

### **4.1.2 Wie äußert sich eine demyelinisierende Polyradikuloneuropathie beim Haushuhn klinisch?**

Klinisch fallen bei der AvIDP zunächst Inkoordination und Ataxie sowie einer gestörte bewusste Propriozeption auf. Ob Hühner zudem Parästhesien oder andere Missempfindungen verspüren, wie es für die AIDP des Menschen beschrieben wird (Cosi and Versino 2006), konnte bisher nicht bewiesen werden. Allerdings weisen eigene Beobachtungen von auffälligem Selbstbepicken vor allem der Hintergliedmaßen in einigen Tieren darauf hin. Mit fortschreitendem Verlauf zeigten die erkrankten Tiere asymmetrische bis symmetrische Paresen der Hintergliedmaßen und Flügeln, was in besonders schweren Fällen zu einem

vollständigen Festliegen der Hühner führte (Abbildung 3 A). Klinisch unterscheidet sich die AvIDP somit nicht von der klassischen Form der MD (Abbildung 3 B).



**Abbildung 3** Klinisches Bild der von AvIDP (A) beziehungsweise MD (B) betroffenen Hühnern.

In beiden Erkrankungen zeigen die Hühner fortschreitende Paresen bis Paralysen der Ständer und ein Hängen der Flügel.

#### 4.1.3 Typische makroskopische Erkennungsmerkmale der AvIDP

Makroskopisch fiel bei allen an AvIDP-erkrankten Hühnern eine diffuse Vergrößerung der spinalen Nervenwurzeln – inklusive der Dorsalwurzelganglien – zusammen mit einer deutlichen Ödematisierung und einem Verlust der Fontana-Bänderung auf. Im wechselnden Maße zeigten sich auch die spinalen und kranialen Nerven in ihrem Verlauf von dieser Veränderung betroffen, wobei die Verdickungen hier meist multifokal auftraten. Vor allem der ebenfalls häufig betroffene autonome Nervus (N.) vagus wies dadurch ein unregelmäßig knotiges Aussehen auf. Somit zeigte die AvIDP ein stets sehr gleichförmig auftretendes, jedoch unspezifisches makropathologisches Bild wie es auch in anderen peripheren Neuropathien wie der klassischen Form der Marekschen Krankheit beschrieben wird (Goodchild 1969). Eine Vergrößerung der peripheren Nerven und teils auch der spinalen Nervenwurzeln beim Haushuhn wurde unter anderem auch in Fällen von Retikuloendotheliose (Taniguchi et al. 1977), natürlich auftretenden und experimentell induzierten Perineuriomen (Ochi et al. 2008; Toyoda et al. 2005), schwerem Riboflavinmangel (Phillips and Engel 1938a; b), der Idiopathischen Polyneuritis bei SPF-Hühnern (Biggs et al. 1982) und bei durch *Toxoplasma gondii* bedingter Neuropathie (Goodwin et al. 1994) beobachtet.

#### 4.1.4 Histologische Charakteristika der AvIDP

Wie der Name schon anzeigt, ist die AvIDP durch multifokale primäre Demyelinisierungen peripherer Nervenfasern sowie entzündliche, lymphohistiozytäre und plasmazelluläre Infiltrate gekennzeichnet. Ganz deutlich ist eine Prädilektion für die kraniospinalen Nervenwurzeln inklusive und insbesondere der Dorsalwurzelganglien zu erkennen, wobei die Veränderungen mit einem proximodistalen Gradienten fortzuschreiten scheinen. In den Anfangsstadien kann akuter Myelinscheidenzerfall festgestellt werden, wobei phagozytierter Myelindebris in Schwannzellen und Makrophagen beobachtet werden kann. Die nackten Axone sind von einer deutlich verbreiterten endoneuralen Kollagenscheide umgeben, die neben dem häufig hinzukommenden endoneuralen Ödem einer der Hauptgründe der extensiven makroskopischen Vergrößerung der peripheren Nerven zu sein scheint. Der reparative Vorgang der Remyelinisierung stellte sich durch inadäquat dünn myelinisierte Fasern dar, die typischerweise umgeben sind von hypertrophen und proliferierenden Schwannzellen. Die Remyelinisierungen geben Hinweise darauf, dass es sich bei den Nervenveränderungen der AvIDP um reversible Läsionen handelt. Auch die Tatsache, dass nur die Myelinlamellen von den Veränderungen betroffen waren, die Schwannzellen an sich jedoch keinerlei Anzeichen der Degeneration aufwiesen, lässt die Möglichkeit der teilweisen oder sogar vollständigen Regeneration der Myelinscheiden offen.

Bei AvIDP-erkrankten Tieren, die erst nach einem längeren Krankheitsgeschehen euthanasiert worden waren, konnte die Ausbildung von *Onion Bulbs* aus multiplen Lagen von Schwanzzellfortsätzen und Fibroblasten festgestellt werden. Klassischer Weise werden *Onion Bulbs* als unspezifische Antwort auf sich mehrfach wiederholende De- und Remyelinisierungen gedeutet (Dyck et al. 1984). Mehrmaliges Auftreten von segmentaler Demyelinisierung führt zu einer Proliferation von Schwannzellen, bei der sich für gewöhnlich im Folgenden zytoplasmatische Schwanzzellprozesse um die zentrale Nervenfasern wickeln. Nach ihrem genauen Aufbau in EM und Lichtmikroskop unterscheidet man mindestens vier, vermutlich sogar fünf Formen von *Onion Bulbs* bzw. *Pseudo-Onion-Bulbs*: (1) vor allem aus Schwannzellen bestehend bei hereditären motorischen und sensiblen Neuropathien des Menschen (Reilly 2007); (2) hauptsächlich Schwannzellen, aktivierte Makrophagen und wenige Fibroblasten bei humanen inflammatorischen Neuropathien (Hughes et al. 2006; Krendel et al. 1989); (3) vornehmlich perineurale und wenige Schwannzellen bei Perineuriomen (von einigen Autoren ebenfalls als *Pseudo-Onion-Bulbs* bezeichnet) (Heilbrun et al. 2001; Rankine et al. 2004) – wie sie auch beim Huhn sowohl nach experimenteller

Induktion durch aviäre Leukoseviren der Subgruppe A (Toyoda et al. 2005) als auch spontan auftreten (Ochi et al. 2008) – und traumatischen Amputationsneuromen (Chou 1992); (4) ausschließlich perineurale Zellen bei hamartomen Perineuriomen, die assoziiert sind mit Neurofibromen (Chou 1992) sowie (5) ausschließlich aus Fibroblasten bestehend in der durch Riboflavin-Mangel bedingten peripheren Neuropathie in Hühnern (Cai et al. 2009).

Eine genaue Betrachtung der bei der AvIDP auftretenden *Onion Bulbs* mittels der Transmissionselektronenmikroskopie offenbarte eine Beteiligung von hauptsächlich Schwannzellen sowie Fibroblasten und einigen Makrophagen. Damit gleichen sie den *Onion Bulbs* der hier unter (2) aufgeführte Form, die im Zusammenhang mit inflammatorischen Neuropathien des Menschen beschrieben werden, wobei das Auftreten dieser Gebilde insbesondere bei der Bestimmung der humanen CIDP als diagnostisches Kriterium gilt (Hughes et al. 2006; Krendel et al. 1989). Bei der AvIDP könnte das Vorkommen der *Onion Bulbs* demnach ebenfalls auf einen chronischen, eventuell mit Rückfällen einhergehenden Verlauf der Erkrankung hinweisen.

Durch eine eingehende Untersuchung der Nervenläsionen mittels der Transmissionselektronenmikroskopie konnte dargestellt werden, dass Makrophagen mit ihren Fortsätzen die Basalmembran und das äußere Mesaxon der Schwannzellen durchbrachen. Im Folgenden drängten sie sich zwischen die paranodalen Schleifen und Schmidt-Lanterman-Kerben, schoben ihre Fortsätze in die *Intraperiod Line* zwischen die einzelnen Lamellen des kompakten Myelins und phagozytieren es anschließend, so dass vollständig demyelinisierte, aber unversehrte Axone zurückblieben. Die Invasion von scheinbar normalen Myelinscheiden durch Makrophagen lässt sich auch bei den demyelinisierenden Prozessen der AIDP und CIDP des Menschen beobachten und ist in der englischen Fachliteratur unter dem Begriff *Macrophage-mediated Myelin Stripping* zu finden (Prineas 1972; 1971; 1981). Die genauen Mechanismen, die zu dieser gezielten Myelinattacke führen, sind bisher unbekannt. In der AIDP des Menschen wird vermutet, dass zumindest bei einigen der Patienten Autoantikörper eine Rolle spielen und auch das Komplementsystem zu einem gewissen Grad beteiligt ist, da gelegentlich Membran-Angriffs-Komplexe in Myelininternodien beobachtet werden konnten (Hafer-Macko et al. 1996b; Koski 1990; 1987; Koski et al. 1987). Ob die Makrophageninvasion morphologisch intakter Myelinscheiden allerdings tatsächlich der Hauptmechanismus der Demyelinisierungen ist, wie von Prineas für die AIDP und von Lampert für die EAN (Lampert et al. 1977b) vorgeschlagen, steht bisher offen. Die bloße Anwesenheit aktivierter Makrophagen innerhalb des Endoneuriums scheint zudem nicht

auszureichen, wie experimentell induzierte, unspezifische Reaktionen in Nerven zeigten, die nicht das Maß an Demyelinisierungen aufwiesen, wie es in der EAN oder der AIDP beobachtet werden kann (Powell et al. 1984; Powell and Hughes 1987; Redford et al. 1995). Die übliche Erklärung wird darin gegeben, dass gegen oberflächenspezifische Epitope gerichtete Antikörper Schwannzellen opsonieren und damit die Makrophagen zu ihrem Ziel leiten. Allerdings erklärt diese Theorie nicht, wieso es zu derart ausgeprägten Demyelinisierungen bei der T-Zell-medierten AT-EAN kommt. Eine Überlegung hierfür besteht darin, dass autoreaktive T-Helfer-Zellen direkt auf Makrophagen wirken und die Demyelinisierungen durch eine Freisetzung entsprechender Makrophagen-aktivierender Chemokine auslösen (Hughes et al. 1999).

#### **4.1.5 Immunbiologie der AvIDP**

Im Falle der AvIDP gab es deutliche Hinweise auf eine Beteiligung beider Komponenten des adaptiven Immunsystems – sowohl des Zell-vermittelten als auch des humoralen.

##### *4.1.5.1 Zell-vermittelte Immunantwort*

Mittels immunhistochemischer und durchflusszytometrischer Untersuchungen von betroffenen peripheren Nerven und Nervenwurzeln samt Dorsalwurzelganglien wurde eine signifikante Anzahl von  $\alpha\beta$ -T-Zellen nachgewiesen, die sich sowohl aus T-Helfer-Zellen als auch aus zytotoxischen T-Zellen zusammensetzte. Genexpressionsanalysen bestätigten die Beteiligung von CD3-positiven Zellen und ergaben zudem eine – verglichen mit gesunden Kontrollennerven – signifikante Hochregulierung der  $\text{IFN}\gamma$ -mRNA bei einer gleich bleibenden Menge an IL-13 mRNA.  $\text{IFN}\gamma$  wird, wie beim Säugetier, auch beim Huhn von TH1-Zellen sezerniert (Degen et al. 2005; Lambrecht et al. 1999) und kann Makrophagen aktivieren, die wiederum für gewöhnlich mit einer Induktion der iNOS reagieren (Lowenthal et al. 1995). Die mRNA-Expression der iNOS in den Spinalganglien AvIDP-erkrankter Tiere war nicht signifikant erhöht, was gegen eine Aktivierung der Makrophagen spricht. Dennoch wurde mit der Hochregulierung der  $\text{IFN}\gamma$ -mRNA ein deutlicher Hinweis auf eine TH1-medierte Immunantwort gegeben (Degen et al. 2005). TH1-medierte Immunantworten beim Huhn werden wie bei den Säugetieren mit entzündlichen zytolytischen Immunantworten unter anderem bei Virusinfektionen in Verbindung gebracht (Degen et al. 2005). Die eventuelle Beteiligung einer viralen Komponente soll später eingehender diskutiert werden (Abschnitt 4.1.5). Des Weiteren wurden TH1-medierte Immunantworten auch in der akuten Phase der EAN sowie in den Anfangsstadien der AIDP beobachtet (Jander and Stoll 2001; Zhu et al.

1994), was zusätzlich die Ähnlichkeit zwischen der Erkrankung des Huhns und der des Menschen unterstreicht.

#### 4.1.5.2 *Humorale Immunantwort*

Neben den genannten Anzeichen einer zellulären Immunantwort wurden weiterhin deutliche Hinweise auf eine simultane Aktivierung von humoralen Effektormechanismen gefunden. Bereits morphologisch konnte eine hohe Dichte endoneuraler Plasmazellen beobachtet werden. Immunhistochemisch erfolgte zudem der Nachweis einer im Vergleich zum T-Zell-Anteil gleichstarken Beteiligung von B-Zellen an den perivaskulär zu beobachtenden Lymphozyteninfiltraten sowie von IgG-Ablagerungen auf den Myelinscheiden. Die hohen mRNA-Mengen von *chB6* (*Bu-1*) und *Blimp-1* (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) bestätigten die Aktivierung von B- beziehungsweise Plasmazellen und bekräftigte die bereits durch die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung entstandene Vermutung, dass der humorale Signalweg in dem in dieser Studie untersuchten Stadium der AvIDP überwiegt. Allerdings legt die erhöhte mRNA-Expression von *IL-10* die Vermutung nahe, dass es sich dabei nicht um eine primäre, sondern um eine TH2-Zell-abhängige humorale Antwort handelt (Rothwell et al. 2004). Ein eher überraschendes Resultat war, dass trotz der Hinweise auf eine vorherrschend humorale Komponente die Expression von *IL-13*, das beim Huhn als sensitiver TH2-Marker gilt (Degen et al. 2005), nicht signifikant erhöht war. Möglicher Weise lässt sich dies jedoch mit dem Stadium der AvIDP zum Untersuchungszeitpunkt erklären (s. 4.1.5.3).

Die erhöhte mRNA-Expression des anti-inflammatorischen *IL-10* deutet darauf hin, dass es zu einer Herabregulierung der Immunantwort kommt, was sich mit der Beobachtung deckt, dass es bei erkrankten Hühnern zu einer Rückbildung der paretischen Symptome kommen kann (eigene unveröffentlichte Beobachtungen sowie persönliche Kommunikation mit Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven). Dies wird auch dadurch bestätigt, dass die Interleukine *IL-1* und *IL-6*, die typischer Weise bei akuten, entzündlichen Reaktionen zu finden sind (Heinrich et al. 1990; Prowse and Baumann 1989), keine signifikante Erhöhung aufzeigten. Obwohl also ein deutlicher Anstieg an *IFN $\gamma$*  nachgewiesen wurde, scheint es zu keiner Differenzierung der Makrophagen in inflammatorische Makrophagen gekommen zu sein, die zusätzlich zu einem erhöhten *IL-1*- und *IL-6*-Vorkommen auch zu einer Zunahme der *iNOS* geführt hätten (Teng et al. 2002).

#### 4.1.5.3 *Übergang einer TH1- zu einer TH2-medierten Phase?*

In Anlehnung an die jüngsten Erkenntnisse bezüglich der AIDP des Menschen und GBS-Modellen an Labortieren kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die in diese Studie eingeschlossenen Hühner sich zum Zeitpunkt der Untersuchungen in einem Krankheitsstadium befanden, in dem die vermutlich in der Anfangsphase vorherrschende TH1-Phase gerade im Begriff war in eine TH2-medierte Phase überzugehen. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse scheint es sehr wahrscheinlich, dass das Auftreten der neurologischen Defizite mit einer späten TH1-Phase beziehungsweise dem Übergang einer TH1- zu einer TH2-medierten Phase zusammenfällt. Dies wiederum würde bedeuten, dass der Krankheitsverlauf eine längere präklinische Periode beinhaltet, die jedoch wegen des spontanen Auftretens der AvIDP und ihrer verhältnismäßig niedrigen Inzidenz (bis zu 3 pro 100 Tiere) nur sehr schwer in präparetischen Tieren festzustellen sein wird.

Um zu klären, ob es, wie bereits oben angesprochen, tatsächlich zu einer unter anderem durch IL-10 induzierten Herabregulierung der Immunreaktion mit dadurch bedingter klinischer Besserung der Tiere kommt, sind Langzeitstudien nötig. Diese können Auskunft darüber geben, ob es sich bei der AvIDP wie bei der AIDP um einen akuten, monophasischen Krankheitsverlauf handelt oder ob es vielmehr ein chronischer Prozess mit akutem Auftritt ist, der sich im Folgenden progressiv, stagnierend oder sogar remittierend-relapsierend, wie typischer Weise bei der CIDP des Menschen zu beobachten ist, entwickelt. Zur Wegbereitung einer solchen Langzeitstudie wurden im zweiten Teil unserer Untersuchungen elektrodiagnostische Methoden etabliert und physiologische Referenzwerte erarbeitet (s. 4.2).

#### **4.1.6 Spezifisches Verteilungsmuster der Entzündung: Autoantikörper und Blut-Nerven-Schranke**

Bisher konnten sowohl bei den verschiedenen Subtypen des GBS als auch in der CIDP des Menschen verschiedene Autoantikörper nachgewiesen werden, die gegen Myelinproteine oder Ganglioside peripherer Nerven gerichtet sind. Das Auftreten von Autoantikörper gegen die Myelinproteine P0, P2 und PMP-22 ist sowohl im Zusammenhang mit der AIDP als auch mit der CIDP des Menschen beschrieben worden (Gabriel et al. 2000; Inglis et al. 2007). P0, P2 und PMP-22 sind –zumindest bei Säugetieren und Mensch – gleichmäßig im PNS verteilt. Wären sie die Ziele einer autoimmunen Attacke, würde das demnach weder den proximodistalen Gradienten der entzündlichen Demyelinisierungen noch die Tatsache, dass

bestimmte Nerven wie z. B. die Äste des N. trigeminus stärker als andere betroffen sind, erklären. Anders verhält es sich bei der Gangliosidkomposition, deren Zusammensetzung zwischen verschiedenen kranialen Nerven variiert (Chiba et al. 1997). So ist für das GBS und die CIDP in Menschen sowie in entsprechenden Tiermodellen in Labortieren beschrieben worden, dass das Vorkommen bestimmter Anti-Gangliosid-Antikörper das Auftreten eines spezifischen klinischen Phänotypen bedingen können (Kaida et al. 2009; Yoshino et al. 2000). Ein typisches Beispiel hierfür ist die Beteiligung des N. oculomotorius als charakteristisches Merkmal beim Miller-Fisher-Syndrom ebenso wie bei GBS mit Ophthalmoplegie, die assoziiert ist mit Antikörpern gegen das Gangliosid GQ1b, welches besonders reichlich im 3. Hirnnerv vorhanden ist (Chiba et al. 1997; Willison 2006). Die Bindungsstellen der in AvIDP nachgewiesenen Autoantikörper müssen noch identifiziert werden, doch spricht die erhebliche Beteiligung der Hirnnerven III und V dafür, dass auch hier spezifisch auftretende aviäre Ganglioside die Zielmoleküle der Immunattacken darstellen könnten – auch wenn es sich beim MFS und dem GBS mit Ophthalmoplegie um axonale Geschehen handelt (Fross and Daube 1987; Willison and Yuki 2002).

Analog zu Beschreibungen bei EAN-Modellen wies der Hauptanteil der beteiligten T-Zellen  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren auf (Hadden and Gregson 2001). Die Beteiligung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde ebenfalls im Zusammenhang mit IDPs bei Menschen beschrieben, bei denen sie als Indikator für ein Nicht-Peptid-Antigen als Auslöser für Autoimmunattacken gedeutet werden (Allison and Garboczi 2002; Winer et al. 2002). Auch bei der AvIDP konnte ein Auftreten von mindestens 10 %  $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden, doch muss dies mit Vorsicht gedeutet werden, da diese T-Zellpopulation unter physiologischen Bedingungen bei Hühnern einen Anteil von 20 bis 50 % des zirkulierenden T-Zell-Vorkommens stellt (Bridle et al. 2006). Beim Menschen dagegen machen die  $\gamma\delta$ -T-Zellen nur einen Prozentsatz von 1 bis 15 % der peripheren Blutlymphozyten aus (Robak et al. 2001).

