

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

**Hämatologische, blutchemische und  
proteinelektrophoretische Veränderungen bei Kongo-  
Graupapageien (*Psittacus erithacus*) nach experimenteller  
Infektion mit Parrot Bornavirus 4**

von Charlotte Högemann

aus Tübingen

München 2018

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

Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

**Korreferent/en:** Prof. Dr. Sabine André

**Tag der Promotion:** 10. Februar 2018

Meinen Eltern

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Bornaviren – eine Einführung .....</b>	<b>3</b>
1.1	Familie Bornaviridae .....	3
1.2	Bornaviren als Erreger der Neuropathischen Drüsenmagendilatation der Papageien .....	6
1.3	Epidemiologie .....	8
1.4	Wirtsspektrum der Papageien-Bornaviren .....	10
1.5	Klinik .....	11
1.6	Pathologie und Histologie .....	13
1.7	Pathogenese .....	16
1.8	Differentialdiagnosen .....	17
1.9	Diagnostik .....	18
1.10	Therapiemöglichkeiten und Prävention .....	21
1.11	Infektionsversuche .....	25
<b>2.</b>	<b>Proteinelektrophorese .....</b>	<b>32</b>
2.1	Methode .....	32
2.2	Aufteilung der Fraktionen .....	33
2.2.1	Präalbumin .....	35
2.2.2	Albumin .....	35
2.2.3	Globuline .....	35
2.2.3.1	$\alpha$ -Globuline .....	36
2.2.3.2	$\beta$ -Globuline .....	36
2.2.3.3	$\gamma$ -Globuline .....	36
2.3	Vor-und Nachteile der Methode der Proteinelektrophorese in der Vogelmedizin .....	37
2.4	Physiologische Einflüsse auf die Proteinzusammensetzung .....	39
2.4.1	Besonderheiten bei Säugetieren .....	39
2.4.2	Besonderheiten beim Vogel .....	40
2.5	Anwendungsgebiete in der Diagnostik .....	42
2.5.1	Humanmedizin .....	42
2.5.2	Veterinärmedizin .....	43

Inhaltsverzeichnis	II
2.5.3 Vogelmedizin.....	45
<b>III. PUBLIKATION .....</b>	<b>49</b>
<b>IV. DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>101</b>
<b>VI. SUMMARY .....</b>	<b>105</b>
<b>VII. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>109</b>
<b>VIII. ANHANG.....</b>	<b>139</b>
<b>A. Individual values and reference ranges Parrot P7-P12.....</b>	<b>140</b>
<b>B. Individual values after infection Parrot P7-P12 .....</b>	<b>142</b>
<b>C. Results protein electrophoresis Parrot P7-P12 .....</b>	<b>144</b>
<b>IX. DANKSAGUNG.....</b>	<b>147</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

a.i.	ante infectionem
A/G-ratio	Albumin/Globulin-Quotient (albumin/globulin-ratio)
ABV	Aviäres Bornavirus (Avian bornavirus)
al.	Alii, aliae
APP	akute-Phase-Proteine
AST	Aspartataminotransferase (aspartate aminotransferase)
BA	Gallensäure (bile acid)
BC	Buffy Coat
BD/BoD	Bornasche Krankheit (Borna disease)
BDV/BoDV	Borna Disease Virus
Ca	Calcium
CD	kritische Differenz (critical difference)
CK	Kreatinkinase (creatine kinase)
CnBV	Canary Bornavirus
CNS	Zentralnervensystem (central nervous system)
ct	Schwellenwertzyklus (cycle threshold)
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (capillary zone electrophoresis)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
ffu	Fokus bildende Einheit (focus forming units)
Glu	Glukose (glucose)
HRE	hochauflösende Elektrophorese (high resolution electrophoresis)
i.m.	intramuskulär
IFE	Immunelektrophorese (immunoelectrophoresis)
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

---

IgY	Immunglobulin Y
IIFA	indirekter Immunofluoreszenz Assay (indirect immunofluorescent assay)
IoI	Individualitätsindex (Index of Individuality)
ISH	in situ Hybridisierung
LDG	Laktatdehydrogenase (lactat dehydrogenase)
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
P	Papagei (parrot)
p.i.	post infectionem
p.m.	post mortem
p.o.	per os
PaBV	Parrot Bornavirus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PCV	Hämatokrit (packed cell volume)
PDD	Drüsenmagendilatation (Proventricular Dilatation Disease)
Phos	Phosphor (phosphorus)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Pot	Kalium (potassium)
rRT-PCR	Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (realtime reverse transkriptase polymerase chain reaction)
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung (standard deviation)
Sod	Natrium (sodium)
SPF	spezifisch pathogenfrei (specific pathogen free)
TCID <sub>50</sub>	kulturinfektiöse Dosis <sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose)
U	Einheiten (units)
UA	Harnsäure (uric acid)
VSBV	Variegated Squirrel Bornavirus
WBC	Differenzialblutbild (white blood cell count)
ZNS	Zentralnervensystem