Die in der AvIDP beobachtete Ausbreitung der Entzündung entlang eines proximodistalen Gefälles wird auch im Zusammenhang mit der AIDP sowie CIDP des Menschen beschrieben (Albers et al. 1985), wobei eine Ursache in dem Aufbau der Blut-Nerven-Schranke vermutet wird. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass das PNS ähnlich dem ZNS durch eine Blut-Gewebe-Schranke, der so genannten Blut-Nerven-Schranke, von zirkulierenden Makromolekülen abgegrenzt ist. Traditioneller Weise als „immunprivilegiertes“ Organsystem angesehen, musste dieses Konzept der Immunphysiologie in den letzten Jahren revidiert werden, nachdem bekannt wurde, dass zirkulierende Lymphozyten in das und aus dem PNS

wandern können. Zudem weisen die peripheren Nerven immunologisch relevante ortsansässige Zellen wie Makrophagen, Mastzellen sowie endoneurale kapillare Endothelzellen auf. Der Begriff „Blut-Nerven-Schranke“ selbst bezieht sich vor allem auf die geringe Eiweißpermeabilität des endoneuralen Endothels. Aufrechterhalten wird die Schranke durch *Tight Junctions* und spezielle Eigenschaften der Endothelzellen. Nur in den am weitesten proximal gelegenen Bereichen und den distalen terminalen Nervenendigungen wird sie instabiler und damit durchlässiger und fehlt in den Dorsalwurzelganglien schließlich vollständig, was diese Regionen weitaus anfälliger für schädliche Insulte wie Entzündungen macht als den restlichen Verlauf der peripheren Nerven. Dies könnte also eine Erklärung für die besondere Beteiligung der Nervenwurzeln inklusive der Dorsalwurzelganglien bei einer Erkrankung mit AvIDP bieten.

Eine pathologische Proteindurchlässigkeit wiederum kann durch die Durchquerung von Zellen oder Vesikeln entstehen. Die Passage der T-Zellen in das Endoneurium ist kontrolliert durch Interaktionen zwischen den Familien der Zelladhäsionsmoleküle auf dem Endothel und den Integrinen auf den T-Zellmembranen. So wurde für das GBS beschrieben, dass nach einer Endothelzellaktivierung die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle hochreguliert wird, von denen einige wie z. B. die E-Selektine lösliche Fragmente in den Blutfluss abgeben und damit die Zielsuche und Anhaftung der T-Zellen am Endothel anregen (Hartung et al. 1994). Eine Theorie im Rahmen der GBS-Forschung ist, dass solchermaßen aktivierte T-Zellen, unabhängig von ihrer Spezifität, die Blut-Nerven-Schranke kreuzen können. T-Zellen, die ein Antigen im Endoneurium erkennen, werden weitergehend aktiviert und bilden Zytokine und Chemokine, die schließlich zu einem Zusammenbruch der Schranke führen. Antikörper, die normalerweise keinen Zugang zu endoneuralen Bereichen haben, können nach dem Niederbruch der Blut-Nerven-Barriere ungehemmt ins Endoneurium vordringen. Diejenigen, die Zelloberflächenmoleküle erkennen, heften an diese an und lösen die Komplementkaskade aus oder opsonieren Schwannzellen oder Axolemm, an die im Folgenden Makrophagen über Fc-Rezeptoren andocken und so zu der Kaskade pathologischer Ereignisse führen, wie sie in AIDP oder AMAN beobachtet werden (Hughes et al. 1999). Da im Rahmen unserer Untersuchungen unter anderem T-Zellen sowie Autoantikörper innerhalb des Endoneuriums gefunden wurden, ist diese Theorie durchaus auch für die AvIDP denkbar. Der Niederbruch der Blut-Nerven-Schranke bzw. das Fehlen einer solchen im Bereich der Dorsalwurzelganglien könnte zudem die Erklärung dafür bieten, dass die Ergebnisse der diskriminierenden PCR auf das MDV-Impfvirus bei erkrankten Tieren positiv ausfielen (s. auch Abschnitt 4.1.5.2).

#### 4.1.7 Überlegungen zur Ätiologie

Bis jetzt ist die Ätiologie der AvIDP immer noch ungeklärt. Mit dem Auftreten der GBS werden eine ganze Reihe von vorausgehenden Ereignissen assoziiert, die von viralen, bakteriellen und Mykoplasmen-Infektionen bis zu operativen Eingriffen, Impfungen, Fieberbehandlungen und anderen physischen Belastungen reichen (Arnason 1975; Hadden et al. 2001). Bei unserer Studie stammten sowohl die erkrankten als auch die gesunden Tiere aus derselben Herde und waren somit dem identischen Milieu hinsichtlich der Fütterung, der Haltung und der Exposition zu eventuellen Umweltpathogenen ausgesetzt. Die Hühner unterlagen alle einem permanenten Infektionsdruck, der in Legehennenbetrieben im Allgemeinen durch ein straffes Infektionsmanagement und Mehrfachimpfungen kontrolliert wird. Es ist daher durchaus denkbar, dass auch bei der AvIDP – wie für das GBS oder die EAN beschrieben – eine Assoziation zwischen einer vorausgehenden Infektion oder Impfung und der Krankheitsentwicklung besteht. Dies wird noch unterstützt durch die Tatsache, dass bei SPF-Tieren des gleichen genetischen Hintergrundes bisher keine Erkrankungsfälle von AvIDP aufgetreten sind.

##### 4.1.7.1 Molekulare Mimikry

Molekulare Mimikry zwischen mikrobiellen Antigenen und körpereigenen Geweben ist ein seit langem diskutierter, hypothetischer Mechanismus, durch den Autoimmunerkrankungen infolge vorausgehender Infektionen ausgelöst werden sollen (Albert and Inman 1999; Blank et al. 2007; Rowley and Jenkin 1962). Die Mimikry-Hypothese besagt, dass durch eine Infektion Autoantikörper und/oder autoreaktive T-Zellen induziert werden, die anfangs gegen mikrobielle Antigene gerichtet waren. Auf Grund einer Strukturähnlichkeit zwischen mikrobiellen und bestimmten körpereigenen Antigenen zerstören die Antikörper und/oder T-Zellen jedoch nicht nur das eingedrungene Pathogen sondern richten sich auch im Sinne einer Autoimmunattacke gegen körpereigenes Gewebe (Albert and Inman 1999). Weiterhin können die Infektionen auch durch unspezifische Mechanismen zur Aktivierung autoreaktiver Immunzellen führen (Behar and Porcelli 1995). Damit bietet diese Theorie eine attraktive Erklärung für die Verbindung zwischen der physiologischen Immunantwort gegen Infektionen und einem immunpathologischen Prozess im Sinne einer autoimmunen Reaktion.

Beim GBS wird der Mechanismus der molekularen Mimikry seit langem diskutiert (Hadden et al. 2001; Lampert et al. 1977a). Die Mimikry-Hypothese konnte zudem für die GBS-Fälle, denen eine *Campylobacter jejuni*-Infektion vorausgegangen war, untermauert werden. Mit der

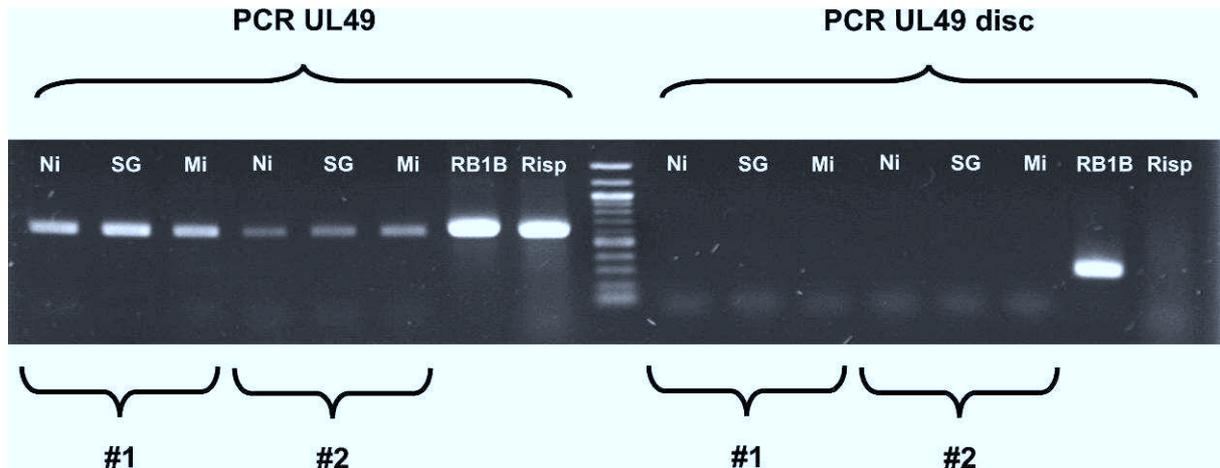
vollständigen Entschlüsselung des Genoms von *C. jejuni* wurde es möglich, neuropathogene Virulenzstrukturen zu identifizieren (Parkhill et al. 2000). Serologische und biochemische Studien konnten darstellen, dass die Lipooligosaccharide (LOS) der äußeren Zellwand der Gram-negativen Bakterien Strukturen enthalten, die mit denen von Gangliosiden übereinstimmen (Yuki et al. 1993; Yuki et al. 1994). Tatsächlich reagieren IgG-, IgM- und IgA-Anti-Gangliosid-Antikörper von GBS-Patienten mit den LOS von *C. jejuni*, was wiederum Anlass für die Vermutung gibt, dass diese Antikörper ursprünglich durch eine Infektion mit *C. jejuni* induziert wurden (Willison and Yuki 2002). Einige der Bakterienstämme, die mit dem Auftreten spezifischer Gene der LOS-Biosynthese assoziiert sind, scheinen ein weitaus höheres Potential zu haben, neurologische Komplikationen auszulösen (van Belkum et al. 2001). Dafür spricht auch die Tatsache, dass im Serum von Patienten mit einer unkomplizierten *Campylobacter*-Enteritis keine hohen Titer kreuzreaktiver Anti-Gangliosid- und LOS-Antikörper gefunden werden konnten (Ang et al. 2002). Auch bei der AvIDP ist die Idee der molekularen Mimikry als Erklärung für die autoimmune Reaktion ein reizvoller Gedanke. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen eine Infektion zu identifizieren, die den neurologischen Symptomen vorausgeht und mit ihnen in irgendeiner Form assoziiert zu sein scheint. Auch die genauen Zielstrukturen der gegen die Myelinscheide gerichteten Autoantikörper konnten noch nicht entschlüsselt werden, so dass es auch nicht möglich ist, indirekt Rückschlüsse auf die möglichen auslösenden Erreger oder exogenen Substanzen zu ziehen. Die Identifikation der Zielepitope der Autoantikörper wird sicherlich einer der nächsten Schritte in Folgestudien sein.

#### 4.1.7.2 Abgrenzung zur Marekschen Krankheit

Ausbrüche von viralen, bakteriellen und Mykoplasmen-Infektionen werden im Allgemeinen durch strenge Impfprogramme und eine strikte Gesundheitsüberwachung verhindert. Die verblüffenden klinischen, makro- und histopathologischen Ähnlichkeiten der AvIDP zu der klassischen Form der MD lassen dennoch den Verdacht aufkommen, dass das galline Herpesvirus in bisher noch nicht bekannter Art und Weise beteiligt sein könnte.

Zwar konnte in unserer Studie mittels einer diskriminierenden PCR, durch die eine Unterscheidung zwischen Feldstämmen und dem Lebendimpfstoff gemacht werden konnte, eine Beteiligung von MDV-Feldstämmen ausgeschlossen werden. Wie bereits im Literaturteil erwähnt, handelt es sich bei den aktuell zu MD-Ausbrüchen führenden Stämmen allerdings ausschließlich um solche der Pathotypen vv sowie vv+. Ein Screening auf Feldstämme des mMDV-Pathotypen wurde demnach nicht durchgeführt. Es sind jedoch die mild virulenten

Stämme, die zu Mareks Zeiten die Nervenform der MD bedingt haben. mMDV-Stämme werden heute – wenn überhaupt – selten bei Krankheitsausbrüchen isoliert (Witter et al. 2005). Ihre Häufigkeit im Feld ist daher unbekannt. Interessanter Weise handelt es sich bei dem zurzeit mit am häufigsten eingesetzten handelsüblichen MDV-Impfstoff CVI 988/Rispens um einen attenuierten Serotyp-1-Stamm des mild virulenten Pathotypen (Witter et al. 1995). Eine bereits von Bacon angesprochene Vermutung ist daher, dass die für die AvIDP beschriebenen Veränderungen durch Impfviren selbst verursacht werden könnten (Bacon et al. 2001). Attenuierte MDVs des Serotyp-1 neigen dazu, in Hühnern während fortlaufender Rückpassagen zu mutieren und ihre biologischen Eigenschaften zu verändern. Eine Studie von Witter zeigte für CVI 988-Impfstoffe auf, dass eben diese Veränderungen zu einem Anstieg des Virustiters, erhöhtem Auftreten von histologischen Nervenläsionen und einer schweren Thymusatrophie führen kann (Witter et al. 1995). Bisher gab es keine Hinweise darauf, dass der natürliche Zyklus von CVI 988/Rispens während seiner nun bereits mehr als 30jährigen Nutzung als kommerzielles Impfvirus zu der Entwicklung von virulenten Feldstämmen geführt hat. Allerdings ist es schwierig, ein solches Geschehen innerhalb aller bei geimpften Hühnern vorkommenden Serotyp-1-Feldstämmen aufzudecken und kann somit nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Es ist daher durchaus denkbar, dass ein mutierter Impfvirus die biologische Fähigkeit zurückerlangt B-Typ-Nervenläsionen zu verursachen, die zu dem hier beschriebenen Bild der AvIDP führen. Diese Theorie wird dadurch erhärtet, dass unsere Untersuchungen von Nerven- und Spinalganglien mittels diskriminierender PCR von einigen erkrankten Tieren positive Ergebnisse für den MDV-Impfstamm Rispens ergaben (Abbildung 4). Gesunde, geimpfte Kontrolltiere wiesen dagegen zwar wie auch die an AvIDP erkrankten Hühner positives Milzgewebe auf, die Nervengewebe waren jedoch durchweg negativ. Die Interpretation, dass das Impfvirus bei den erkrankten Tieren einen Neurotropismus entwickelt hat, dadurch gezielt in das Nervengewebe vordringen konnte und dort das Bild der inflammatorischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathie verursacht,



**Abbildung 4 Diskriminierende PCR**

Links im Bildausschnitt sind exemplarisch die Ergebnisse der PCR mit den Primern UL49amp\_fw und UL49amp\_rv an den Geweben von zwei an AvIDP-erkrankten Tieren (#1 und #2) zu sehen. Als Positivprobe wurde der vvMDV-Feldstamm RB1B benutzt. Auffallend ist, dass sowohl für die Milzproben (Mi) der zwei erkrankten Tiere als auch für die Proben des peripheren Nervengewebes – Nervus ischiadicus (NI) und Spinalganglion (SG) – Banden im Bereich von 618 bp zu finden sind, während sich in Kontrolltieren nur die Milzproben positiv darstellten (nicht dargestellt). Rechts in der Abbildung wiederum ist das PCR-Gel nach Verwendung der Primer UL49disc\_fw und UL49disc\_rv zu sehen. Im Bereich von 320 bp hat sich nur bei der Positivprobe für RB1B eine Bande gebildet. Keine der weiteren Proben weist eine Bande auf, was darauf schließen lässt, dass die Banden der Proben im linken Bildausschnitt Amplifikate der UL49-ORF-Region eines MDV-Impfvirus-Stammes darstellen. Eine Infektion der beprobten Tiere mit MDV-Feldstämmen des Pathotypen vv kann hier ausgeschlossen werden.

ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Wie bereits erwähnt, geht man davon aus, dass ein durch T-Zellen vermittelter Niederbruch der Blut-Nerven-Schranke an der Pathogenese humaner IDPs beteiligt ist (Pollard et al. 1995). Dieser Niederbruch würde ein sekundäres „passives Einschwemmen“ der Impfviren in die zuvor abgegrenzten endoneuralen Bereiche erlauben, ohne dass diese Viren von sich aus einen Neurotropismus aufweisen. Die PCR-Ergebnisse könnten demnach positiv ausfallen, obwohl keine aktive Infektion durch die Impfviren vorliegt. Ein Beweis für die Beteiligung der Impfviren kann demnach nicht erbracht werden. Es wäre jedoch denkbar, dass bestimmte Oberflächenstrukturen von sekundär (oder auch primär) ins endoneurale Gewebe gelangten Impfviren im Sinne einer molekularen Mimikry autoreaktive Immunreaktionen hervorrufen können (s. 4.1.5.1).

Keine Antwort liefert die Theorie der sekundären Einschwemmung der Impfviren in die Nervengewebe nach Niederbruch der Blut-Nerven-Schranke auf die Frage, warum die PCR-Ergebnisse von Dorsalwurzelganglien gesunder Kontrolltiere negativ für das Rispen-Impfvirus waren. Beim Menschen zumindest ist bekannt, dass die Blut-Nerven-Schranke in diesem Bereich sehr durchlässig bis fehlend ist. Ein passives Einschwemmen der Impfviren in

diesen definierten Bereichen sollte also auch bei gesunden Tieren stattfinden können, was durch die sensible PCR leicht darstellbar sein sollte. An diesem Punkt bedarf es weiterer, intensiver Untersuchungen, die die Rolle der Beteiligung von MDV-Impfviren genauer betrachten.

Da jeweils nur ein sehr kleiner Anteil der Tiere kommerzieller Legehennenherden von der Erkrankung betroffen ist, scheint es unwahrscheinlich, dass es sich bei der Ätiologie um ein rein virales Geschehen handelt. Vielmehr liegt der Verdacht nahe, dass weitere prädisponierender Faktoren nötig sind, um das klinische und histopathologische Bild der AvIDP auszulösen wie z. B. die Mitbeteiligung eines bestimmten genetischen Hintergrund und/oder immunsupprimierende Begleitumstände wie die multiplen Vakzinierungen in den ersten Wochen nach dem Schlupf (s. 4.1.7.4, Tabelle 2) und/oder die bereits erwähnte molekulare Mimikry (s. 4.1.5.1).

Erwähnt werden sollte hier, dass auch die bei der MD auftretenden, mit Demyelinisierungen einhergehenden Nervenveränderungen bereits früher mit der EAN verglichen und eine autoimmune Komponente bei dem Krankheitsgeschehen vermutet wurde (Lampert et al. 1977a; Pepose 1982; Pepose et al. 1981). Bereits 1977 stellte Schmahl et al. die Ähnlichkeiten der Marekschen Erkrankung zu autoimmunbedingten Polyneuropathien wie dem Guillain-Barré-Syndrom des Menschen fest (Schmahl et al. 1975). Neben der experimentellen Induktion der EAN beim Huhn (Lampert et al. 1977a) wurde also auch die MD des Hausgeflügels als potentieller Kandidat eines Tiermodells für IDPs des Menschen erachtet.

Interessant ist auch, dass eine Reihe humaner Herpesviren mit dem Auftreten des GBS in Zusammenhang gebracht werden, wie das Varizella-Zoster-Virus (Jacobs et al. 1998; Pavone et al. 2002; Roccatagliata et al. 2001), das Zytomegalievirus (Dowling et al. 1982; Dowling and Cook 1981; Jacobs et al. 1998), das Herpes-simplex-Virus ((CDC) 2006) und insbesondere das Epstein-Barr-Virus (Hojberg et al. 2005; Tam et al. 2007). Letzteres wird taxonomisch den  $\gamma$ -Herpesviren zugeordnet (Buckmaster et al. 1988), deren biologische Fähigkeiten deutliche Parallelen zu denen des zu den  $\alpha$ -Herpesviren gehörenden MDV aufweisen. Das Epstein-Barr-Virus scheint vor allem mit GBS-Fällen assoziiert, die eine besondere Beteiligung der Kopfnerven aufweisen (Hojberg et al. 2005) – einem Phänomen, das auch bei der AvIDP zu beobachten ist.

#### 4.1.7.3 *Genetische Vulnerabilität versus Resistenz gegenüber der AvIDP*

Um eine mögliche genetische Beteiligung aufzudecken, wurde im Falle der AvIDP mittels PCR eine Genotypisierung der aviären MHC-Blutgruppen, die auch als B-Haplotypen bezeichnet werden, durchgeführt. Hierbei konnten insgesamt drei Allele innerhalb des so genannten LEI0258 Mikrosatellitenmarker identifiziert ist, von dem bekannt ist, dass er inmitten des MHC lokalisiert ist und bei dem eine Assoziation zwischen seinen Allelen und bestimmten B-Haplotypen nachgewiesen wurde (Lima-Rosa et al. 2005). Diese Allele werden entweder nach ihrer Basenpaarlänge benannt oder, wie in der Literatur häufiger zu finden, als MHC-B-Haplotyp oder B-Allel B15 (261 bp), B21 (357 bp) beziehungsweise B19 (539bp) beschrieben. Diese Allele ermöglichten wiederum in unserer Studie eine Zuordnung der Tiere zu insgesamt vier verschiedenen Genotypen: Genotyp [B15/B15] bzw. [261/261], Genotyp [B15/B21] bzw. [261/357], Genotyp [B15/B19] bzw. [261/539] sowie Genotyp [B21/B19] bzw. [357/539]. Die Analyse der Daten ergab, dass eine Erkrankung an AvIDP signifikant häufiger bei den Genotypen [B15/B19] und [B21/B19] zu finden war, während Tieren mit den Genotypen [B15/B15] und [B15/B21] kaum Erkrankungsfälle aufwiesen. Eine genetische Prädisposition für die AvIDP ist damit unbestreitbar. Interessant ist, dass die zwei Genotypen, die mit einer erhöhten Anfälligkeit assoziiert sind, beide das Allel B19 enthalten. Genau dieses Allel wurde bereits 1977 als Suszeptibilitätsfaktor für die Erkrankung an der Marekschen Krankheit identifiziert (Briles et al. 1977). Weiterhin fällt auf, dass von den zwei empfänglichen Genotypen wiederum der Genotyp [B21/B19] weniger empfindlich zu sein scheint als [B15/B19]. Das hierbei beteiligte B21-Allel wurde 1977 gewissermaßen als „MD-Resistenzfaktor“ identifiziert, da B21-Allele ausschließlich in MD-resistenten Linien zu finden waren (Briles et al. 1977). Anhand unserer Ergebnisse kann die Vermutung aufgestellt werden, dass sich eine ähnliche Situation auch für die AvIDP abzeichnet. Die Tatsache, dass das B19-Allel sowohl bei der MD als auch bei der AvIDP eine genetische Prädisposition bedingt, erhärtet zudem die Vermutung, dass das galline Herpesvirus - ob als (mutierter) Impfvirus oder bisher unentdecktes MD-Feldvirus – an der Entstehung der AvIDP beteiligt sein könnte.

Es muss festgehalten werden, dass in unserer Studie zwar bevorzugt Tiere mit einem B19-Genotyp das Krankheitsbild der AvIDP entwickelten, bei den Tieren mit den übrigen Genotypen jedoch ebenfalls Erkrankungsfälle auftraten. Es kann daher nicht pauschal gesagt werden, dass ein bestimmter Genotyp zwangsläufig zu einem Ausbruch führen oder umgekehrt eine hundertprozentige Resistenz gegen AvIDP bieten muss. Dennoch hat die Beobachtung, dass der Genotyp nachweisbar an dem höchstwahrscheinlich multifaktoriellen

Geschehen mitbeteiligt ist, dazu geführt, dass die mit uns zusammenarbeitenden Züchter der betroffenen White Leghorn-Hybriden eine Ausmerzung der das B19-Allel enthaltenden Genotypen im Rahmen der Legehennenzucht anstreben, um so langfristig eine Senkung der Inzidenzrate zu erreichen. Erste Kreuzungsversuche wurden bereits im Jahr 2009 begonnen und dauern bisher an. Um die Auswirkung des B19- bzw. 539-Allels noch genauer zu untersuchen, wurde zudem eine Versuchsgruppe B19-homozygoter Tiere gezüchtet. Die Erwartung, dass diese Hühner eine noch höhere Inzidenz als heterozygote mit einem einzelnen prädisponierenden Allel aufweisen, wurde allerdings in zwei Testdurchläufen mit jeweils ca. 2000 Hennen nicht erfüllt, da kein einziges Tier dieser Herden Anzeichen von AvIDP zeigte (persönliche Kommunikation mit der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven). Ähnlich wie bei den Weißen Leghorns im Falle der AvIDP ist auch bei den Lewis-Ratten, die für gewöhnlich in EAN-Versuchen verwendet werden, ein bestimmtes Allel eines MHC-verknüpften Genes innerhalb der MHC- oder RT1-Region als Suszeptibilitätsfaktor bekannt. Es ist – neben weiteren nicht MHC-verknüpften Allelen – dafür notwendig, die Anfälligkeit für eine Erkrankung an EAN in die F2-Generation zu übertragen (Roth et al. 1999). Auch bei der CIDP des Menschen wurde eine höhere Anfälligkeit in Verbindung mit dem humanen MHC-Allel HLA-DR2 festgestellt (McCombe et al. 2006). Bei dem GBS des Menschen dagegen wurden bisher keine sicheren Hinweise gefunden, dass es sich um eine genetische Erkrankung handelt, auch wenn ein solcher Hintergrund vermutet wird. Genetische Studien an GBS-Patienten mit einer Vielzahl unterschiedlicher vorausgegangener Infektionen fanden variable oder keine MHC-Assoziationen und auch keine Auffälligkeiten in anderen an der Immunantwort beteiligten Genen (Geleijns et al. 2004; McCombe et al. 2006; van Sorge et al. 2005). Mehr Erfolg brachten Untersuchungen, die sich auf bestimmte Subtypen des GBS konzentrierten. So deckte eine Studie auf, dass bei der Untersuchung von GBS-Patienten, bei denen eine *C. jejuni*-Infektion vorausgegangen war, eine gesteigerte Prävalenz der HLA DQB1\*03 Allele zu finden war (Rees et al. 1995). Weiterhin konnte in einer chinesischen Bevölkerungsgruppe festgestellt werden, dass bestimmte HLA-DQ $\beta$ -Epitope, die eine wichtige Rolle in der Peptidbindung und T-Zell-Erkennung spielen, mit AIDP assoziiert waren nicht jedoch mit AMAN (Magira et al. 2003). Beide Studien weisen demnach darauf hin, dass immungenetische Faktoren Einfluss darauf nehmen können, welcher Subtyp von GBS sich nach einer bestimmten Infektion entwickelt.

#### 4.1.7.4 Möglicher Zusammenhang mit vorausgegangenen Impfungen

Neben vorausgehenden Infektionen werden bei dem GBS und der CIDP des Menschen auch Impfungen als mögliche Risikofaktoren angesehen. Wie bereits in der Literaturübersicht

erwähnt, wurden in seltenen Fällen Assoziationen zwischen dem Auftreten des GBS und Impfungen gegen Influenza, Hepatitis, Masern, Mumps und Röteln und anderen beschrieben ((CDC) 2006; Lasky et al. 1998; Siddiqui et al. 2005; Souayah et al. 2007). Zusätzlich zu den Überlegungen über mögliche Erreger aus der Umwelt sollte man also auch bei der AvIDP die Mehrfachimpfungen, die bei der Legehennenaufzucht routinemäßig eingesetzt werden, mit bedenken. Ein typisches Impfschema der ersten Lebenswochen ist in Tabelle 2 dargestellt. Alle Tiere in dieser Studie wurden demgemäß in den ersten Wochen nach Schlupf mit inaktivierten oder Lebendimpfstoffen gegen die Viren der Marekschen Krankheit, der Newcastle-Krankheit, der Gumboro-Krankheit (Infektiöse Bursitis) und der Infektiösen Bronchitis sowie gegen Salmonella spp. und Kokzidien geimpft. In Anbetracht der Dichte der Impfungen kann man annehmen, dass diese in den heranwachsenden Tieren eine nicht unwesentliche Belastung des Immunsystems auslösen.

**Tabelle 2 Impfschema für Legehennen**

Alter (nach Schlupf)	Vakzinierung
1. Tag	Marek, Paracox, IB Primer
1.-4. Tag	1. Salmonella vac E
13. Tag	1. IB, H 120
18. Tag	1. ND La Sota
4. Woche	Gumboro
5. Woche	2. IB, H 52
6. Woche	2. ND La Sota

\* IB = Infektiöse Bronchitis; ND = Newcastle disease

#### **4.1.8 Vergleich mit anderen demyelinisierenden peripheren Neuropathien des Haushuhns**

Die AvIDP zeigt in einigen Punkten eine deutliche Ähnlichkeit mit der „Idiopathischen Polyneuritis“, die über fast eine Dekade in den 70er Jahren bei Rhodeländern beobachtet werden konnte (Biggs et al. 1982), seither jedoch nicht mehr beschrieben wurde. Sowohl in der AvIDP als auch in der IP erkranken bzw. erkrankten die Tiere bei niedriger Inzidenz im juvenilen Alter von etwa 5 bzw. 6 bis 13 Wochen. In beiden Erkrankungen entwickelten die Hühner Paresen, deren histopathologische Korrelate Läsionen im peripheren Nervensystem sind, die den B-Typ-Nervenläsionen der MD gleichen. Das ZNS ist jeweils frei von Veränderungen. Die deutlichsten Unterschiede dieser neurologischen Krankheiten finden sich in den verschiedenen Rassen und Haltungsbedingungen. Die IP wurde ausschließlich bei Rhodeländern aus SPF-Haltung beobachtet, wodurch der genetische Hintergrund sowie der Infektionsdruck, dem die Tiere in der Aufzuchtperiode ausgesetzt waren, deutlich von dem

der an AvIDP erkrankten Weißen Leghorn-Hühner abweicht. Dennoch ist anzumerken, dass auch die Rhodeländer-Hühner einen genetischen Hintergrund besaßen, der mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Marek assoziiert war. Wie bei der AvIDP konnte allerdings auch bei den an IP erkrankten Tieren kein MDV nachgewiesen werden. Zudem waren Letztere nicht gegen das MDV geimpft, so dass eine Mitbeteiligung eines MDV-Impfvirus im Gegensatz zur AvIDP definitiv ausgeschlossen werden konnte. Trotz der Gemeinsamkeiten zwischen der AvIDP und der IP ist wegen der genannten Unterschiede die Wahrscheinlichkeit gering, dass es sich hier um ein und dieselbe Erkrankung handelt.

Eine weitere mit Demyelinisierungen einhergehende Erkrankung der Hühner ist die durch Riboflavinmangel bedingte periphere Neuropathie bei schnell wachsenden Broilerrassen (Bethke and Record 1942; Cai et al. 2006a; Cai et al. 2006b; Johnson and Storts 1988; Jortner et al. 1987; Phillips and Engel 1938a; b). Diese Neuropathie tritt bei Hühnern, die ab dem Tag ihres Schlupfes Futter mit relativem Riboflavinmangel erhalten, innerhalb der 2. Lebenswoche auf und somit deutlich eher als die frühesten Erkrankungsfälle der AvIDP. Klinisch stellt sich die Riboflavinmangel-Neuropathie meist symmetrisch und mit der sehr charakteristischen „*Curled Toe*“-Paralyse dar, wodurch sie klar von der überwiegend asymmetrischen Parese der AvIDP abgrenzbar ist, die kein Einrollen der Zehen aufweist. Auch histopathologisch sind deutliche Unterschiede zu finden, beginnend mit dem Verteilungsmuster. Dieses weist bei der AvIDP einen proximodistalen Gradienten mit deutlicher Betonung in den proximalen Bereichen auf. Bei der Riboflavinmangel-Neuropathie dagegen ist der Verlauf der peripheren Nerven betroffen, wogegen die Nervenwurzeln komplett ausgespart sind. Letzteres wird dadurch erklärt, dass die hier fehlende Blut-Nerven-Schranke eine Versorgung mit dem mangelnden Riboflavin in diesem Bereich gerade noch gewährleisten kann. Ein weiterer großer Unterschied findet sich darin, dass die Schwanzzellen durch den Riboflavinmangel schwer geschädigt werden, während sie bei der AvIDP unversehrt bleiben. Ursache für die Schädigung der Schwanzzellen bei der Riboflavinmangel-Neuropathie ist vermutlich ein erniedrigter zellulärer Energiestoffwechsel in bestimmten kritischen Phasen des Wachstums, in denen ein hoher metabolischer Bedarf im Rahmen der Myelinbildung besteht (Cai et al. 2007; Jortner et al. 1987). Bedingt ist dies durch erniedrigte Gewebskonzentrationen von den auf Riboflavin basierenden Koenzymen Flavin-Adenin-Dinukleotid und Flavin-Mononukleotid, was eine gestörte oxidative Phosphorylierung und somit eine erniedrigte  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren zur Folge hat. Bei der AvIDP dagegen ist die Myelinscheide alleiniges Ziel der Immunreaktion, während der

Zellkörper der Schwannzellen verschont bleibt. Eine Abgrenzung der AvIDP zu der metabolisch bedingten peripheren Riboflavinmangel-Neuropathie ist daher leicht zu bewerkstelligen – trotz einiger Gemeinsamkeiten wie den De- und Remyelinisierungen, dem Auftreten von *Onion Bulbs* und der Infiltration mit mononukleären Zellen.

## **4.2 Elektrophysiologie als Möglichkeit zur Langzeitüberwachung AvIDP erkrankter Hühner**

Bisher ist wenig über den Krankheitsverlauf der AvIDP bekannt. Neben der histo- und immunpathologischen Charakterisierung der AvIDP war es daher von Interesse den zeitlichen Verlauf im Rahmen einer Langzeitstudie zu verfolgen. Dabei sollte auch geklärt werden, ob der histopathologisch nachgewiesene Prozess der Remyelinisierung eine klinische Remission und vollständige Wiederherstellung der Nervenfasernfunktion bedingen kann und welche Faserqualitäten von den Demyelinisierungen betroffen sind. Zunächst war es daher nötig, geeignete Methoden zu entwickeln, die eine Langzeitüberwachung an AvIDP erkrankter Tiere ermöglichen und die auftretenden Veränderungen möglichst objektivierbar darstellen können.

### **4.2.1 Überlegungen zur Auswahl geeigneter Untersuchungsmethoden für eine Langzeitüberwachung der AvIDP**

Wie in den vorherigen Untersuchungen aufgezeigt werden konnte, betreffen die pathologischen Veränderungen der AvIDP vor allem die anatomisch sehr schlecht zugänglichen spinalen Nervenwurzeln inklusive der Dorsalwurzelganglien. Die weiter distal gelegenen Areale, die operativ leichter erreichbar wären, weisen dagegen deutlich seltener Veränderungen auf. Die Entnahme von Nervenbiopsien erschien daher als Untersuchungsmethode im Rahmen von Langzeitüberwachungen ungünstig. Da es sich zudem um eine sehr invasive Maßnahme handelt, die keine Mehrfachuntersuchungen ein und derselben Nervenstrukturen erlaubt und darüber hinaus keine Unterscheidung zwischen sensiblen und motorischen Fasern zulässt, wurde sie schließlich als ungeeignet ausgeschlossen. Die elektrophysiologische Untersuchung dagegen, die in der Humanmedizin als diagnostische Routinemethode bei Polyradikuloneuropathien eingesetzt wird, bot sich auch bei Langzeituntersuchungen der AvIDP als Methode der Wahl an. Durch sie sollte es möglich sein, Nervenveränderungen im Krankheitsverlauf quantifizierbar darzustellen und das Ausmaß der Beteiligung sensibler bzw. motorischer Fasern zu ermitteln.

Bisher waren elektrophysiologische Untersuchungen der Nervenwurzeln von Vögeln klinisch von geringem Interesse, was sich in einem Mangel an standardisierten diagnostischen Tests sowie altersbezogenen elektrophysiologischen Referenzwerten äußert. Aus diesem Grund galt es zunächst, leicht durchführbare Testverfahren zur Beurteilung der Funktion der motorischen und sensiblen Fasern des N. tibialis/ischiadicus inklusive seiner Nervenwurzelanteile zu

entwickeln. Dafür wurden bereits publizierte Protokolle überprüft und modifiziert und zusätzlich die spinale Magnetstimulation für die Anwendung an Hühnern erstmals eingeführt.

#### **4.2.2 Modifizierung vorheriger Protokolle zur Bestimmung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit**

Bereits in früheren Studien wurde die Bestimmung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (MNLG) des N. tibialis/ischiadicus bei Hühnern beschrieben (Bagley et al. 1995; Kornegay et al. 1983b). Anfängliche Versuche zeigten jedoch rasch, dass es einer Modifizierung der früher veröffentlichten Protokolle (Bagley et al. 1992; Kornegay et al. 1983b) bedurfte, da keine motorischen Potentiale innerhalb des Musculus (M.) abductor digiti IV abgeleitet werden konnten. Dies mag daran liegen, dass es sich hierbei um einen sehr kleinen und größtenteils sehnigen Muskel handelt, wie aus einer Präparation der entsprechenden Bereiche ersichtlich wurde. Die bisher beschriebenen Methoden (Bagley et al. 1995; Bagley et al. 1992; Clippinger et al. 2000; Kornegay et al. 1983b; Massicotte et al. 2001; Platt et al. 1999) wurden daher im Sinne einer Nutzung der „Muskelbauch-Muskelsehnen-Montage“ im M. gastrocnemius verändert. Dies geschah in Anlehnung an Empfehlungen aus der Humanmedizin, in der die Muskelbauch-Muskelsehnen-Montage als eine der bevorzugten Ableitungsstellen sowohl bei der elektrischen als auch bei der magnetischen Stimulation motorischer Nerven gilt.

Dank der vorgenommenen Änderungen im Versuchsaufbau gelang es reproduzierbar, Muskelsummenaktionspotentiale (MSAPs) nach Stimulation des N. tibialis/ischiadicus an zwei definierten Stellen abzuleiten. Damit war die Voraussetzung zur Bestimmung der MNLG ebenso gegeben wie zur Analyse der verschiedenen Parameter der zwei Muskelsummenaktionspotentiale.

#### **4.2.3 Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren der MNLG**

Bereits 1940 wurde festgestellt, dass sich die Nervenleitgeschwindigkeit annähernd proportional zum Durchmesser der Nervenfasern verhält (Cottrell 1940). Eine Vergrößerung des Axondurchmessers im Rahmen des Wachstumsprozesses wurde unter anderem für Säugetiere wie Hund, Pferd und Mensch beschrieben (Braund et al. 1982; Cho 1987; Wheeler and Plummer 1989). Auch beim Huhn könnte eine solche Dickenzunahme der Nervenfasern den altersbedingten Anstieg der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit erklären. Weiterhin ist bekannt, dass die in den markhaltigen Fasern ablaufende saltatorische Leitung zum einen

von der durch die Myelinscheide erzeugten Isolation (Huxley and Stämpfli 1949) abhängig ist. Zum anderen ist sie ebenso angewiesen auf die streng ortsspezifische Anhäufung bestimmter Ionenkanäle innerhalb der palindromal aufgebauten Strukturen der Nervenfasern im Bereich der Paranodien und Ranvierschen Schnürringe (Scherer 1996). Ob nun der Anstieg der MNLG im Falle der hier untersuchten, sich in der späten Adoleszenz befindlichen Hühner allein der Zunahme von Myelinschichten zuzurechnen ist (Berthold et al. 1983; Schroder et al. 1978), muss in weiteren morphometrischen Untersuchungen geklärt werden. Auf jeden Fall lässt die Abhängigkeit der saltatorischen Leitung von der isolierenden Wirkung der Myelinscheide erwarten, dass sich im Falle der AvDIP durch die De- und Remyelinisierungen Veränderungen in der Nervenleitfunktion und in den beiden entsprechenden Muskelsummenaktionspotentialen ergeben. Dies muss sich jedoch zunächst nicht zwangsläufig in einer Verlangsamung der MNLG zeigen, da durch den deutlichen proximodistalen Gradienten der Veränderungen genau die Nervenstrecke, von der die MNLG berechnet wird, noch unverändert sein kann.

Ein weiterer zu beachtender Einflussfaktor auf die Endwerte der MNLG ist das Phänomen der distalen Verjüngung der Nervenfasern. In Menschen wird diese Verjüngung und die damit assoziierte fortschreitende Abnahme des Durchmessers der motorischen Fasern als Ursache für die Verringerung der Leitungsgeschwindigkeit von proximalen hin zu distalen Nervensegmenten angesehen (Campbell et al. 1981). Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass die gemessenen Werte der Hühner in dieser Studie durchschnittlich 10 m/s über denen lagen, die in einer vorherigen Untersuchung für die jeweils gleichen Altersstufen beschrieben worden sind (Bagley et al. 1992). In Letzterer wurde an einer weiter distal gelegenen Stelle abgeleitet, was die MNLG durch das Phänomen der distalen Verjüngung der Fasern negativ beeinflussen haben könnte. Möglicherweise liegt die Ursache für die Diskrepanz in der Höhe der MNLG aber auch darin, dass unterschiedliche Hühnerrassen und Kreuzungslinien Variationen in der Reifungskinetik beziehungsweise im absoluten Durchmesser der Axone und ihrer Myelinscheiden zeigen und dadurch auch in der Leistungsfähigkeit der leitenden motorischen Fasern während eines bestimmten Alters. Auch hier sind wiederum morphometrische Untersuchungen der betreffenden Strukturen am Huhn bzw. in verschiedenen Hühnerrassen nötig, um genauere Aussagen machen zu können.