## I. EINLEITUNG

Die neuropathische Drüsenmagendilatation, auch bekannt unter ihren englischen Bezeichnungen „proventricular dilatation disease“ (PDD), „macaw wasting disease“, „neuropathic gastric dilatation“ oder „avian ganglioneuritis“, gilt als die am häufigsten vorkommende Erkrankung des Magen-Darm-Traktes bei großen Papageien (Reavill & Schmidt, 2007). Erstmals beschrieben wurde die Krankheit bereits Ende der 1970-er Jahre in den USA, spätere Berichte ergaben dann ein weltweites Vorkommen (Clark, 1984; Mannl *et al.*, 1987; Sullivan *et al.*, 1997; Lublin *et al.*, 2006; Weissenböck *et al.*, 2009a; Last *et al.*, 2012; Donatti *et al.*, 2014). Das klinische Krankheitsbild umfasst eine weite Spanne gastrointestinaler und/oder neurologischer Symptome, der Verlauf ist in vielen Fällen als chronisch auszehrend beschrieben worden und der Ausgang meist tödlich. Verbunden mit einer Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen in die Ganglien des Magen-Darm-Traktes kommt es zu einer Störung der Innervation und als Folge zu Erweiterung des Drüsenmagens, Kropfstase, Regurgitieren, Durchfall, Dysphagie, Kachexie und Ausscheidung unverdauter Körner im Kot. Die neurologischen Ausfälle äußern sich in Ataxie und anderen zentralnervösen Störungen wie Tremor und Opisthotonus (Mannl *et al.*, 1987; Bond *et al.*, 1993; Berhane *et al.*, 2001), zusätzlich können ophthalmologische Ausfallserscheinungen auftreten (Korbel & Rinder, 2011). Darüber hinaus gibt es aber auch subklinische Formen, bei denen infizierte Tiere keine oder nur sehr leichte Krankheitssymptome zeigen (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2009; Herzog *et al.*, 2010; Hoppes *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010).

Sehr früh wurde bereits eine virale Ursache vermutet, aber erst im Jahr 2008 gelang es zwei unabhängig voneinander arbeitenden Forschungsgruppen aus den USA und Israel, ein neues Bornavirus (Genus *Bornavirus*, Familie *Bornaviridae*, Ordnung *Mononegavirales*) bei Papageien mit neuropathischer Drüsenmagendilatation zu identifizieren (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008). Der Zusammenhang einer Bornavirusinfektion mit dem Auftreten dieser Erkrankung wurde durch weitere Untersuchungen gestützt (Lierz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2009a; Weissenböck *et al.*, 2009a).

Das klinische Bild konnte zudem mittels experimenteller Infektion bei verschiedenen Vogelarten (Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*), Felsensittiche (*Cyanoliseus patagonus*) und Unzertrennliche (*Agapornis roseicollis*)) induziert werden (Gancz *et al.*, 2009; Gray *et al.*, 2010; Mirhosseini *et al.*, 2011; Piepenbring *et al.*, 2012; Gentry *et al.*, 2015). Die Koch'schen Postulate wurden somit erfüllt, und Bornaviren werden seitdem als ursächliche Erreger der neuropathischen Drüsenmagendilatation anerkannt.