Es ist seit langem bekannt, dass die Körpertemperatur Einfluss auf die Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit hat. So erhöht sich die Nervenleitgeschwindigkeit bei Menschen

um ca. 5 % pro Grad Celsius wenn die Nerventemperatur von 29 auf 37 °C ansteigt (De Jesus et al. 1973; Johnson and Olsen 1960; Lowitzsch et al. 1977), während die Nervenpotentiale und MSAPs niedriger werden (Bolton and Carter 1980; Lang and Puusa 1981). In dieser Studie wurde daher darauf geachtet, die Körpertemperatur der Hühner während der Anästhesie mittels Wärmekissen und subkutanen Flüssigkeitsdepots mit körperwarmer Kochsalzlösung möglichst konstant zu halten. Bei der statistischen Auswertung der Daten konnte schließlich ein statistisch signifikanter altersabhängiger Anstieg der Körpertemperatur, der bereits 1995 auch von Bagley et al. beschrieben wurde (Bagley et al. 1995), bei gleichzeitigem statistisch signifikantem Anstieg der MNLG festgestellt werden. Allerdings gab es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Temperatur und MNLG in den einzelnen Altersgruppen, weshalb in dieser Studie auf entsprechende Korrekturfaktoren, wie sie für gewöhnlich in der Humanmedizin und Tiermedizin eingesetzt werden, verzichtet wurde. Dennoch sollte gerade bei der Messung erkrankter Tiere verstärkt darauf geachtet werden, die Temperatur der Hintergliedmaßen in einem angemessenen Temperaturbereich zu halten, da diese immer eine mehr oder weniger ausgeprägte Atrophie der Beinmuskulatur aufweisen und dadurch noch deutlicher als gesunde Vögel dazu neigen schnell auszukühlen.

Das Alter, in dem die MNLG ihre höchsten Werte erreicht und auch der höchste Wert selbst variieren bei den verschiedenen Säugetierarten erheblich (Birrell et al. 2000; Birren and Wall 1956; Hort-Legrand et al. 2006; Swallow and Griffiths 1977). Es ist schwierig, eine allgemeingültige Regel zu finden, die eine Erklärung dafür bietet, mit welchem Alter der Reifungsprozess in den unterschiedlichen Tierarten zu einem Abschluss kommt und warum die Höchstwerte sich so deutlich unterscheiden. Eine Überlegung könnte sein, dass es bei Nestflüchter zu einer schnelleren Ausreifung der MNLG kommt. Allerdings gelangt die MNLG von Hunden als Vertreter der Nesthocker bereits mit 6 Monaten bis zu einem Jahr zu ihrem Endwert, während beim Minipig als Vertreter des Nestflüchters Anstiege bis zu einem Alter von fast 1,5 Jahren beobachtet wurden und das obwohl die Arten, was Körpergröße und voraussichtliche Lebensspanne angeht, relativ nahe beieinander liegen. Ein direkter Zusammenhang kann hier also nicht gefunden werden. Bis auf die Daten der oben genannten Studie (Bagley et al. 1992) sind keine entsprechenden Werte für Vogelarten verfügbar, so dass auch hier kein Hinweis zu finden ist, ob zum Beispiel Nestflüchter wie Hühner einen rascheren und früher abschließenden Anstieg der MNLG aufweisen als Nesthocker.

#### 4.2.4 Etablierung somatosensibel evozierter Potentiale (SSEPs) zur Beurteilung der sensiblen Leitungswege

Ein weiteres Ziel der elektrophysiologischen Untersuchung AvIDP-erkrankter Hühner sollte es sein, einen Einblick darin zu bekommen, ob die sensiblen Nervenfasern betroffen sind, wie nach dem histopathologisch beobachteten Ausmaß der Veränderungen in den Dorsalwurzelganglien zu erwarten war. Hierfür musste eine Methodik entwickelt werden, die neben den distalen Nervenanteilen auch die Dorsalwurzelganglien einschloss.

Der experimentelle Aufbau zur Beurteilung der sensiblen Impulsleitung richtete sich zu großen Teilen nach Empfehlungen, die für Hühner, Enten und Truthähnen (Gregory and Wotton 1989; Machida et al. 1994; Mouchoniere et al. 2000) sowie Hunden und Katzen (Besalti et al. 2007; Cuddon et al. 1999) zur Erfassung kortikaler somatosensibel evozierter Potentiale (Besalti et al. 2007; Gregory and Wotton 1989; Machida et al. 1994; Mouchoniere et al. 2000; Uzuka et al. 1987), lumbaler und thorakaler Cord-Dorsum-Potentiale (Besalti et al. 2007; Brenner et al. 2008; Cuddon et al. 1999) sowie der sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit (SNLG) (Cuddon et al. 1999) beschrieben wurden. Von den folgenden Orten konnten beständig Signale abgeleitet werden: (1) dem Kopf, (2) der Lücke zwischen dem letzten Hals- und dem ersten Brustwirbelbogen und (3) dem Symsakrum. Es gelang jedoch trotz zahlreicher Vorversuche nicht, reproduzierbare Potentiale vom N. tibialis/ischiadicus abzuleiten, so dass eine Berechnung der SNLG des N. tibialis nicht möglich war.

##### 4.2.4.1 Die Gefahr der Missinterpretation lumbosakral abgeleiteter Potentiale: Cord-Dorsum-Potential versus Potentialentstehung via alternative Leitungsbahnen

Nach Stimulation des N. tibialis konnten lumbosakral Signale abgeleitet werden, deren Wellenmorphologie verblüffend der des lumbalen Cord-Dorsum-Potentials (CDP) ähnelte, wie sie für den Menschen (Powers et al. 1982) und andere Säugetiere (Besalti et al. 2007; Cuddon et al. 1999) beschrieben wird. Die Potentiale begannen ebenso wie die CDPs mit einer kleinen triphasischen Welle, von der man für das CDP annimmt, dass sie Änderungen der elektrischen Ladungen im extrazellulären Raum infolge ionischer Ströme widerspiegelt. Diese Ströme sollen assoziiert sein mit Aktionspotentialen sensibler Nerven, die sich via afferente Nervenfasern von sensiblen oder gemischten Nerven bis hin zum Rückenmark fortpflanzen (Cuddon et al. 1999; Holliday et al. 1979; Yates et al. 1982). Dieser initialen Welle folgte ein großer, negativer Peak, der beim CDP auf die Depolarisation von Interneuronen des Dorsalhorns zurückgeführt wird. Die Depolarisation bewirkt eine negative

Ladung innerhalb des Dorsal- sowie eine positive Ladung innerhalb des Ventralhorns (Cuddon et al. 1999; Holliday et al. 1979; Yates et al. 1982). Schlussendlich konnte eine positive Auslenkung beobachtet werden, die im CDP als primäre afferente Depolarisation des stimulierten Segmentes und der dazugehörigen dorsalen Nervenwurzel interpretiert wird (Cuddon et al. 1999; Holliday et al. 1979).

Interessanter Weise konnten die lumbosakralen und die zervikothorakalen Signale weder durch den am N. ischiadicus gesetzten Lidocain-Nervenblock, noch durch eine Neurektomie des N. ischiadicus oder eine Rhizotomie der entsprechenden lumbosakralen spinalen Nervenwurzeln aufgehoben werden (Figure 3 A, Linien e und f; Artikel 2). Das Fortbestehen dieser Potentiale lässt vermuten, dass die Signale auf alternativen Wegen und zumindest nicht ausschließlich durch die Wurzeln des Plexus lumbosacralis zu den Ableitungsorten geleitet worden waren. Folglich blieb der Nachweis aus, dass es sich bei den Potentialen um stationäre Feldpotentiale handelte, die von spinalen Interneuronen in den lumbalen bzw. zervikalen Intumeszenzen generiert worden waren (Brenner et al. 2008; Cuddon et al. 1999). Es kann vermutet werden, dass es sich bei den Signalen um *Far-Field*-Potentiale gehandelt hat, die über die Haut, Muskeln oder auch Körperflüssigkeiten weitergeleitet worden waren, zumal die Körpergröße der Hühner eher gering und damit die alternativ zu überwindende Strecke zwischen Stimulation und Ableitung vergleichsweise kurz war. Der Ursprung bzw. die einzelnen an der Potentialentstehung beteiligten Komponenten bleiben weiterhin ungeklärt. Daher wurden die lumbosakral und auch die zervikothorakal abgeleiteten Potentiale vollständig aus dem Untersuchungsprotokoll ausgeschlossen.

Es stellt sich hier natürlich die Frage, in wie weit die Resultate früherer Studien, in denen CDPs gemessen wurden, verlässlich sind. Den endgültigen Beweis, dass es sich bei den abgeleiteten Potentialen um rein sensible Antworten handelt, bleiben die Studien zumeist schuldig. Gerade bei Untersuchungen an Tieren, deren Körpergröße ähnlich der oder kleiner als die eines Huhns ist, wäre eine beweisende Untersuchung mittels Nervenleitungsunterbrechungen, wie in dieser Studie durchgeführt, durchaus angebracht und könnte interessante Ergebnisse hervorbringen.

#### 4.2.4.2 Glaubwürdigkeit der kranialen somatosensibel evozierten Potentiale im Huhn

Im Gegensatz zu den spinal abgeleiteten Signalen kam es nach der Leitungsunterbrechung des N. ischiadicus durch das Setzen des Nervenblocks, der Neurektomie sowie der Rhizotomie zu einer vollständigen Aufhebung der über dem Vertex abgeleiteten Potentiale (Figure 3 B, Linie

b. Artikel 2). Dies weist auf einen sensiblen Ursprung im Bereich des N. tibialis/ischiadicus hin und macht die Ableitung am Kopf zu der glaubwürdigsten und zuverlässigsten Ableitungsstelle zur Messung der SSEPs in diesem Studienaufbau.

#### **4.2.5 Auswahl geeigneter Parameter zur Beurteilung der kranialen SSEPs**

Diagnostische Parameter, die für gewöhnlich in kranial abgeleiteten SSEPs bestimmt werden, umfassen Anfangs- und Peak-Latenzen, Interpeak-Intervalle sowie Amplituden (Strahm et al. 2003; Uzuka et al. 1987). Hierbei geben die Latenzen die leitende Funktionsfähigkeit der sensiblen Fasern beginnend bei der Stimulationsstelle bis hin zum Kortex/Subkortex wieder. Wie für die peripheren Nerven beschrieben, unterliegen auch die zentralen Nervenfasern entwicklungsbedingten Veränderungen hinsichtlich des Grades der Myelinisierung sowie der Größe des axonalen Durchmessers (Paus et al. 1999). Daher konnte auch für die sensiblen Nervenfasern eine Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit erwartet werden. Vermutlich bedingt durch die ansteigende Körpergröße der im Wachstum befindlichen Hühner, verlängerten sich sowohl die Anfangs- als auch die P1- und N1-Peak-Latenzen mit fortschreitendem Alter. Um den anatomischen Größenunterschieden zwischen den Tieren und zwischen den jeweiligen Altersgruppen gerecht zu werden, wurde mit der somatosensiblen Leitungsgeschwindigkeit (SSLG) ein zusätzlicher Parameter zur Beurteilung der Funktionalität sensibler Fasern eingeführt. Im Gegensatz zur MNLG umfasst die SSLG neben peripheren auch zentrale Leitungsbahnen. Eine Auftrennung der SSLG in und somit eine Zuordnung zu diesen beiden Komponenten ist theoretisch möglich. Allerdings benötigt man hierfür die Anfangslatenz des lumbalen CDP – die den peripheren Anteil der sensiblen Bahnen widerspiegelt –, die dann von der kortikal abgeleiteten SSLG subtrahiert wird und zu der rein zentralen Nervenleitzeit führt. Da in dieser Studie keine CDP etabliert werden konnten (siehe oben), war es nicht möglich, die zentrale Nervenleitungszeit zu bestimmen. Dennoch konnte die SSLG reproduzierbar berechnet werden und trat zudem mit einer Standardabweichung von 4 m/s durchaus homogen innerhalb der einzelnen Altersgruppen auf.

#### **4.2.6 Erhebbarkeit von Interpeak-Intervallen**

Interpeak-Intervalle gehören in der Humanmedizin zu den routinemäßig bestimmten Parametern von SSEPs. Gemessen werden sie zwischen den Peaks verschiedener spinal und kortikal abgeleiteter SSEPs, also z. B. zwischen einem definierten Peak eines lumbal

abgeleiteten Potentials und einem definierten Peak eines kortikalen SSEPs. Sie geben somit Aufschluss über die Leitungsbahnen im zentralen Nervensystem, die zwischen den jeweiligen Ableitorten liegen, im genannten Beispiel also über die vom lumbalen Rückenmark bis zum Kortex reichenden Leitungsbahnen. Dabei zeigen sie sich im Gegensatz zu den absoluten Latenzzeiten unabhängig von der Beinlänge und in den meisten Fällen auch von Erkrankungen des peripheren Nervensystems (Hausmann et al. 2003). Da in dieser Studie nur die kranialen SSEPs verfügbar waren, wurde als Alternative zu den Interpeak-Intervallen versuchsweise das P1-N1-Intervall innerhalb des kranialen SSEPs selbst bestimmt. Die Theorie war, das P1 und N1 mit hoher Wahrscheinlichkeit elektrische Aktivitäten innerhalb des zentralen Nervensystems widerspiegeln, die durch die Ankunft sensibler Impulse im Hirn ausgelöst werden. Das P1-N1-Intervall würde somit den Zeitraum darstellen, der zwischen diesen beiden elektrischen Ereignissen liegt. Anhand seiner Bestimmung könnte demnach eine Beurteilung der zentralen Areale des sensiblen Nervensystems vorgenommen werden. Eine Abweichung des P1-N1-Intervalles vom Normalwert würde demnach auf eine Veränderung der zentralen Komponenten, z. B. einer verzögerten Übertragung innerhalb des Gehirns, hinweisen. Bei rein peripheren Nervenerkrankungen wie der AvIDP könnte somit eine Beteiligung des Gehirns ausgeschlossen werden, da es in ihrer Folge zu einer Verlängerung der absoluten Latenzen der SSEPs kommen würde, das zentrale Nervensystem und somit der P1-N1-Intervall jedoch unverändert sein sollten.

Leider zeigten die P1-N1-Intervalle bereits innerhalb der Kontrolltiergruppe große Schwankungen. Versuche mit AvIDP-erkrankten Tieren ergaben zudem Durchschnittswerte, die unterhalb der ermittelten Referenzwerte lagen und sich somit gegenteilig zu den erwarteten Ergebnissen verhielten. Das P1-N1-Intervall wurde daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

#### **4.2.7 Erhebbarkeit von physiologischen Spätantworten**

Im Gegensatz zu einer vorausgegangenen Studie, in der Hühner der nahezu gleichen Altersklasse untersucht worden waren (Bagley et al. 1993), konnten innerhalb dieser Untersuchungen in keinem der Tiere F-Wellen abgeleitet werden. Ebenso wenig gelang es, andere physiologische Spätantworten wie den H-Reflex auszulösen. Damit standen uns diese in der Humanmedizin routinemäßig eingesetzten Wege zur Beurteilung der ventralen (F-Welle) beziehungsweise dorsalen (H-Reflex) Nervenwurzel nicht zur Verfügung. Eine Erklärung hierfür könnte das Zusammenspiel aus der geringen Körpergröße der Hühner und der Tatsache sein, dass wir motorische Potentiale im Gastroknemius abgeleitet haben und

nicht wie in der Studie von Bagley et al. weiter distal, wodurch sich der Abstand zwischen distalem Stimulationsort, Rückenmark und Ableitungsstelle weiter verringerte. Die Größe der Hühner allein kann allerdings nicht der Grund sein, da F-Wellen erwiesenermaßen in noch kleineren Tieren abgeleitet werden können wie z. B. in den Fußmuskeln der Ratte nach einer Stimulation des N. tibialis im Bereich des Sprunggelenks (Meinck 1976) oder der Fossa poplitea (Friedman et al. 1996). Damit rückt der Ableitungsort als Ursache weiter in den Mittelpunkt des Interesses. Bagley et al. gelang es, F-Wellen in Hühnern durch Stimulation des N. tibialis in der Fossa poplitea zu generieren und die motorischen Potentiale innerhalb des M. abductor digitalis abzuleiten (Bagley et al. 1993). Dabei erhielten sie Anfangslatenzen von  $11,4 \pm 0,12$  ms (SEM) im Alter von zwei Wochen bis hin zu  $12,88 \pm 0,65$  ms (SEM) in einem Alter von 15 Wochen (Bagley et al. 1993). Wie bereits zuvor erwähnt, leiteten wir weiter proximal ab, so dass sich Spätantworten voraussichtlich mit kürzeren Anfangslatenzen darstellen würden. Da die durch distale Stimulation ausgelösten MSAPs mindestens 11 ms für die Rückkehr zur Nulllinie nach dem positiven Peak benötigen, liegt daher die Vermutung nahe, dass F-Wellen in dem vorangehenden motorischen Potential absorbiert werden.

#### **4.2.8 Etablierung eines standardisierten Aufbaus einer spinalen Magnetstimulation (sMS) beim Huhn**

Da bei der AvIDP die spinalen Nervenwurzeln besonders stark von den Veränderungen betroffen sind und die F-Welle nicht zur Verfügung stand, musste zunächst eine geeignete Methode zur Beurteilung dieser Strukturen gefunden werden. Die Wahl fiel schließlich auf die Magnetstimulation, deren Anwendbarkeit als adäquate Methode zur Stimulation der proximalen Anteile der peripheren Nerven beim Menschen in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte (Bischoff et al. 1993; Britton et al. 1990; Chokroverty 1989). Unter Orientierung an den humanen Studien gelang es in dieser Studie erstmals, auch für das Huhn einen reproduzierbaren Aufbau für die spinale Magnetstimulation zu etablieren, der eine Beurteilung der Funktionsfähigkeit motorischer Fasern innerhalb der lumbosakralen Ventralwurzeln erlaubt.

Die Eindringtiefe der fokalen Schmetterlingsspule reichte aus, maximale Muskelantworten in Hühnern hervorzurufen. Im Gegensatz zum Menschen gelang es im Huhn zudem bereits mit Stimulationsintensitäten ab 65 % supramaximale Antworten auszulösen. Der Nachteil der Magnetstimulation bei Menschen, dass selbst bei einer Ausnutzung von 100 % der Stimulationsintensität keine maximalen Antworten evoziert werden können (Chokroverty et

al. 1993), war somit beim Huhn hinfällig. Dies lässt sich durch die im Vergleich zum Menschen kleinere Körpergröße sowie eine geringere Dicke der unterliegenden Muskulatur erklären.

Die zuvor definierten knöchernen Orientierungspunkte halfen zuverlässig, die richtige Spulenposition reproduzierbar wieder zu finden. Versuche, motorische Potentiale durch Stimulation absteigender motorischer Fasern in Brusthöhe zu evozieren, führten zu keinem ableitbaren Signal im Gastroknemius, weshalb eine direkte spinale Stimulation mit anschließender Weiterleitung via intraspinaler Nervenfasern bis hin zum N. tibialis ausgeschlossen werden konnte. Auch beim Menschen nimmt man an, dass die Magnetstimulation über der Wirbelsäule keine Aktivierung der innerhalb des Rückenmarkes absteigenden Faserbündel bewirkt. Es wird vermutet, dass die knöchernen Wirbel wie Isolatoren zwischen Rückenmark und den es umgebenden äußeren Geweben wirken. Der induzierte Strom fließt daher wahrscheinlich eher außen um die Wirbelsäule herum als durch sie hindurch (Ugawa et al. 1989). In unserer Studie führte die Rhizotomie der spinalen lumbosakralen Nervenwurzeln direkt an ihrem Austritt aus den Foramina intervertebrales zu einer kompletten Auslöschung der im Gastroknemius abgeleiteten motorischen Potentiale. Damit konnte zum einen eine direkte Stimulation der Muskeln ausgeschlossen werden. Des Weiteren engten diese Ergebnisse damit das durch die elektromagnetische Induktion stimulierte Gebiet auf das untere motorische Neuron ein im Sinne von: (1) dem Nervenzellkörper im Ventralhorn, (2) den intramedullar verlaufenden Fasern oder (3) den gekrümmten Anfangssegmenten der intraspinalen Nervenwurzel noch vor oder (4) unmittelbar mit ihrem Austritt aus dem Foramen intervertebrale. Ob es sich beim Huhn, wie zuvor für den Menschen gezeigt, um eine Stimulation erst außerhalb des Wirbelkanals handelt oder ob sie bereits innerhalb auftritt, ist bisher nicht bekannt.

Insgesamt gesehen ist die spinale Magnetstimulation eine exzellente Methode, um die Leitfähigkeit der am weitesten proximal gelegenen motorischen Nervenwurzeln zu testen, was insbesondere Relevanz hat bei Polyradikuloneuropathien mit einem deutlichen proximodistalen Verlaufsgradienten, wie ihn die aviäre inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (Bader et al. 2010) aufweist. Natürlich erfordert dies einen standardisierten Ablauf, vor allem was die konstante Einhaltung der Positionierung von der Spule zum Nerven angeht, da bereits minimale Abweichungen des Stimulationswinkels und/oder der -distanz unmittelbar zu einer Veränderung der MSAPs führen.

#### **4.2.9 Überlegungen zur Notwendigkeit von Kontrollen**

Die Ergebnisse früherer Studien deuteten darauf hin, dass der Reifungsprozess zumindest der motorischen Nervenfasern bereits im Alter von 15 Lebenswochen nach dem Schlupf abgeschlossen ist (Bagley et al. 1992). In dieser Studie sowie in weiterführenden Untersuchungen konnte ein Anstieg der MNLG G von der 6. bis mindestens zur 25. Lebenswoche beobachtet werden. Ähnlich der MNLG zeigte die SSNG ebenfalls einen fortschreitenden, altersabhängigen Anstieg bis mindestens zur 25. Lebenswoche. Wie bei der MNLG kann also auch hier die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Reifungsprozess der sensiblen Fasern mindestens bis zu diesem Alter andauert. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, Referenzwerte zumindest bis zu einem Alter von 25 Wochen zu etablieren.

#### **4.2.10 Diagnostischer Wert der elektrophysiologischen Methoden im Hinblick auf demyelinisierende Erkrankungen des Haushuhns**

Die Unterscheidung und getrennte Beurteilung einer proximalen beziehungsweise distalen Nervenleitungsstörung ist in einer ganzen Reihe von Erkrankungen des PNS von entscheidender diagnostischer Relevanz. Um in Hühnern entsprechende Untersuchungen durchführen zu können, wurden in dieser Studie Methoden zur Auslösung von MSAPs durch elektrische Stimulation des N. tibialis/ischiadicus modifiziert. Dabei können die durch proximale und distale elektrische Nervenstimulation ausgelösten MSAPs helfen, partielle Nervenblöcke aufzudecken, wie es auch für die AIDP des Menschen beschrieben steht, bei der die Demyelinisierungen in den Nervenwurzeln beginnen und im Folgenden nach distal fortschreiten (Uncini and Yuki 2009). Hierbei zeigt sich die durch proximale Nervenstimulation ausgelöste Amplitude verkleinert, während die durch distale Stimulation ausgelöste Amplitude unverändert ist. Dies weist darauf hin, dass die Fasern in den proximalen Bereichen bereits von Demyelinisierungen betroffen sind, die Myelinscheiden der Fasern in den distalen Anteilen jedoch noch weitgehend erhalten sind. Die Beurteilung der MSAPs sowie der MNLG kann zudem dabei helfen, den Charakter der Neuropathie im Sinne einer Demyelinisierung beziehungsweise einer axonalen Degeneration zu bestimmen. Ein abschließender Beweis für eine Nervenwurzelbeteiligung kann durch die elektrische Motornervenstimulation jedoch nicht erbracht werden, insbesondere da die F-Wellen nicht zur Verfügung stehen. Stattdessen konnten Methoden zur Ableitung kranialer SSEPs sowie die SMS etabliert werden, die eine Beurteilung der proximalen, sensiblen und motorischen Nervenleitung in Hühnern erlauben. Verglichen mit der proximalen elektrischen Stimulation

können durch die sMS die proximal gelegenen Bereiche der lumbosakralen Nervenwurzeln aktiviert werden, was auch mittels einer entsprechenden Rhizotomie bewiesen werden konnte. Damit bietet die sMS ein nützliches Hilfsmittel bei der Beurteilung der motorischen Nervenwurzelfunktion in Hühnern, was bei der Untersuchung der AvIDP von großer Bedeutung sein wird. Deutliche Vorteile der sMS im Allgemeinen sind zudem sicherlich die im Vergleich zur elektrischen Stimulation relativ schmerzlose Anwendbarkeit, die Tatsache, dass es sich um ein nicht-invasives Verfahren handelt, ihre einfache Handhabung und die gute Reproduzierbarkeit. Nachteilig ist, dass die sMS lediglich einen Einblick in die Leitfähigkeit der motorischen Nervenfasern, nicht jedoch in die zentrale Signalfortleitung bietet. Demgegenüber kann das Ablesen der kranialen SSEPs die Daten der motorischen Nerven durch solche zur zentripetalen Leitungsfähigkeiten sensibler Afferenzen ergänzen und somit auch Auskunft über die Weiterleitung zentraler Impulse geben. Auch wenn die Ableitung des H-Reflexes sowie die Berechnung der SNLG in dieser Studie nicht zur Verfügung standen, sollten die verschiedenen Latenzen des kranialen SSEPs sowie die SSLG ausreichend Informationen über eine mögliche sensible Dysfunktion geben. Dies kann sich in einer Verlängerung der Latenzen bzw. in einer Erniedrigung der SSLG darstellen.

Um den Wert des hier vorgestellten Untersuchungssets abschließend zu beurteilen, bedurfte es im nächsten Schritt der Untersuchung neurologisch betroffener Hühner. Dies ist bereits im Rahmen einer Studie mit an AvIDP erkrankten Tieren durchgeführt worden, wobei die Daten jedoch noch zu einem Manuskript zusammengefasst werden müssen und nicht mehr Bestandteil dieser Dissertation sind. Die Einblicke, die bei diesen Untersuchungen gewonnen werden konnten, lassen erkennen, dass diese Methoden von wertvollem Nutzen in der Charakterisierung klinischer Verläufe von GBS-ähnlichen Polyradikuloneuropathien wie der AvIDP (Bader et al.) oder der klassischen Marekschen Krankheit (Pepose et al. 1981; Stevens et al. 1981) vor allem in Langzeitstudien sein werden.

### **4.3 AvIDP als mögliches spontanes Tiermodell für humane inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathien**

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Induktion der experimentellen autoimmunen Neuritis in Labortieren die am häufigsten genutzte Methode, um anhand eines Tiermodells die in inflammatorischen demyelinisierenden Erkrankungen des PNS ablaufenden immunpathologischen Mechanismen zu untersuchen (Maurer et al. 2002). Trotz der großen histopathologischen Ähnlichkeit zu der AIDP des Menschen gibt es bei der EAN dennoch Einschränkungen. So wird im Rahmen der Entzündungsreaktion häufig auch das ZNS in Mitleidenschaft gezogen – ein Umstand, der bei der humanen Erkrankung äußerst selten zu finden ist (Maier et al. 1997; Muller et al. 2003). Zudem wird bei der EAN ein monokausaler und zudem bekannter Trigger eingesetzt, was schwerlich den natürlichen Erkrankungsprozess widerspiegeln kann (Maurer et al. 2002).

Wie die AIDP des Menschen und auch die EAN ist die AvIDP durch eine Infiltration der peripheren Nerven und Nervenwurzeln mit Lymphozyten und Makrophagen sowie vor allem durch primäre, zellvermittelte Demyelinisierungen gekennzeichnet (Hughes and Cornblath 2005; Maurer et al. 2002). Zudem ist das ZNS im Falle der AvIDP zu keiner Zeit mitbeteiligt, wie es auch für die große Mehrheit der Patienten mit GBS beschrieben ist (Maier et al. 1997; Muller et al. 2003). Im Vergleich zu den experimentellen Immunisierungen, bei denen Reaktionen gegen definierte Epitope und somit monokausal hervorgerufen werden, entwickelt sich die AvIDP spontan und vermutlich aufgrund eines multifaktoriellen Geschehens. Damit spiegelt sie weitaus besser die Feldsituation wider und bietet eine Möglichkeit, ätiologische Faktoren zu untersuchen, indem man empfängliche Tiere unterschiedlichen Erregern und Umweltfaktoren aussetzt und das Umfeld variabel manipuliert.

Ein Nachteil der AvIDP als Tiermodell besteht in der Schwierigkeit, prä- oder subklinische Hühner in Herden und somit auch die sehr frühen Stadien der Immunpathologie – noch vor dem Umschalten von der vermuteten TH1- auf die TH2-medierte Kaskade – zu identifizieren. Auf der anderen Seite überzeugt die AvIDP durch ihre hohe Verfügbarkeit, da trotz der eher geringen Inzidenz von bis zu 3 % allein durch die Größe der Aufzuchttherden eine ausreichend hohe Zahl erkrankter Tiere in den 18 Wochen des Aufzuchtzyklus zu finden ist. Auch ökonomische Überlegungen machen die AvIDP als Tiermodell attraktiv. Betroffene Hühner sind günstig, wenn nicht sogar kostenfrei erhältlich, da ihre Erkrankung sie für den

Aufzuchtbetrieb wirtschaftlich unrentabel macht. Bedingt wird dies dadurch, dass selbst bei leichten Erkrankungsfällen eine fehlende Gewichtszunahme bzw. sogar Gewichtsverlust, stagnierendes Körperwachstum und ein verzögerter, wenn überhaupt stattfindender Eintritt der Legereife zu erwarten ist. Bei voller Ausprägung der Symptome treten zudem tierschutzrelevante Gründe in den Vordergrund. In schweren Fällen führt die Erkrankung zu einem moribunden Zustand, aus dem die Tiere erlöst werden müssen. Dies wird noch dadurch verschärft, dass die Paresen die Tiere daran hindern an Wasser und Futter zu gelangen. Zudem droht Gefahr durch gesunde Tiere, die schwache und kranke Tiere attackieren und zusätzlich schwer verletzen können.

Einen weiteren Vorteil bietet der Umstand, dass mittlerweile die gesamte Genomsequenz der Hühner entschlüsselt werden konnte und zusammen mit zahlreichen molekularen Methoden für die Durchführung von umfassenden genetischen und immunologischen Studien zur Verfügung steht (Consortium 2004). Dies sowie die Möglichkeit anfällige von resistenten Tieren zu unterscheiden, machen das AvIDP-Huhn zu einem wertvollen Modell für weitere Studien im Rahmen der Forschung an inflammatorischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathien des Menschen.

Durch die erfolgreiche Etablierung der oben beschriebenen elektrophysiologischen Methoden zur Untersuchung des Huhns sind die Voraussetzungen erfüllt, den Verlauf der AvIDP im Rahmen von Langzeituntersuchungen zu verfolgen und genau zu charakterisieren. Bereits in den Versuchen an gesunden Hühnern zeigte sich, dass die Größe dieser Tierart einen deutlichen Vorteil bezüglich des Handlings und der Anwendbarkeit der Methoden gegenüber den routinemäßig eingesetzten kleinen Labornagern wie Ratte und Maus hat. Für die Berechnung der MNLG zeigt sich dies in einem deutlich größeren Abstand zwischen der proximalen und distalen Stimulationselektrode, was Messfehler verringern kann. Auch bei der Magnetstimulation wird durch die vergleichsweise größere Distanz zwischen der Position der Magnetspule und der Ableitungsstelle im Muskel die Gefahr einer direkten Stimulation des Muskels deutlich vermindert. Als weiterer Pluspunkt stellte sich bei den Hühnern die gute Verträglichkeit der Isofluran-Narkose dar. Die kurze Anflutungszeit, die benötigt wurde um ein adäquates Narkosestadium zu erreichen, sowie die rasch eintretende Erholung innerhalb weniger Minuten nach Beendigung der Isofluran-Zufuhr, sicherten eine geringe Belastung der Tiere. So trat in den weit über 100 Vollnarkosen, die im Rahmen des Projektes durchgeführt

---

wurden, kein einziger Narkosezwischenfall ein, was auch aus tierschutzrechtlicher Sicht hervorgehoben werden soll.

#### 4.4 AvIDP: Perspektive und zukünftige Projekte

Die erfolgreiche Etablierung geeigneter elektrophysiologischer Methoden zur Untersuchung der Funktion motorischer und sensibler Fasern des N. tibialis/ischiadicus des Huhns ebnete den Weg zur weiteren Erforschung des Krankheitsverlaufs der AvIDP. Bereits durchgeführte elektrophysiologische Messungen an AvIDP-erkrankten Hühnern konnten eine deutliche Beeinträchtigung sowohl der motorischen als auch der sensiblen peripheren Nervenfasern – insbesondere im Bereich der Nervenwurzeln – offen legen. Partielle Nervenblocks und eine deutliche Erniedrigung der Amplituden gaben klare Hinweise auf den demyelinisierenden Charakter der Schädigung motorischer Fasern. Die auffallende, im weiteren Verlauf zunehmende, temporale Dispersion, eine Verlängerung der distal-motorischen Latenzen, und zum Teil die Erniedrigung der MNLG zeigten wiederum remyelinisierende Prozesse an. Das vollständige Fehlen messbarer SSEPs oder verlängerte Latenzen der kranialen SSEPs und deutlich erniedrigte SSLGs bewiesen eine Involvierung der sensiblen Fasern sowie ebenfalls den Eintritt in die Phase der Remyelinisierung. In Verlaufsuntersuchungen zeigte sich, dass das klinische Bild deutlich mit den elektrophysiologischen Werten korreliert und mittels der elektrodiagnostischen Untersuchungen eine quantitative Darstellung des Gesundheitsstatus möglich ist. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die AvIDP klinisch mit drei unterschiedlichen Verlaufsformen präsentieren kann: (1) einer progressiven Remission, z. T. mit völliger Wiederherstellung der Nervenfunktionalität; (2) einer progressiven Verschlechterung bis hin zum moribunden Status und Tod; (3) ein relapsierender Verlauf. Die vorliegenden Ergebnisse werden zurzeit ausgewertet, so dass sie im Anschluss publiziert werden können. Mittels der elektrophysiologischen Untersuchung ist es nun möglich Veränderungen im Verlauf der AvIDP zu verfolgen. Da ein autoimmuner Hintergrund vermutet wird, liegt es nahe Behandlungsversuche mit immunsuppressiven Medikamenten wie Kortikosteroiden oder Cyclosporin A oder mit intravenöser Immunglobulintherapie zu starten und mögliche Einflüsse quantifizierbar darzustellen. Dies könnte den Wert der AvIDP als translationales Modells für Behandlungsversuche GBS-ähnlicher Erkrankungen noch deutlich erhöhen.

Hinsichtlich der Pathogenese bedarf es ebenfalls weiterer Forschung, wobei ein Ansatzpunkt die Untersuchung des vermuteten autoimmunen Hintergrunds sein kann. Der Nachweis von autoreaktiven T- und/oder B-Zellen bietet sich hierbei ebenso an wie die Suche nach einer möglichen Beteiligung des Komplementsystems. Anhand einer Analyse des Bindungsmusters der Antikörper wie sie in früheren Studien beschrieben wurde (Deeg et al. 2006), können

mögliche Autoantigene identifiziert werden, die in das Erkrankungsgeschehen involviert sind (s. unten).

Die Ätiologie der AvIDP ist bisher ungeklärt. Die Ähnlichkeiten zur klassischen Marekschen Krankheit und die Tatsache, dass im peripheren Nervengewebe von AvIDP-erkrankten Tieren mittels PCR Rispens-Vakzine detektiert wurden, führten zu der Arbeitshypothese (Abbildung 5), dass attenuierte MDV-Impfviren bei bestimmten Genotypen einen Neurotropismus entwickeln und im Folgenden die peripheren Nerven befallen. Möglicherweise teilen sich MDV-Viren bestimmte Oberflächenstrukturen mit Bestandteilen der Myelinscheide, so dass im Sinne einer molekularen Mimikry eine autoimmune Reaktion ausgelöst wird, die zu den beschriebenen Veränderungen der AvIDP führen. Um der Theorie der molekularen Mimikry nachzugehen, ist es notwendig, zunächst das oder die Autoantigene zu identifizieren. Im Falle der Identifizierung von Autoantigenen könnte im Folgenden die Aufschlüsselung der autoimmunen Zielepitope folgen, um sie anschließend mit dem MDV-Genom abzugleichen.

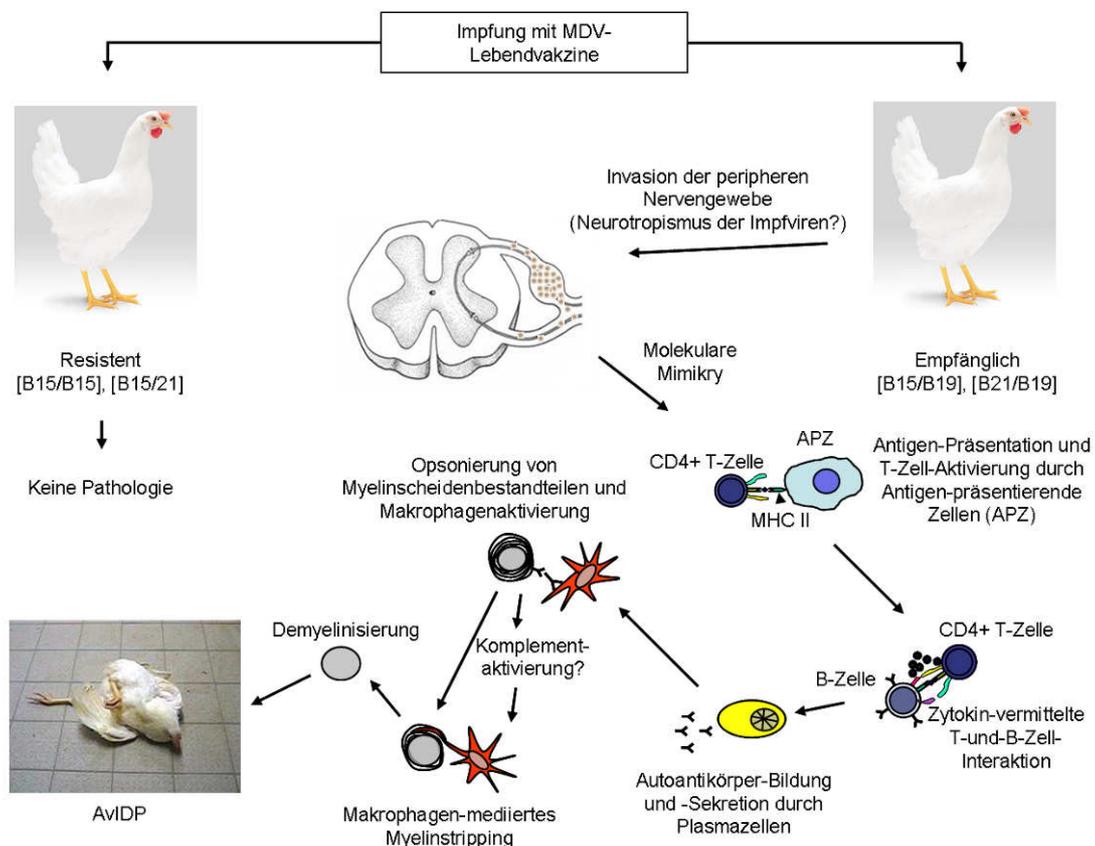


Abbildung 5 Arbeitshypothese zur möglichen Pathogenese und Ätiologie der AvIDP

## 5 Zusammenfassung

Seit einigen Jahren wird ein paretisches Syndrom in juvenilen Weißen Leghorn-Hühnern beobachtet. Bereits 2001 wurde diese Erkrankung unter der Bezeichnung „Periphere Neuropathie“ intensiv pathologisch und virologisch untersucht. Einerseits wurden deutliche Ähnlichkeiten zur Marekschen Krankheit des Geflügels aufgedeckt, wobei jedoch ein Test auf das entsprechende Marek's Disease Virus (MDV) negativ ausfiel. Andererseits konnten auch beachtliche Parallelen zu humanen inflammatorischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathien wie dem Guillain-Barré-Syndrom festgestellt werden.

Ziel unserer Studie war es zunächst tiefgehende Einblicke in die immunpathologischen und –physiologischen Vorgänge während des Krankheitsprozesses – insbesondere hinsichtlich möglicher Ähnlichkeiten zu den humanen IDPs – zu nehmen. Hierfür wurde eine Vielfalt an Methoden durchgeführt: Lichtmikroskopische Untersuchungen von Paraffin- und Semidünnschnitten sowie Nervenzupfpräparaten, Transmissionselektronenmikroskopie, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie, Zytokinexpressionsanalyse, Blutgruppenhaplotypisierung sowie eine diskriminierende PCR auf das MDV.