Die Pathogenese der neuropathischen Drüsenmagendilatation ist immer noch weitgehend unklar. Für eine Bornavirusinfektion spezifische Veränderungen von hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern sind bisher nicht bekannt (Gancz *et al.*, 2010). Auch wenn einige Berichte über Auffälligkeiten im Blutstatus von betroffenen Tieren existieren, so handelt es sich dabei doch in allen Fällen um auf natürlichem Weg infizierte Vögel in verschiedenen Krankheitsphasen, bei denen zusätzliche infektiöse oder nichtinfektiöse Krankheiten gleichzeitig vorlagen oder zumindest nicht ausgeschlossen werden konnten. Unter standardisierten Bedingungen durchgeführte Untersuchungen von Blutwerten über einen längeren Zeitraum und während verschiedener Stadien einer Bornavirusinfektion, die Informationen zur Pathogenese liefern könnten, existieren bisher noch nicht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, erste Informationen über das Auftreten möglicher Veränderungen verschiedener Blutparameter im Zusammenhang mit einer Bornavirusinfektion zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) nach experimenteller Infektion mit Bornaviren in regelmäßigen Intervallen hämatologischen, blutchemischen und plasma-proteinelektrophoretischen Untersuchungen unterzogen. Die ermittelten Veränderungen wurden anschließend in ihrem zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten klinischer Symptomatik, der Bildung von Bornavirus-spezifischen Antikörpern und dem Ausscheiden viraler RNA analysiert.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Bornaviren – eine Einführung

#### 1.1 Familie Bornaviridae

Die Familie der *Bornaviridae* wird der Ordnung Mononegavirales zugeordnet. Es handelt sich dabei um Viren mit einem nichtsegmentierten Einzelstrang-RNA-Genom. Bis vor wenigen Jahren gab es nur einen einzigen bekannten Vertreter aus dieser Familie, das Borna Disease Virus (BoDV). Der Name dieses Virus und damit der ganzen Virusfamilie leitet sich von der von ihm verursachten Borna'schen Krankheit (Borna Disease) ab, die das erste Mal in der Stadt Borna in Sachsen größere Aufmerksamkeit erregte. Dort erkrankten im Jahre 1895 beinahe alle Pferde des Kavallerie-Regiments an schweren zentralnervösen Störungen. Die Krankheit, welche bis zu diesem Zeitpunkt auch als "hitze Kopfkrankeheit" bezeichnet wurde, erhielt nun den Namen "Borna'sche Krankheit" (Stitz *et al.*, 2002). Es handelt sich dabei um eine virale Infektion des zentralen Nervensystems, einhergehend mit chronisch progressiver Enzephalomyelitis. Die Krankheit äußert sich sowohl in neurologischen Symptomen und verändertem Verhalten, wie Aggression, Erregung und Stereotypien, bringt aber auch unspezifische Anzeichen wie Apathie hervor (Sprankel *et al.*, 1978; Rott *et al.*, 1988; Richt *et al.*, 1997; Hallensleben *et al.*, 1998; Algermissen, 2010).

Die am häufigsten betroffenen Tierarten sind Pferde und Schafe. Darüber hinaus gibt es aber zahlreiche Einzelberichte über das Auftreten von Borna Disease bei verschiedenen anderen Säugetieren wie Katzen, Hunden, Kaninchen und weiteren Huftieren (Nakamura *et al.*, 1999; Degiorgis *et al.*, 2000; Jacobsen *et al.*, 2010; Lutz *et al.*, 2015).

Ob Vögel für das Borna Disease Virus empfänglich sind, ist unklar und scheint nach dem heutigen Stand der Wissenschaft unwahrscheinlich, da es seit Entdeckung der aviären Bornaviren keine Berichte über Nachweise von BoDV bei diesen mehr gibt. Im Jahr 1996 wurde bei Straußen in Israel eine Erkrankung beobachtet, die mit zentralnervösen Störungen und Festliegen verbunden war. Mit Gehirnhomogenaten der an Paralyse erkrankten Tiere konnte das klinische Bild

auf andere Strauße übertragen werden (Ashash *et al.*, 1996). Ob hierbei allerdings wirklich Bornaviren beteiligt waren, ist nicht eindeutig bewiesen.

Für die Forschung haben sich Mäuse und Ratten als Tiermodell für experimentelle Infektionen etabliert, es lassen sich aber auch die meisten anderen warmblütigen Tiere experimentell mit BoDV infizieren (Rott *et al.*, 1988; Stitz *et al.*, 1995).

In den letzten 8 Jahren erhielt die Familie *Bornaviridae* dann immer größeren Zuwachs, betroffen vor allem Spezies aus der Klasse der Vögel. Angefangen 2008 mit der Entdeckung von Bornaviren im Zusammenhang mit der neuropathischen Drüsenmagendilatation bei Papageienvögeln (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008), wurden in den darauffolgenden Jahren weitere Genotypen, welche sich in ihrem Genom unterschiedlich stark voneinander unterscheiden, bei diversen Vogelspezies unterschiedlicher Ordnungen beschrieben (Weissenböck *et al.*, 2009b; Payne *et al.*, 2011a; Rubbenstroth *et al.*, 2012; Rubbenstroth *et al.*, 2014b). Zunächst wurden alle diese vogelspezifischen Bornaviren unter dem Begriff "aviäre Bornaviren" (ABV) zusammengefasst. Seit dem erstmaligen Nachweis von Bornavirussequenzen bei einer Gabunviper (*Bitis gabonica*), wurden Reptilien als weitere natürliche Wirte der Bornaviren vermutet (Fujino *et al.*, 2012).