Histopathologisch stellte sich die Erkrankung als inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie mit multifokalen Veränderungen der peripheren Nerven und insbesondere Nervenwurzeln samt assoziierten Ganglien dar. Gekennzeichnet ist sie durch lymphohistiozytäre und plasmazelluläre Infiltration, primäre Demyelinisierungen der mittel- und großkalibrigen Fasern mit Makrophagen-mediertem Myelinstripping, begleitender Schwannzellhypertrophie und –proliferation sowie einer Verbreiterung der endoneuralen Kollagenscheide, Remyelinisierungen und seltener auch dem Auftreten von *Onion Bulbs*. Die Immunzellphänotypisierung identifizierte den überwiegenden Teil der beteiligten Entzündungszellen als Lymphozyten, wobei T- und B-Zellen etwa gleichstark vertreten waren, sowie einen kleinen Anteil als Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems. Der zusätzliche Nachweis von Autoimmunantikörpern an den Myelinscheiden peripherer Nerven ließ auf ein autoimmunes Geschehen schließen. Die Zytokinexpressionsanalyse bestätigte die starke Beteiligung der T- und B-Zellen an dem Geschehen und gab Hinweise auf eine beginnende Immunmodulation. Im Gesamten betrachtet, wiesen die Daten darauf hin, dass die Hühner sich in einem Krankheitsstadium befanden, in dem die vermutlich initial dominierende TH1-medierte Immunantwort übergang in eine TH2-medierte Reaktion, wie es auch für das GBS des Menschen beschrieben wurde. Feldstämme des MDV Serotyp 1 konnten auch in dieser Studie als Erreger ausgeschlossen werden. Die Rolle der MDV-

Impfstämme, die in den betroffenen peripheren Nervenwurzeln nachgewiesen werden konnten, ist bisher unbekannt, könnte aber Hinweis auf eine Beteiligung dieser attenuierten Viren geben.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse erlaubten einen intensiven Einblick in die immunpathologischen Abläufe der AvIDP und ließen eine verblüffende Ähnlichkeit zur Histopathologie und Immunpathologie der humanen IDPs erkennen. Letzteres führte zu der Entscheidung die Periphere Neuropathie in „aviäre inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuritis“ oder AvIDP umzubenennen, was auch den Wert dieser Erkrankung als mögliches spontanes Tiermodell für IDPs des Menschen hervorhebt.

Da elektrophysiologische Untersuchungen fester Bestandteil der Routinediagnostik bei humanen IDPs sind, war es ein weiteres Ziel unserer Studie, entsprechende Verfahren zur Untersuchung der Funktionalität des N. tibialis/ischiadicus und insbesondere seiner lumbosakralen Nervenwurzeln beim Huhn zu etablieren. Durch ihre Anwendung sollte insbesondere im Rahmen von Langzeituntersuchungen neben klinischen Parametern eine quantifizierbare Darstellung der sensiblen und motorischen Nervenfasernfunktionen sichergestellt werden. Hierfür wurden verschiedene Methoden der elektrischen Nadel- aber auch der elektromagnetisch induzierten Stimulation des N. tibialis/ischiadicus getestet und wo nötig modifiziert oder neu beim Huhn eingeführt. Letztendlich umfasste das Untersuchungsset folgende Verfahren: (1) Ableitung kranialer somatosensibel evozierter Potentiale nach Stimulation des N. tibialis/ischiadicus sowie die Bestimmung der neu eingeführten somatosensiblen Leitungsgeschwindigkeit; (2) Ableitung elektrisch induzierter Muskelsummenaktionspotentiale im Musculus gastrocnemius nach proximaler und distaler Stimulation des N. tibialis/ischiadicus sowie die Bestimmung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit nach Nadelstimulation; (3) Ableitung magnetisch evozierte Muskelsummenaktionspotentiale im Musculus gastrocnemius nach Stimulation der lumbosakralen Ventralwurzeln des N. tibialis/ischiadicus mittels einer Achterspule. Mittels der genannten Methoden wurde anschließend eine Gruppe Kontrollhühner im Alter von 6, 8, 10 und 15 Lebenswochen untersucht. Die dabei erhaltenen sensiblen und motorischen Potentiale wurden anhand definierter Parameter analysiert und die Resultate innerhalb der Altersgruppen gemittelt, um insbesondere in Langzeitstudien mit AvIDP-erkrankten Tieren sowie im Rahmen der Diagnostik anderer neurologischer Geflügelerkrankungen als altersabhängige Referenzwerte zu dienen.

## 6 Summary

Morphological characterisation of the avian inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AvIDP) of the White Leghorn breed and establishment of electrophysiological testing for longitudinal studies

The aim of the present study was to gain a more detailed insight into the immunopathology of an avian paretic syndrome, formally called “peripheral neuropathy”, in White Leghorn chickens and to characterise its possible similarity to human inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathies (IDPs). After neurological characterisation, the nervous system of 20 paretic and 20 control chickens was subjected to morphological examination, flow cytometry, and quantitative PCR for proinflammatory cytokines. Furthermore, the animals underwent bloodgroup haplotyping and PCR for Marek’s disease virus. Histopathologically, this peripheral nerve disease resembles IDPs of other mammalian species such as humans, dogs, and cats. At late-acute stages the disease is mediated by T cells, B cells and macrophages with evidence of a TH1 to TH2-shifting similar to the recovery phase in human Guillain-Barré syndrome and experimental allergic neuritis. It proved not possible to identify the aetiology of this disease, even though an immune response gene associated with the avian MHCII complex was detected. As is in human IDPs the immunological trigger remains to be further clarified.

The second study was dedicated to establish an electrophysiologic setting by which the clinical course can be monitored *in vivo*. For this purpose, a panel of electrophysiological methods including spinal magnetic stimulation were tested in 12 chickens under general anaesthesia. Reproducible data were obtained by: (1) recording of cranial somatosensory evoked potentials (SSEPs) after tibial/sciatic nerve stimulation; (2) recording of electrically induced gastrocnemius compound muscle action potentials (CMAPs) after proximal and distal tibial/sciatic nerve stimulation by needle electrodes; (3) recording of magnetically evoked gastrocnemius compound muscle action potentials after stimulation of the lumbosacral nerve roots of the tibial/sciatic nerve. Therefore, the most reliable parameters to be used diagnostically were in (1) onset latency, peak latencies, and amplitude of SSEPs, and somatosensory conduction velocity; in (2) motor nerve conduction velocity; in (2) and (3) onset latency, peak-to-peak amplitude, negative area, and duration of CMAPs. Thereby base values were established for the ages of 6, 8, 10, and 15 weeks.

## 7 Literaturverzeichnis

(CDC) CfDcAP. Update: Guillain-Barre syndrome among recipients of Menactra meningococcal conjugate vaccine--United States, June 2005-September 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55: 1120-1124, 2006.

**Abromson-Leeman S, Bronson R, and Dorf ME.** Experimental autoimmune peripheral neuritis induced in BALB/c mice by myelin basic protein-specific T cell clones. *J Exp Med* 182: 587-592, 1995.

**Akiyama Y, and Kato S.** Two cell lines from lymphomas of Marek's disease. *Biken J* 17: 105-116, 1974.

**Albers JW, Donofrio PD, and McGonagle TK.** Sequential electrodiagnostic abnormalities in acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 8: 528-539, 1985.

**Albert LJ, and Inman RD.** Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 341: 2068-2074, 1999.

**Allison TJ, and Garboczi DN.** Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Mol Immunol* 38: 1051-1061, 2002.

**Ang CW, Jacobs BC, and Laman JD.** The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol* 25: 61-66, 2004.

**Ang CW, Laman JD, Willison HJ, Wagner ER, Endtz HP, De Klerk MA, Tio-Gillen AP, Van den Braak N, Jacobs BC, and Van Doorn PA.** Structure of Campylobacter jejuni lipopolysaccharides determines antiganglioside specificity and clinical features of Guillain-Barre and Miller Fisher patients. *Infect Immun* 70: 1202-1208, 2002.

**Arnason BGW.** *Inflammatory polyradiculoneuropathies*. Philadelphia: W. B. Sanders, 1975, p. 1110-1148.

**Bacon LD, and Witter RL.** B haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease vaccines in commercial chickens. *Poult Sci* 73: 481-487, 1994.

**Bacon LD, Witter RL, and Silva RF.** Characterisation and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens. *Avian Pathology* 30: 487-499, 2001.

**Bader SR, Kothlow S, Trapp S, Schwarz SC, Philipp HC, Weigend S, Sharifi AR, Preisinger R, Schmahl W, Kaspers B, and Matiasek K.** Acute paretic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. *J Neuroinflammation* 7: 7, 2010.

**Bader SR, Kothlow S, Trapp S, Schwarz SC, Philipp HC, Weigend S, Sharifi AR, Preisinger R, Schmahl W, Kaspers B, and Matiasek K.** Acute paretic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. *J Neuroinflammation* 7: 7.

**Bagley RS, Wheeler SJ, and Gay JM.** Effects of age on temperature-related variation in motor nerve conduction velocity in healthy chickens. *Am J Vet Res* 56: 819-821, 1995.

- Bagley RS, Wheeler SJ, and James RL.** Age-related effects on motor nerve conduction velocity in chickens. *Am J Vet Res* 53: 1309-1311, 1992.
- Bagley RS, Wheeler SJ, and James RL.** Maturational changes in F waves in growing chickens. *Am J Vet Res* 54: 805-807, 1993.
- Behar SM, and Porcelli SA.** Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens. *Arthritis Rheum* 38: 458-476, 1995.
- Berthold CH, Nilsson I, and Rydmark M.** Axon diameter and myelin sheath thickness in nerve fibres of the ventral spinal root of the seventh lumbar nerve of the adult and developing cat. *J Anat* 136: 483-508, 1983.
- Besalti O, Ozak A, Senel OO, Eminaga S, Gokce AP, and Sener HO.** Scalp and Thoracolumbar Recorded Somatosensory Potentials Evoked by Tibial Nerve Stimulation in Cats. *Veterinary Neurology and Neurosurgery Journal* 9: 2007.
- Bethke RM, and Record PR.** The relation of riboflavin to growth and curled-toe paralysis in chicks. *Poultry Science* 21: 1942.
- Biggs PM, Shilleto RFW, Lawn AM, and Cooper DM.** Idiopathic polyneuritis in SPF chickens. *Avian Pathology* 11: 163-178, 1982.
- Birrell AM, Heffernan SJ, Anselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, and Yue DK.** Functional and structural abnormalities in the nerves of type I diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 43: 110-116, 2000.
- Birren JE, and Wall PD.** Age changes in conduction velocity, refractory period, number of fibers, connective tissue space and blood vessels in sciatic nerve of rats. *J Comp Neurol* 104: 1-16, 1956.
- Bischoff C, Meyer BU, Machetanz J, and Conrad B.** The value of magnetic stimulation in the diagnosis of radiculopathies. *Muscle Nerve* 16: 154-161, 1993.
- Blank M, Barzilai O, and Shoenfeld Y.** Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 32: 111-118, 2007.
- Bogliun G, and Beghi E.** Incidence and clinical features of acute inflammatory polyradiculoneuropathy in Lombardy, Italy, 1996. *Acta Neurol Scand* 110: 100-106, 2004.
- Bolton CF, and Carter KM.** Human sensory nerve compound action potential amplitude: variation with sex and finger circumference. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 43: 925-928, 1980.
- Bradley LM, Dalton DK, and Croft M.** A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* 157: 1350-1358, 1996.
- Brannagan TH, 3rd, and Zhou Y.** HIV-associated Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 208: 39-42, 2003.
- Braund KG, McGuire JA, and Lincoln CE.** Age-related changes in peripheral nerves of the dog. II. A morphologic and morphometric study of cross-sectional nerve. *Vet Pathol* 19: 379-398, 1982.

- Braund KG, Vallat JM, Steiss JE, Panangala VS, and Zimmer PL.** Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in dogs and cats. *J Peripher Nerv Syst* 1: 149-155, 1996.
- Brenner DJ, Larsen RS, Pascoe PJ, Wack RF, Williams DC, and Dickinson PJ.** Somatosensory evoked potentials and sensory nerve conduction velocities in the thoracic limb of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Am J Vet Res* 69: 1476-1480, 2008.
- Bridle BW, Julian R, Shewen PE, Vaillancourt JP, and Kaushik AK.** T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. *Can J Vet Res* 70: 183-190, 2006.
- Briles WE, Stone HA, and Cole RK.** Marek's disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines. *Science* 195: 193-195, 1977.
- Britton TC, Meyer BU, Herdmann J, and Benecke R.** Clinical use of the magnetic stimulator in the investigation of peripheral conduction time. *Muscle Nerve* 13: 396-406, 1990.
- Bromberg MB, and Spiegelberg T.** The influence of active electrode placement on CMAP amplitude. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 105: 385-389, 1997.
- Brown WF, and Snow R.** Patterns and severity of conduction abnormalities in Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54: 768-774, 1991.
- Buckmaster AE, Scott SD, Sanderson MJ, Bournnell ME, Ross NL, and Binns MM.** Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: implications for herpesvirus classification. *J Gen Virol* 69 ( Pt 8): 2033-2042, 1988.
- Burgess SC, Basaran BH, and Davison TF.** Resistance to Marek's disease herpesvirus-induced lymphoma is multiphasic and dependent on host genotype. *Vet Pathol* 38: 129-142, 2001.
- Cai Z, Blumbergs PC, Finnie JW, Manavis J, and Thompson PD.** Novel fibroblastic onion bulbs in a demyelinating avian peripheral neuropathy produced by riboflavin deficiency. *Acta Neuropathol* 114: 187-194, 2007.
- Cai Z, Blumbergs PC, Finnie JW, Manavis J, and Thompson PD.** Selective vulnerability of peripheral nerves in avian riboflavin deficiency demyelinating polyneuropathy. *Vet Pathol* 46: 88-96, 2009.
- Cai Z, Finnie JW, and Blumbergs PC.** Avian riboflavin deficiency: an acquired tomaculous neuropathy. *Vet Pathol* 43: 780-781, 2006a.
- Cai Z, Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J, Ghabriel MN, and Thompson PD.** Early paranodal myelin swellings (tomacula) in an avian riboflavin deficiency model of demyelinating neuropathy. *Exp Neurol* 198: 65-71, 2006b.
- Calnek BW, Schat KA, and Fabricant J.** Modification of Marek's disease pathogenesis by in ovo infection or prior vaccination. In: *Viruses in Naturally Occuring Cancers Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*. Cold Spring Harbor, NY, USA: 1980, p. 185-197.
- Calnek BW, and Witter RL.** Marek's disease. In: *Diseases of Poultry*, edited by Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, R. ML, and Saif YM. Ames, IA: Iowa State University Press, 1997, p. 369-413.

**Campbell WW, Jr., Ward LC, and Swift TR.** Nerve conduction velocity varies inversely with height. *Muscle Nerve* 4: 520-523, 1981.

**Cappelen-Smith C, Kuwabara S, Lin CS, Mogyoros I, and Burke D.** Activity-dependent hyperpolarization and conduction block in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 48: 826-832, 2000.

**Char D, Sanchez P, Chen CL, Bucy RP, and Cooper MD.** A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody. *J Immunol* 145: 3547-3555, 1990.

**Chen CH, Sowder JT, Lahti JM, Cihak J, Losch U, and Cooper MD.** TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2351-2355, 1989.

**Chen CL, Ager LL, Gartland GL, and Cooper MD.** Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *J Exp Med* 164: 375-380, 1986.

**Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, and Kanazawa I.** Ganglioside composition of the human cranial nerves, with special reference to pathophysiology of Miller Fisher syndrome. *Brain Res* 745: 32-36, 1997.

**Cho KJ.** Motor nerve conduction velocity in newborn infants and children. *Yonsei Med J* 28: 172-175, 1987.

**Chokroverty S.** Magnetic stimulation of the human peripheral nerves. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 29: 409-416, 1989.

**Chokroverty S, Flynn D, Picone MA, Chokroverty M, and Belsh J.** Magnetic coil stimulation of the human lumbosacral vertebral column: site of stimulation and clinical application. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 89: 54-60, 1993.

**Chokroverty S, Sachdeo R, Dilullo J, and Duvoisin RC.** Magnetic stimulation in the diagnosis of lumbosacral radiculopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52: 767-772, 1989.

**Chou SM.** Immunohistochemical and ultrastructural classification of peripheral neuropathies with onion-bulbs. *Clin Neuropathol* 11: 109-114, 1992.

**Chroni E, Hall SM, and Hughes RA.** Chronic relapsing axonal neuropathy: a first case report. *Ann Neurol* 37: 112-115, 1995.

**Cihak J, Ziegler-Heitbrock HW, Trainer H, Schraner I, Merkschlager M, and Losch U.** Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. *Eur J Immunol* 18: 533-537, 1988.

**Clippinger TL, Bennett RA, and Platt SR.** The avian neurologic examination and ancillary neurodiagnostic techniques: a review update. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 10: 803-836, vi, 2007.

**Clippinger TL, Platt SR, Bennett RA, and Chrisman CL.** Electrodiagnostic evaluation of peripheral nerve function in rheas and barred owls. *Am J Vet Res* 61: 469-472, 2000.

**Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, and Aversa G.** IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol* 5: 657-663, 1993.

**Connolly AM, Pestronk A, Trotter JL, Feldman EL, Cornblath DR, and Olney RK.** High-titer selective serum anti-beta-tubulin antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 43: 557-562, 1993.

**Consortium ICGS.** Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695-716, 2004.

**Cosi V, and Versino M.** Guillain-Barre syndrome. *Neurol Sci* 27 Suppl 1: S47-51, 2006.

**Cottrell L.** Histologic variations with age in apparently normal peripheral nerve trunks. *Arch Neurol Psychiat* 43: 1138-1150, 1940.

**Csurhes PA, Sullivan AA, Green K, Pender MP, and McCombe PA.** T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 1431-1439, 2005.

**Cuddon PA, Delauche AJ, and Hutchison JM.** Assessment of dorsal nerve root and spinal cord dorsal horn function in clinically normal dogs by determination of cord dorsum potentials. *Am J Vet Res* 60: 222-226, 1999.

**Dahle C, Ekerfelt C, Vrethem M, Samuelsson M, and Ernerudh J.** T helper type 2 like cytokine responses to peptides from P0 and P2 myelin proteins during the recovery phase of Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 153: 54-60, 1997.

**Davidson I, Weisman Y, Perl S, and Malkinson M.** Differential diagnosis of two paralytic conditions affecting young chickens with emphasis on PCR findings. *Avian Pathol* 27: 417-419, 1998.

**De Jesus PV, Hausmanowa-Petrusewicz I, and Barchi RL.** The effect of cold on nerve conduction of human slow and fast nerve fibers. *Neurology* 23: 1182-1189, 1973.

**de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, and de Vries JE.** Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220, 1991.

**Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, Goebel TW, Olazabal U, Gerhards H, Reese S, Stangassinger M, Kaspers B, and Ueffing M.** Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5: 1462-1470, 2006.

**Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, and Ferrara P.** Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 179: 135-143, 1994.

**Degen WG, Daal N, Rothwell L, Kaiser P, and Schijns VE.** Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet Microbiol* 105: 163-167, 2005.

- Doi K, Kojima A, Naito M, and Kato S.** Histopathological changes occasionally found in the peripheral nerve of chickens free from Marek's disease. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 13: 227-228, 1973.
- Dowling PC, Bosch VV, Cook SD, and Chmel H.** Serum immunoglobulins in Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 57: 435-440, 1982.
- Dowling PC, and Cook SD.** Role of infection in Guillain-Barre syndrome: laboratory confirmation of herpesviruses in 41 cases. *Ann Neurol* 9 Suppl: 44-55, 1981.
- Dumitru D, and DeLisa JA.** AAEM Minimonograph #10: volume conduction. *Muscle Nerve* 14: 605-624, 1991.
- Dyck PJ, and Chalk CH.** The 10 P's: a mnemonic helpful in characterization and differential diagnosis of peripheral neuropathy. *Neurology* 42: 14-18, 1992.
- Dyck PJ, Karnes J, Lais A, Lofgren EP, and Stevens JG.** *Pathological Alterations of the Peripheral Nervous System of Humans*. Philadelphia: WB Saunders, 1984.
- Ekerfelt C, Dahle C, Weissert R, Kvarnstrom M, Olsson T, and Ernerudh J.** Transfer of myelin-specific cells deviated in vitro towards IL-4 production ameliorates ongoing experimental allergic neuritis. *Clin Exp Immunol* 123: 112-118, 2001.
- Enders U, Karch H, Toyka KV, Michels M, Zielasek J, Pette M, Heesemann J, and Hartung HP.** The spectrum of immune responses to *Campylobacter jejuni* and glycoconjugates in Guillain-Barre syndrome and in other neuroimmunological disorders. *Ann Neurol* 34: 136-144, 1993.
- Erhard MH, Von Quistorp I, Schraner I, Jungling A, Kaspers B, Schmidt P, and Kuhlmann R.** Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies. *Poult Sci* 71: 302-310, 1992.
- Erhardt W, Henke J, and Haberstroh J.** *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: Sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Schattauer, 2004.
- Esteghamati A, Gouya MM, Keshtkar AA, and Mahoney F.** Relationship between occurrence of Guillain-Barre syndrome and mass campaign of measles and rubella immunization in Iranian 5-14 years old children. *Vaccine* 26: 5058-5061, 2008.
- Fiorentino DF, Bond MW, and Mosmann TR.** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095, 1989.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, and O'Garra A.** IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444-3451, 1991.
- Fredman P, Vedeler CA, Nyland H, Aarli JA, and Svennerholm L.** Antibodies in sera from patients with inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy react with ganglioside LM1 and sulphatide of peripheral nerve myelin. *J Neurol* 238: 75-79, 1991.

- Friedman Y, King BS, and Rampil IJ.** Nitrous oxide depresses spinal F waves in rats. *Anesthesiology* 85: 135-141, 1996.
- Fross RD, and Daube JR.** Neuropathy in the Miller Fisher syndrome: clinical and electrophysiologic findings. *Neurology* 37: 1493-1498, 1987.
- Fulton JE, Juul-Madsen HR, Ashwell CM, McCarron AM, Arthur JA, O'Sullivan NP, and Taylor RL, Jr.** Molecular genotype identification of the Gallus gallus major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 58: 407-421, 2006.
- Gabriel CM, Gregson NA, and Hughes RA.** Anti-PMP22 antibodies in patients with inflammatory neuropathy. *J Neuroimmunol* 104: 139-146, 2000.
- Gabriel CM, Hughes RA, Moore SE, Smith KJ, and Walsh FS.** Induction of experimental autoimmune neuritis with peripheral myelin protein-22. *Brain* 121 ( Pt 10): 1895-1902, 1998.
- Garcia A, Calleja J, Antolin FM, and Berciano J.** Peripheral motor and sensory nerve conduction studies in normal infants and children. *Clin Neurophysiol* 111: 513-520, 2000.
- Geleijns K, Brouwer BA, Jacobs BC, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM, and van Doorn PA.** The occurrence of Guillain-Barre syndrome within families. *Neurology* 63: 1747-1750, 2004.
- Gold R, Hartung HP, and Toyka KV.** Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 6: 88-91, 2000.
- Goodchild WM.** Some observations on Marek's disease (fowl paralysis). *Vet Rec* 84: 87-89, 1969.
- Goodwin MA, Dubey JP, and Hatkin J.** Toxoplasma gondii peripheral neuritis in chickens. *J Vet Diagn Invest* 6: 382-385, 1994.
- Gregory NG, and Wotton SB.** Effect of electrical stunning on somatosensory evoked potentials in chickens. *Br Vet J* 145: 159-164, 1989.
- Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, Mishu B, Cornblath DR, Macko C, McKhann GM, and Asbury AK.** Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 39: 17-28, 1996.
- Griffin JW, Li CY, Ho TW, Xue P, Macko C, Gao CY, Yang C, Tian M, Mishu B, and Cornblath DR.** Guillain-Barre syndrome in northern China. The spectrum of neuropathological changes in clinically defined cases. *Brain* 118 ( Pt 3): 577-595, 1995.
- Guillain G, Barré JA, and Strohl A.** Sur une syndrome de radiculonebrite avec hyperalbuminose du liquide cephalo-rachidien sans reaction cellulaire. Remarques sur les caracteres cliniques et graphiques des reflexes tendineux. *Bulletin de Societe des Medicines Hopitals de Paris* 40: 1462, 1916.
- Gupta D, Nair M, Baheti NN, Sarma PS, and Kuruvilla A.** Electrodiagnostic and clinical aspects of Guillain-Barre syndrome: an analysis of 142 cases. *J Clin Neuromuscul Dis* 10: 42-51, 2008.

**Hadden RD, and Gregson NA.** Guillain-Barre syndrome and Campylobacter jejuni infection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 145S-154S, 2001.

**Hadden RD, and Hughes RA.** Management of inflammatory neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74 Suppl 2: ii9-ii14, 2003.

**Hadden RD, Karch H, Hartung HP, Zielasek J, Weissbrich B, Schubert J, Weishaupt A, Cornblath DR, Swan AV, Hughes RA, and Toyka KV.** Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 56: 758-765, 2001.

**Hafer-Macko C, Hsieh ST, Li CY, Ho TW, Sheikh K, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, and Griffin JW.** Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Ann Neurol* 40: 635-644, 1996a.

**Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, Ho TW, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, and Griffin JW.** Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 39: 625-635, 1996b.

**Hahn AF.** Experimental allergic neuritis (EAN) as a model for the immune-mediated demyelinating neuropathies. *Rev Neurol (Paris)* 152: 328-332, 1996.

**Hahn AF, Feasby TE, Steele A, Lovgren DS, and Berry J.** Demyelination and axonal degeneration in Lewis rat experimental allergic neuritis depend on the myelin dosage. *Lab Invest* 59: 115-125, 1988.

**Hao Q, Saida T, Kuroki S, Nishimura M, Nukina M, Obayashi H, and Saida K.** Antibodies to gangliosides and galactocerebroside in patients with Guillain-Barre syndrome with preceding Campylobacter jejuni and other identified infections. *J Neuroimmunol* 81: 116-126, 1998.

**Hartung HP, Reiners K, Michels M, Hughes RA, Heidenreich F, Zielasek J, Enders U, and Toyka KV.** Serum levels of soluble E-selectin (ELAM-1) in immune-mediated neuropathies. *Neurology* 44: 1153-1158, 1994.

**Hausmann O, Min K, Boni T, Erni T, Dietz V, and Curt A.** SSEP analysis in surgery of idiopathic scoliosis: the influence of spine deformity and surgical approach. *Eur Spine J* 12: 117-123, 2003.

**Heilbrun ME, Tsuruda JS, Townsend JJ, and Heilbrun MP.** Intra-neural perineurioma of the common peroneal nerve. Case report and review of the literature. *J Neurosurg* 94: 811-815, 2001.

**Heinrich PC, Castell JV, and Andus T.** Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265: 621-636, 1990.

**Hemachudha T, Griffin DE, Chen WW, and Johnson RT.** Immunologic studies of rabies vaccination-induced Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 38: 375-378, 1988.

**Ho TW, Mishu B, Li CY, Gao CY, Cornblath DR, Griffin JW, Asbury AK, Blaser MJ, and McKhann GM.** Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to Campylobacter jejuni infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 118 ( Pt 3): 597-605, 1995.

- Hojberg L, Sondergard E, and Pedersen C.** A case of Epstein-Barr virus infection complicated with Guillain-Barre syndrome involving several cranial nerves. *Scand J Infect Dis* 37: 522-524, 2005.
- Holliday TA, Weldon NE, and Ealand BG.** Percutaneous recording of evoked spinal cord potentials of dogs. *Am J Vet Res* 40: 326-333, 1979.
- Hort-Legrand C, Noah L, Meriguet E, and Mesangeau D.** Motor and sensory nerve conduction velocities in Yucatan minipigs. *Lab Anim* 40: 53-57, 2006.
- Hughes R, Sanders E, Hall S, Atkinson P, Colchester A, and Payan P.** Subacute idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *Arch Neurol* 49: 612-616, 1992.
- Hughes RA, Allen D, Makowska A, and Gregson NA.** Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 11: 30-46, 2006.
- Hughes RA, and Cornblath DR.** Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 366: 1653-1666, 2005.
- Hughes RA, Hadden RD, Gregson NA, and Smith KJ.** Pathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 100: 74-97, 1999.
- Hughes RA, and Rees JH.** Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis* 176 Suppl 2: S92-98, 1997.
- Huxley AF, and Stämpfli R.** Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J Physiol* 108: 315-339, 1949.
- Ilyas AA, Mithen FA, Dalakas MC, Wargo M, Chen ZW, Bielory L, and Cook SD.** Antibodies to sulfated glycolipids in Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 105: 108-117, 1991.
- Inglis HR, Csurhes PA, and McCombe PA.** Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 419-422, 2007.
- Ito M, Kuwabara S, Odaka M, Misawa S, Koga M, Hirata K, and Yuki N.** Bickerstaff's brainstem encephalitis and Fisher syndrome form a continuous spectrum: clinical analysis of 581 cases. *J Neurol* 255: 674-682, 2008.
- Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meche FG, Herbrink P, Schmitz PI, de Klerk MA, and van Doorn PA.** The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: a case-control study. *Neurology* 51: 1110-1115, 1998.
- Jander S, and Stoll G.** Interleukin-18 is induced in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 114: 253-258, 2001.
- Johnson EW, and Olsen KJ.** Clinical value of motor nerve conduction velocity determination. *J Am Med Assoc* 172: 2030-2035, 1960.
- Johnson WD, and Storts RW.** Peripheral neuropathy associated with dietary riboflavin deficiency in the chicken. I. Light microscopic study. *Vet Pathol* 25: 9-16, 1988.

**Jortner BS, Cherry J, Lidsky TI, Manetto C, and Shell L.** Peripheral neuropathy of dietary riboflavin deficiency in chickens. *J Neuropathol Exp Neurol* 46: 544-555, 1987.

**Julian RJ.** Peripheral neuropathy causing "range paralysis" in leghorn pullets (abstract). In: *Proceedings of the 129th Annual Meeting American Veterinary Medical Association*. Boston, MA: 1992, p. 130.

**Kaida K, Ariga T, and Yu RK.** Antiganglioside antibodies and their pathophysiological effects on Guillain-Barre syndrome and related disorders--a review. *Glycobiology* 19: 676-692, 2009.

**Kaji R.** Physiology of conduction block in multifocal motor neuropathy and other demyelinating neuropathies. *Muscle Nerve* 27: 285-296, 2003.

**Kaldor J, Pritchard H, Serpell A, and Metcalf W.** Serum antibodies in Campylobacter enteritis. *J Clin Microbiol* 18: 1-4, 1983.

**Kaldor J, and Speed BR.** Guillain-Barre syndrome and Campylobacter jejuni: a serological study. *Br Med J (Clin Res Ed)* 288: 1867-1870, 1984.

**Kalita J, Misra UK, and Das M.** Neurophysiological criteria in the diagnosis of different clinical types of Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 289-293, 2008.

**Kaplan JE, Katona P, Hurwitz ES, and Schonberger LB.** Guillain-Barre syndrome in the United States, 1979-1980 and 1980-1981. Lack of an association with influenza vaccination. *JAMA* 248: 698-700, 1982.

**Kaplan JE, Schonberger LB, Hurwitz ES, and Katona P.** Guillain-Barre syndrome in the United States, 1978-1981: additional observations from the national surveillance system. *Neurology* 33: 633-637, 1983.

**Kieseier BC, Dalakas MC, and Hartung HP.** Immune mechanisms in chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Neurology* 59: 7-12, 2002.

**Kieseier BC, Kiefer R, Gold R, Hemmer B, Willison HJ, and Hartung HP.** Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle Nerve* 30: 131-156, 2004.

**Kincaid JC, Brashear A, and Markand ON.** The influence of the reference electrode on CMAP configuration. *Muscle Nerve* 16: 392-396, 1993.

**Kinnunen E, Junttila O, Haukka J, and Hovi T.** Nationwide oral poliovirus vaccination campaign and the incidence of Guillain-Barre Syndrome. *Am J Epidemiol* 147: 69-73, 1998.

**Kornegay JN, Gorgacz EJ, Parker MA, Brown J, and Schierman LW.** Marek's disease virus-induced transient paralysis: clinical and electrophysiologic findings in susceptible and resistant lines of chickens. *Am J Vet Res* 44: 1541-1544, 1983a.

**Kornegay JN, Gorgacz EJ, Parker MA, and Schierman LW.** Motor nerve conduction velocity in normal chickens. *Am J Vet Res* 44: 1537-1540, 1983b.

**Koski CL.** Characterization of complement-fixing antibodies to peripheral nerve myelin in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 27 Suppl: S44-47, 1990.

**Koski CL.** Complement-fixing antiperipheral myelin antibodies and C9 neoantigen in serum of patients with Guillain-Barre syndrome: quantitation, kinetics, and clinical correlation. *Ann N Y Acad Sci* 505: 319-325, 1987.

**Koski CL, Chou DK, and Jungalwala FB.** Anti-peripheral nerve myelin antibodies in Guillain-Barre syndrome bind a neutral glycolipid of peripheral myelin and cross-react with Forssman antigen. *J Clin Invest* 84: 280-287, 1989.

**Koski CL, Sanders ME, Swoveland PT, Lawley TJ, Shin ML, Frank MM, and Joiner KA.** Activation of terminal components of complement in patients with Guillain-Barre syndrome and other demyelinating neuropathies. *J Clin Invest* 80: 1492-1497, 1987.

**Krendel DA, Parks HP, Anthony DC, St Clair MB, and Graham DG.** Sural nerve biopsy in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 12: 257-264, 1989.

**Krinke GJ, Vidotto N, and Weber E.** Teased-fiber technique for peripheral myelinated nerves: methodology and interpretation. *Toxicol Pathol* 28: 113-121, 2000.

**Kumar S, Alexander M, Markandeyulu V, and Gnanamuthu C.** Guillain-Barre syndrome presenting in the anti-HIV seroconversion period. *Neurol India* 51: 559, 2003.

**Kuwabara S.** Guillain-Barre syndrome: epidemiology, pathophysiology and management. *Drugs* 64: 597-610, 2004.

**Lambrecht B, Gonze M, Morales D, Meulemans G, and van den Berg TP.** Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma. *Vet Immunol Immunopathol* 70: 257-267, 1999.

**Lampert P, Garrett R, and Powell H.** Demyelination in allergic and Marek's disease virus induced neuritis. Comparative electron microscopic studies. *Acta Neuropathol* 40: 103-110, 1977a.

**Lampert P, Garrett R, and Powell H.** Demyelination in Allergic and Marek's Disease Virus Induced Neuritis Comparative Electron Microscopy Studies. *Acta Neuropathologica* 40: 103-110, 1977b.

**Landry O.** Memoire sur la paralysie du sentiment d'activite musculaire *Gaz Hopitaux Civils Militaires* 28: 269-271, 1855.

**Lang AH, and Puusa A.** Dual influence of temperature on compound nerve action potential. *J Neurol Sci* 51: 81-88, 1981.

**Langmuir AD, Bregman DJ, Kurland LT, Nathanson N, and Victor M.** An epidemiologic and clinical evaluation of Guillain-Barre syndrome reported in association with the administration of swine influenza vaccines. *Am J Epidemiol* 119: 841-879, 1984.

**Lasky T, Terracciano GJ, Magder L, Koski CL, Ballesteros M, Nash D, Clark S, Haber P, Stolley PD, Schonberger LB, and Chen RT.** The Guillain-Barre syndrome and the 1992-1993 and 1993-1994 influenza vaccines. *N Engl J Med* 339: 1797-1802, 1998.

**Latov N.** Diagnosis of CIDP. *Neurology* 59: S2-6, 2002.

**Lawn AM, and Payne LN.** Chronological study of ultrastructural changes in the peripheral nerves in Marek's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 5: 485-497, 1979.

**Lima-Rosa CA, Canal CW, Fallavena PRV, Freitas LB, and Salzano FM.** LEI0258 microsatellite variability and its relationship to *B-F* haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Genetics and Molecular Biology* 28: 386-389, 2005.

**Linington C, Izumo S, Suzuki M, Uyemura K, Meyermann R, and Wekerle H.** A permanent rat T cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. *J Immunol* 133: 1946-1950, 1984.

**Linington C, Lassmann H, Ozawa K, Kosin S, and Mongan L.** Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family as tissue-specific autoantigens: induction of experimental allergic neuritis (EAN) by P0 protein-specific T cell lines. *Eur J Immunol* 22: 1813-1817, 1992.

**Lowenthal JW, Digby MR, and York JJ.** Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J Interferon Cytokine Res* 15: 933-938, 1995.

**Lowitzsch K, Hopf HC, and Galland J.** Changes of sensory conduction velocity and refractory periods with decreasing tissue temperature in man. *J Neurol* 216: 181-188, 1977.

**Luhtala M, Koskinen R, Toivanen P, and Vainio O.** Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes. *Scand J Immunol* 42: 171-174, 1995.

**Luhtala M, Salomonsen J, Hirota Y, Onodera T, Toivanen P, and Vainio O.** Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. *Hybridoma* 12: 633-646, 1993.

**Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T, Kimura J, and Toriyama S.** Pathogenesis of idiopathic scoliosis: SEPs in chicken with experimentally induced scoliosis and in patients with idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop* 14: 329-335, 1994.

**Magira EE, Papaioakim M, Nachamkin I, Asbury AK, Li CY, Ho TW, Griffin JW, McKhann GM, and Monos DS.** Differential distribution of HLA-DQ beta/DR beta epitopes in the two forms of Guillain-Barre syndrome, acute motor axonal neuropathy and acute inflammatory demyelinating polyneuropathy (AIDP): identification of DQ beta epitopes associated with susceptibility to and protection from AIDP. *J Immunol* 170: 3074-3080, 2003.

**Maguire PJ, Smith MO, and Wimsatt JH.** Motor nerve conduction velocity in the medioulnar and sciatic/ tibial nerves of pigeons [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12: 249, 1998.

**Maier H, Schmidbauer M, Pfausler B, Schmutzhard E, and Budka H.** Central nervous system pathology in patients with the Guillain-Barre syndrome. *Brain* 120 ( Pt 3): 451-464, 1997.

**Marek J.** Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 30: 417-421, 1907.

- Massicotte C, Barber DS, Jortner BS, and Ehrich M.** Nerve conduction and ATP concentrations in sciatic-tibial and medial plantar nerves of hens given phenyl saligenin phosphate. *Neurotoxicology* 22: 91-98, 2001.
- Mast J, Goddeeris BM, Peeters K, Vandesande F, and Berghman LR.** Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Vet Immunol Immunopathol* 61: 343-357, 1998.
- Maurer M, Toyka KV, and Gold R.** Immune mechanisms in acquired demyelinating neuropathies: lessons from animal models. *Neuromuscul Disord* 12: 405-414, 2002.
- Maynard FM, and Stolov WC.** Experimental error in determination of nerve conduction velocity. *Arch Phys Med Rehabil* 53: 362-372, 1972.
- McCombe PA, Csurhes PA, and Greer JM.** Studies of HLA associations in male and female patients with Guillain-Barre syndrome (GBS) and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP). *J Neuroimmunol* 180: 172-177, 2006.
- McCombe PA, Pollard JD, and McLeod JG.** Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases. *Brain* 110 ( Pt 6): 1617-1630, 1987.
- McCombe PA, van der Kreek SA, and Pender MP.** Neuropathological findings in chronic relapsing experimental allergic neuritis induced in the Lewis rat by inoculation with intradural root myelin and treatment with low dose cyclosporin A. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 171-187, 1992.
- McKenzie GJ, Bancroft A, Grecis RK, and McKenzie AN.** A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Curr Biol* 8: 339-342, 1998.
- Meinck HM.** Occurrence of the H reflex and the F wave in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 41: 530-533, 1976.
- Mericle RA, and Triggs WJ.** Treatment of acute pandysautonomia with intravenous immunoglobulin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62: 529-531, 1997.
- Midroni GYL, and Bilbao JM.** *Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy*. Toronto: Butterworth-Heinemann, 1995, p. 477.
- Mizisin AP, Nelson RW, Sturges BK, Vernau KM, Lecouteur RA, Williams DC, Burgers ML, and Shelton GD.** Comparable myelinated nerve pathology in feline and human diabetes mellitus. *Acta Neuropathol* 113: 431-442, 2007.
- Morimura T, Ohashi K, Kon Y, Hattori M, Sugimoto C, and Onuma M.** Apoptosis and CD8-down-regulation in the thymus of chickens infected with Marek's disease virus. *Arch Virol* 141: 2243-2249, 1996.
- Mouchoniere M, Le Pottier G, and Fernandez X.** Effect of current frequency during electrical stunning in a water bath on somatosensory evoked responses in turkey's brain. *Res Vet Sci* 69: 53-55, 2000.
- Muller HD, Beckmann A, and Schroder JM.** Inflammatory infiltrates in the spinal cord of patients with Guillain-Barre syndrome. *Acta Neuropathol* 106: 509-517, 2003.

**Nachamkin I, Ung H, Moran AP, Yoo D, Prendergast MM, Nicholson MA, Sheikh K, Ho T, Asbury AK, McKhann GM, and Griffin JW.** Ganglioside GM1 mimicry in *Campylobacter* strains from sporadic infections in the United States. *J Infect Dis* 179: 1183-1189, 1999.

**Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, and Rubin BY.** Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 158: 670-689, 1983.

**Nemni R, Fazio R, Quattrini A, Lorenzetti I, Mamoli D, and Canal N.** Antibodies to sulfatide and to chondroitin sulfate C in patients with chronic sensory neuropathy. *J Neuroimmunol* 43: 79-85, 1993.