Im Jahr 2015 wurde die Taxonomie der Familie *Bornaviridae* einer Revision unterzogen (Kuhn *et al.* 2015). Aufgrund von bereits veröffentlichten phylogenetischen Analysen und biologischen Charakteristika der Bornaviren wurde eine Unterteilung in folgende Spezies vorgenommen: *Mammalian 1 Bornavirus* (mit den Viren Borna Disease Virus 1 und 2), *Psittaciform 1 Bornavirus* (mit Parrot Bornavirus (PaBV-) 1, 2, 3, 4 und 7), *Passeriform 1 Bornavirus* (mit Canary Bornavirus (CnBV) 1, 2 und 3 sowie Munia Bornavirus 1), *Passeriform 2 Bornavirus* (mit Estrildid Finch Bornavirus) und *Waterbird 1 Bornavirus* (Kuhn *et al.* 2015). In die Bezeichnung der Bornavirus-Arten wurde dabei die jeweilige Tiergruppe einbezogen, bei denen die Viren bislang nachgewiesen wurden und für die sie vermutlich eine Spezifität besitzen.

Die ehemals als ABV-5 und ABV-6 bezeichneten Bornavirus-Genotypen und auch das Gabunviper Bornavirus blieben zunächst unklassifiziert. Bei weiteren phylogenetischen Analysen ergab sich dann aber, dass das PaBV-5 und eventuell auch PaBV-6 wohl eine neuartige Virusspezies darstellen, die sich von den

anderen, bisher bekannten Säugetier- und Vogel-Bornavirusarten, vor allem in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden. Die Autoren schlugen hierfür die vorläufige Bezeichnung *Psittaciform 2 Bornavirus* vor (Guo & Tizard, 2015; Marton *et al.*, 2015), die mittlerweile allgemein akzeptiert wurde (Afonso *et al.*, 2016).

Bei Sequenzanalysen von Bornavirus-PCR-Produkten von Papageien mit klinischer PDD in Brasilien wurde noch ein weiteres, sich von den bisher bekannten Viren unterscheidendes Bornavirus identifiziert, das von den Autoren als Parrot Bornavirus 8 bezeichnet wurde (Philadelpho *et al.*, 2014).

Seit den 1990-er Jahren wurde ein zoonotisches Potential des BoD-Virus vermutet, auch gestützt dadurch, dass sich viele verschiedene Säugetierarten, unter anderem Primaten, infizieren können. Dabei wurde bei menschlichen Patienten ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Antikörpern gegen BoDV und chronischen neurologischen bzw. psychischen Störungen angenommen (Bode *et al.*, 1993; Bode & Ludwig, 2003). Daraufhin wurden zahlreiche Studien vom Robert-Koch-Institut durchgeführt, die allerdings im Jahr 2007 zu dem Schluss kamen, dass BoDV nicht ursächlich an psychiatrischen Erkrankungen des Menschen beteiligt ist (Lutz *et al.*, 2015).

Im Jahr 2015 wurde dann ein Zoonose-Potential eines neuen Bornavirus vermutet, als bei drei verstorbenen Züchtern von Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*), die zuvor an einer Krankheit mit Enzephalitis und Enzephalomyelitis litten, ein bisher unbekannter Bornavirus-Typ gefunden wurde. Das gleiche Virus konnte auch in einem Bunthörnchen nachgewiesen werden, das direkten Kontakt mit einem der Züchter hatte und wurde deshalb von den Autoren vorläufig als “*variegated squirrel 1 bornavirus*” (VSBV-1) bezeichnet (Hoffmann *et al.*, 2015). Bei folgenden Untersuchungen wurden weitere betroffene Hörnchen-Arten der Subfamilien *Sciurinae* und *Callosciurinae* in verschiedenen Zoologischen Gärten und Privathaltungen sowohl in Deutschland als auch in den Niederlanden entdeckt (Schlottau *et al.*, 2017a; Schlottau *et al.*, 2017b). Auffällig hierbei war, dass nur importierte Arten aus Süd-/Mittelamerika und Südostasien infiziert waren, nicht aber das einheimische rote Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*).