**Ochi A, Ochiai K, Hatai H, and Umemura T.** Naturally occurring multiple perineuriomas in a chicken (*Gallus domesticus*). *Vet Pathol* 45: 685-689, 2008.

**Ochoa J.** Recognition of unmyelinated fiber disease: morphologic criteria. *Muscle Nerve* 1: 375-387, 1978.

**Osterrieder N, Kamil JP, Schumacher D, Tischer BK, and Trapp S.** Marek's disease virus: from miasma to model. *Nat Rev Microbiol* 4: 283-294, 2006.

**Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, and Barrell BG.** The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403: 665-668, 2000.

**Patja A, Paunio M, Kinnunen E, Junttila O, Hovi T, and Peltola H.** Risk of Guillain-Barre syndrome after measles-mumps-rubella vaccination. *J Pediatr* 138: 250-254, 2001.

**Paus T, Zijdenbos A, Worsley K, Collins DL, Blumenthal J, Giedd JN, Rapoport JL, and Evans AC.** Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science* 283: 1908-1911, 1999.

**Pavlakakis K, Messini I, Athanassiadou S, Kyrodinou E, Pandazopoulou A, Vrekoussis T, and Stathopoulos EN.** Endocervical glandular lesions: a diagnostic approach combining a semi-quantitative scoring method to the expression of CEA, MIB-1 and p16. *Gynecol Oncol* 103: 971-976, 2006.

**Pavone P, Maccarrone F, Sorge A, Piccolo G, Greco F, Caruso P, and Sorge G.** Guillain-Barre syndrome after varicella zoster virus infections. A case report. *Minerva Pediatr* 54: 259-262, 2002.

**Payne LN, and Biggs PM.** Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 39: 281-302, 1967.

**Payne LN, and Rennie M.** Pathogenesis of Marek's disease in chicks with and without maternal antibody. *J Natl Cancer Inst* 51: 1559-1573, 1973.

**Pepose JS.** A theory of virus-induced demyelination in the Landry-Guillain-Barre syndrome. *J Neurol* 227: 93-97, 1982.

**Pepose JS, Stevens JG, Cook ML, and Lampert PW.** Marek's disease as a model for the Landry--Guillain--Barre syndrome: latent viral infection in nonneuronal cells accompanied by specific immune responses to peripheral nerve and myelin. *Am J Pathol* 103: 309-320, 1981.

**Phillips PH, and Engel RW.** The histopathology of neuromalacia and "curled toe" paralysis in the chick fed with low riboflavin diets. *Journal of Nutrition* 16: 451-463, 1938a.

**Phillips PH, and Engel RW.** Neuromalacia associated with low riboflavin diets, a preliminary report. *Poultry Science* 17: 463-465, 1938b.

**Platt SR, Helmick KE, Graham J, Bennett RA, Phillips L, Chrisman CL, and Ginn PE.** Peripheral neuropathy in a turkey vulture with lead toxicosis. *J Am Vet Med Assoc* 214: 1218-1220, 1200, 1999.

**Pollard JD, Westland KW, Harvey GK, Jung S, Bonner J, Spies JM, Toyka KV, and Hartung HP.** Activated T cells of nonneural specificity open the blood-nerve barrier to circulating antibody. *Ann Neurol* 37: 467-475, 1995.

**Powell HC, Braheny SL, Hughes RA, and Lampert PW.** Antigen-specific demyelination and significance of the bystander effect in peripheral nerves. *Am J Pathol* 114: 443-453, 1984.

**Powell HC, and Hughes RA.** Demyelination in association with delayed type hypersensitivity. *J Neurol Sci* 78: 357-360, 1987.

**Powers SK, Bolger CA, and Edwards MS.** Spinal cord pathways mediating somatosensory evoked potentials. *J Neurosurg* 57: 472-482, 1982.

**Prevots DR, and Sutter RW.** Assessment of Guillain-Barre syndrome mortality and morbidity in the United States: implications for acute flaccid paralysis surveillance. *J Infect Dis* 175 Suppl 1: S151-155, 1997.

**Prineas JW.** Acute idiopathic polyneuritis. An electron microscope study. *Lab Invest* 26: 133-147, 1972.

**Prineas JW.** Demyelination and remyelination in recurrent idiopathic polyneuropathy. An electron microscope study. *Acta Neuropathol* 18: 34-57, 1971.

**Prineas JW.** Pathology of the Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 9 Suppl: 6-19, 1981.

**Pritchard J.** What's new in Guillain-Barre syndrome? *Postgrad Med J* 84: 532-538, 2008.

**Prowse KR, and Baumann H.** Interleukin-1 and interleukin-6 stimulate acute-phase protein production in primary mouse hepatocytes. *J Leukoc Biol* 45: 55-61, 1989.

**Rankine AJ, Filion PR, Platten MA, and Spagnolo DV.** Perineurioma: a clinicopathological study of eight cases. *Pathology* 36: 309-315, 2004.

**Redford EJ, Hall SM, and Smith KJ.** Vascular changes and demyelination induced by the intraneural injection of tumour necrosis factor. *Brain* 118 ( Pt 4): 869-878, 1995.

**Rees JH, Vaughan RW, Kondeatis E, and Hughes RA.** HLA-class II alleles in Guillain-Barre syndrome and Miller Fisher syndrome and their association with preceding *Campylobacter jejuni* infection. *J Neuroimmunol* 62: 53-57, 1995.

**Reilly MM.** Sorting out the inherited neuropathies. *Pract Neurol* 7: 93-105, 2007.

**Robak E, Niewiadomska H, Robak T, Bartkowiak J, Blonski JZ, Wozniacka A, Pomorski L, and Sysa-Jedrezejowska A.** Lymphocytes Tgammadelta in clinically normal skin and peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with disease activity. *Mediators Inflamm* 10: 179-189, 2001.

**Robinson AJ, and Snyder-Mackler L.** Clinical Electrophysiologic Examination and Evaluation: Principals, Procedures, and Interpretation of Findings. In: *Clinical Electrophysiology: Electrotherapy and Electrophysiologic Testing* Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 432.

**Roccatagliata L, Uccelli A, and Murialdo A.** Guillain-Barre syndrome after reactivation of varicella-zoster virus. *N Engl J Med* 344: 65-66, 2001.

**Roth MP, Viratelle C, Dolbois L, Delverdier M, Borot N, Pelletier L, Druet P, Clanet M, and Coppin H.** A genome-wide search identifies two susceptibility loci for experimental autoimmune encephalomyelitis on rat chromosomes 4 and 10. *J Immunol* 162: 1917-1922, 1999.

**Rothwell CJ, Vervelde L, and Davison TF.** Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Vet Immunol Immunopathol* 55: 225-234, 1996.

**Rothwell L, Young JR, Zoorob R, Whittaker CA, Hesketh P, Archer A, Smith AL, and Kaiser P.** Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *J Immunol* 173: 2675-2682, 2004.

**Rowley D, and Jenkin CR.** Antigenic cross-reaction between host and parasite as a possible cause of pathogenicity. *Nature* 193: 151-154, 1962.

**Salisbury DM.** Association between oral poliovaccine and Guillain-Barre syndrome? *Lancet* 351: 79-80, 1998.

**Sambrook J, and Russell DW.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ney York, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p. 999.

**Schattner A.** Consequence or coincidence? The occurrence, pathogenesis and significance of autoimmune manifestations after viral vaccines. *Vaccine* 23: 3876-3886, 2005.

**Scherer SS.** Molecular specializations at nodes and paranodes in peripheral nerve. *Microsc Res Tech* 34: 452-461, 1996.

**Schmahl W, Hoffmann-Fezer G, and Hoffmann R.** [Pathogenesis of neural lesions in Marek's disease. I. Allergic skin reaction against myelin of the peripheral nerves (author's transl)]. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol* 150: 175-183, 1975.

**Schroder JM, Bohl J, and Brodda K.** Changes of the ratio between myelin thickness and axon diameter in the human developing sural nerve. *Acta Neuropathol* 43: 169-178, 1978.

**Schwerer B.** Antibodies against gangliosides: a link between preceding infection and immunopathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *Microbes Infect* 4: 373-384, 2002.

**Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, and Staudt LM.** Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17: 51-62, 2002.

**Sharma JM.** Lack of a threshold of genetic resistance to Marek's disease and the incidence of humoral antibody. *Avian Pathology* 2: 275-290, 1973.

**Shek WR, Calnek BW, Schat KA, and Chen CH.** Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: discrimination between cytolytically and latently infected cells. *J Natl Cancer Inst* 70: 485-491, 1983.

**Shin DH, Lee E, and Cho SS.** Glial cells in the chicken optic tectum. *Brain Res* 962: 221-225, 2003.

**Shu XM, Cai FC, and Zhang XP.** Carbohydrate mimicry of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide is critical for the induction of anti-GM1 antibody and neuropathy. *Muscle Nerve* 33: 225-231, 2006.

**Siddiqui A, Usmani RI, Anwer S, and Afsar S.** Guillain-Barre syndrome occurring after rabies vaccination. *J Pak Med Assoc* 55: 87-88, 2005.

**Sommer C, Koch S, Lammens M, Gabreels-Festen A, Stoll G, and Toyka KV.** Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology* 65: 1924-1929, 2005.

**Souayah N, Nasar A, Suri MF, and Qureshi AI.** Guillain-Barre syndrome after vaccination in United States a report from the CDC/FDA Vaccine Adverse Event Reporting System. *Vaccine* 25: 5253-5255, 2007.

**Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, and Cooper MD.** A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* 167: 315-322, 1988.

**Spatz SJ, and Silva RF.** Sequence determination of variable regions within the genomes of Gallid herpesvirus-2 pathotypes *Archives of Virology* 152: 1665-1678, 2007.

**Speed B, Kaldor J, and Cavanagh P.** Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Infect* 8: 85-86, 1984.

**Stevens JG, Pepose JS, and Cook ML.** Marek's disease: a natural model for the Landry-Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 9 Suppl: 102-106, 1981.

**Strahm C, Min K, Boos N, Ruetsch Y, and Curt A.** Reliability of perioperative SSEP recordings in spine surgery. *Spinal Cord* 41: 483-489, 2003.

**Summers BA, Cummings JF, and de Lahunta A.** *Veterinary Neuropathology*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1995, p. 527.

**Suzumura A, Sobue G, Sugimura K, Matsuoka Y, and Sobue I.** Chronic experimental allergic neuritis (EAN) in juvenile guinea pigs: immunological comparison with acute EAN in adult guinea pigs. *Acta Neurol Scand* 71: 364-372, 1985.

- Swallow JS, and Griffiths IR.** Age related changes in the motor nerve conduction velocity in dogs. *Res Vet Sci* 23: 29-32, 1977.
- Tabanella G, and Nowzari H.** Cytomegalovirus-associated periodontitis and Guillain-Barre syndrome. *J Periodontol* 76: 2306-2311, 2005.
- Tam CC, O'Brien SJ, Petersen I, Islam A, Hayward A, and Rodrigues LC.** Guillain-Barre syndrome and preceding infection with campylobacter, influenza and Epstein-Barr virus in the general practice research database. *PLoS ONE* 2: e344, 2007.
- Taniguchi T, Yuasa N, Sato S, and Horiuchi T.** Pathological changes in chickens inoculated with reticuloendotheliosis-virus-contaminated Marek's disease vaccine. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 17: 141-150, 1977.
- Taylor JM, and Pollard JD.** Dominance of autoreactive T cell-mediated delayed-type hypersensitivity or antibody-mediated demyelination results in distinct forms of experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 637-646, 2001.
- Taylor JM, and Pollard JD.** Neurophysiological changes in demyelinating and axonal forms of acute experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. *Muscle Nerve* 28: 344-352, 2003.
- Teng X, Zhang H, Snead C, and Catravas JD.** Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 beta and IFN-gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C144-152, 2002.
- Toyka KV.** Eighty three years of the Guillain-Barre syndrome: clinical and immunopathologic aspects, current and future treatments. *Rev Neurol (Paris)* 155: 849-856, 1999.
- Toyoda T, Ochiai K, Ohashi K, Tomioka Y, Kimura T, and Umemura T.** Multiple perineuriomas in chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Vet Pathol* 42: 176-183, 2005.
- Tregaskes CA, Bumstead N, Davison TF, and Young JR.** Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure. *Immunogenetics* 44: 212-217, 1996.
- Tuttle J, Chen RT, Rantala H, Cherry JD, Rhodes PH, and Hadler S.** The risk of Guillain-Barre syndrome after tetanus-toxoid-containing vaccines in adults and children in the United States. *Am J Public Health* 87: 2045-2048, 1997.
- Ugawa Y, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, and Marsden CD.** Magnetic stimulation over the spinal enlargements. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52: 1025-1032, 1989.
- Uncini A, and Yuki N.** Electrophysiologic and immunopathologic correlates in Guillain-Barre syndrome subtypes. *Expert Rev Neurother* 9: 869-884, 2009.
- Uzuka Y, Tokuriki M, Kawasaki Y, and Matsumoto H.** An experimental study of the cortical somatosensory evoked potentials in the cat. *Nippon Juigaku Zasshi* 49: 926-928, 1987.
- van Belkum A, van den Braak N, Godschalk P, Ang W, Jacobs B, Gilbert M, Wakarchuk W, Verbrugh H, and Endtz H.** A Campylobacter jejuni gene associated with immune-mediated neuropathy. *Nat Med* 7: 752-753, 2001.

**van Sorge NM, van der Pol WL, Jansen MD, Geleijns KP, Kalmijn S, Hughes RA, Rees JH, Pritchard J, Vedeler CA, Myhr KM, Shaw C, van Schaik IN, Wokke JH, van Doorn PA, Jacobs BC, van de Winkel JG, and van den Berg LH.** Severity of Guillain-Barre syndrome is associated with Fc gamma Receptor III polymorphisms. *J Neuroimmunol* 162: 157-164, 2005.

**Veromaa T, Vainio O, Eerola E, and Toivanen P.** Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens. *Hybridoma* 7: 41-48, 1988.

**Visser LH, van der Meche FG, Meulstee J, Rothbarth PP, Jacobs BC, Schmitz PI, and van Doorn PA.** Cytomegalovirus infection and Guillain-Barre syndrome: the clinical, electrophysiologic, and prognostic features. Dutch Guillain-Barre Study Group. *Neurology* 47: 668-673, 1996.

**Vriesendorp FJ, Triggs WJ, Mayer RF, and Koski CL.** Electrophysiological studies in Guillain-Barre syndrome: correlation with antibodies to GM1, GD1B and Campylobacter jejuni. *J Neurol* 242: 460-465, 1995.

**Vucic S, Kiernan MC, and Cornblath DR.** Guillain-Barre syndrome: an update. *J Clin Neurosci* 16: 733-741, 2009.

**Waksman BH, and Adams RD.** Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J Exp Med* 102: 213-236, 1955.

**Waksman BH, and Adams RD.** A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig, and mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 15: 293-334, 1956.

**Watson JV.** *Introduction to flow cytometry.* Cambridge University Press, 2004.

**Weerth S, Berger T, Lassmann H, and Linington C.** Encephalitogenic and neuritogenic T cell responses to the myelin-associated glycoprotein (MAG) in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 95: 157-164, 1999.

**Wheeler SJ.** Effect of age on sensory nerve conduction velocity in the horse. *Res Vet Sci* 48: 141-144, 1990.

**Wheeler SJ, and Plummer JM.** Age-related changes in the fibre composition of equine peripheral nerve. *J Neurol Sci* 90: 53-66, 1989.

**Willison HJ.** Ganglioside complexes as targets for antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 1002-1003, 2006.

**Willison HJ, and Yuki N.** Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 125: 2591-2625, 2002.

**Winer J, Hughes S, Cooper J, Ben-Smith A, and Savage C.** Gamma delta T cells infiltrating sensory nerve biopsies from patients with inflammatory neuropathy. *J Neurol* 249: 616-621, 2002.

**Witter RL.** Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis* 41: 149-163, 1997.

**Witter RL, and Bacon LD.** A naturally occurring neuropathy of chickens not associated with Marek's disease (abstract). In: *Proceedings of the 132nd Annual Meeting American Veterinary Medical Association*. Pittsburgh, PA: 1995, p. 140.

**Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno IM, and Schat KA.** Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathol* 34: 75-90, 2005.

**Witter RL, Lee LF, and Fadly AM.** Characteristics of CVI988/Rispens and R2/23, two prototype vaccine strains of serotype 1 Marek's disease virus. *Avian Dis* 39: 269-284, 1995.

**Witter RL, Lee LF, and Sharma JM.** Biological diversity among serotype 2 Marek's disease viruses. *Avian Dis* 34: 944-957, 1990.

**Yates BJ, Thompson FJ, and Mickle JP.** Origin and properties of spinal cord field potentials. *Neurosurgery* 11: 439-450, 1982.

**Yoshino H, Harukawa H, and Asano A.** IgG antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome with bulbar palsy. *J Neuroimmunol* 105: 195-201, 2000.

**Yu RK, Usuki S, and Ariga T.** Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain-Barre syndrome and related diseases. *Infect Immun* 74: 6517-6527, 2006.

**Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, and Miyatake T.** A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 178: 1771-1775, 1993.

**Yuki N, Taki T, Takahashi M, Saito K, Tai T, Miyatake T, and Handa S.** Penner's serotype 4 of *Campylobacter jejuni* has a lipopolysaccharide that bears a GM1 ganglioside epitope as well as one that bears a GD1 a epitope. *Infect Immun* 62: 2101-2103, 1994.

**Zhu J, Link H, Mix E, Olsson T, and Huang WX.** Th1-like cell responses to peripheral nerve myelin components over the course of experimental allergic neuritis in Lewis rats. *Acta Neurol Scand* 90: 19-25, 1994.

## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schmahl bedanken, der mir die Weichen für die Arbeit an diesem wunderbaren Dissertationsthema gestellt und damit auch den Einstieg in die faszinierende Welt der Pathologie ermöglicht hat.

Mein Betreuer Herr Dr. Kaspar Matiasek war mir in den letzten Jahren Motivation und Inspiration zugleich. Ihm danke ich ganz besonders für seinen unermüdlichen Einsatz, für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und vor allem dafür, dass er an mich geglaubt hat.

Einen herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers widmen, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich immer unterstützt und gefördert hat. Auch den anderen Mitgliedern der AG Kaspers des Instituts der Tierphysiologie der LMU München, insbesondere Frau Dr. Sonja Kothlow, danke ich sehr für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an Frau PD Dr. Andrea Fischer, die mir mit großer Geduld die Arbeit in dem faszinierenden Gebiet der klinischen Neurologie ermöglicht, sie mir nahe gebracht und die Freude daran vermittelt hat.

Frau Dr. Daniela Emrich danke ich für die zahllosen fachlichen Diskussionen, die wir geführt haben, für die tatkräftige Unterstützung, die ich oft in Anspruch genommen habe und auf die ich immer bauen konnte, und für die gute Laune, die sie an die Universität gebracht hat.

Unbedingt bedanken möchte ich mich bei allen technischen Assistentinnen des Lehrstuhls und bei Frau Siebert, die mir tatkräftig beigestanden sind. In diesem Zusammenhang auch ein Danke an Fritz Meggendorfer und Hedwiga Opitz, die wunderbar für meine Hühner gesorgt haben und mir in allen Fragen der Tierpflege stets hilfreich zur Seite standen. Auch Dr. Dejan Cvejic, Kathrin Geisweid, Caroline Altenhöfer und Jutta Weissl danke ich für ihre Hilfe.

Frau Prof. Heidrun Potschka danke ich dafür, dass Sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, wann immer es nötig war.

Frau Dr. Jütting danke ich für ihre kompetente Hilfe bei statistischen Fragen.

Der Jürgen-Manchot-Stiftung danke ich dafür, dass sie mich über drei Jahre finanziell unterstützt und somit ermöglicht hat, dieses Projekt so intensiv zu verfolgen.

Den Kollegen von Lohmann Tierzucht danke ich für ihr Vertrauen in mich und für die zahlreichen Möglichkeiten, die sich aus unserer Zusammenarbeit ergeben haben.

Kerstin Wendicke und Hannes Zantow von der MAG & More GmbH danke ich sehr für Ihr großzügiges Entgegenkommen und den unkomplizierten Ablauf beim Ausleihen des Magnetstimulators.

Natürlich danke ich auch allen anderen, die mich während der Doktorarbeit in jeglicher Form unterstützt haben. Ich hoffe, die einzelnen wissen, was ich ihnen verdanke.

Zuletzt ein aus tiefstem Herzen kommender Dank an meine wunderbare Familie und meinen Freund, denen allein ich zu verdanken habe, dass ich heute hier bin und die einen großen Anteil an dem haben, was ich bis heute erreicht habe.