Es ist bisher unklar, ob das Virus ursprünglich aus einer dieser Regionen durch befallene Tiere nach Mitteleuropa gebracht wurde oder ob, ähnlich wie die

Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) für BoDV, ein bisher unbekannter Reservoir-Wirt existiert (Schlottau *et al.*, 2017a).

### **1.2 Bornaviren als Erreger der Neuropathischen Drüsenmagendilatation der Papageien**

Die Neuropathische Drüsenmagendilatation, auch bekannt unter ihrer englischen Bezeichnung „Proventricular Dilatation Disease“, wurde bereits in den späten 1970-er Jahren in den USA bei in Gefangenschaft gehaltenen Papageienvögeln beobachtet und erstmals Anfang der 80-er Jahre beschrieben (Ridgway & Gallerstein, 1983; Clark, 1984; Woerpel & Rosskopf, 1984). Der Name der Krankheit leitet sich von ihrem Kardinalsymptom, der Erweiterung des Vor- bzw. Drüsenmagens bei betroffenen Papageien ab. In englischsprachigen Fachkreisen wurden zunächst mehrere Bezeichnungen synonym für die gleiche Krankheit verwendet: „Proventricular dilatation syndrome“, „macaw wasting syndrome“, „neuropathic gastric dilatation of Psittaciformes“, „psittacine encephalomyelitis“, „myenteric ganglioneuritis“ und „infiltrative splanchnic neuropathy“ (Woerpel & Rosskopf, 1984; Gerlach, 1986; Mannl *et al.*, 1987; Joyner *et al.*, 1989; Gancz *et al.*, 2010). Es handelt sich hierbei um die häufigste Magen-Darm-Erkrankung bei Papageien, wie aus einer Sektionsstudie an über 1400 Tierkörpern hervorging (Reavill & Schmidt, 2007); eine infektiöse Ursache wurde bereits sehr früh vermutet (Woerpel & Rosskopf, 1984; Graham, 1991; Gough *et al.*, 1996; Gough *et al.*, 2006). Nachdem die Übertragung von Homogenisaten aus Kropf, Drüsen- und Muskelmagen und Gehirn von an PDD erkrankten Vögeln, in denen sich auch virusähnliche Partikel befanden, erfolgreich verlief, wurden verschiedene Viren als mögliche Erreger diskutiert (Taylor *et al.*, 1997; Gregory *et al.*, 2000).

Hierzu gehörten unter anderem aviäre Herpes-, Polyoma- und Picornaviren (Hughes, 1984; Woerpel & Rosskopf, 1984). Auch das Eastern Equine Encephal(omyel)itis Virus stand zur Diskussion (Gaskin *et al.*, 1991; Gregory *et al.*, 1996b). Eine mögliche Verbindung zum Avian Serositis Virus, benannt nach der Krankheit „avian viral serositis“ wurde aufgrund eines ähnlichen Krankheitsbildes ebenfalls aufgestellt (Gaskin *et al.*, 1991).

Weitere mögliche Erreger, die diskutiert wurden, waren Coronaviren (Gough *et al.*, 2006) und ein Paramyxovirus, verwandt mit dem Erreger der Newcastle

Krankheit (Grund *et al.*, 2002). Bei histologischen Untersuchungen wurden Einschlusskörperchen im neuronalen Perikaryon des Ganglion coeliacum und im myenterischen Plexus gefunden. Mit Hilfe des Elektronenmikroskopes konnten hier pleomorphe virusartige Partikel festgestellt werden, die morphologische Ähnlichkeiten mit Entero-, Corona-, Reo- oder Paramyxoviren aufwiesen (Mannl *et al.*, 1987; Gregory *et al.*, 2000). Besonders Paramyxoviren wurden längere Zeit als ursächliche Erreger vermutet, da sie neurotrop sind, also Nervengewebe befallen (Gerlach, 1986; Mannl *et al.*, 1987; Grund *et al.*, 1999; Grund *et al.*, 2002; Grund *et al.*, 2005).

Eine andere Hypothese über die Entstehung der PDD, nicht unbedingt im Widerspruch zu einer Virusbeteiligung, beinhaltet, dass Anti-Gangliosid-Antikörper an immunpathologischen Prozessen bei der Entstehung der Krankheit beteiligt sind, ähnlich wie beim Guillain-Barré-Syndrom, einer Autoimmun-Neuropathie des Menschen (Rossi *et al.*, 2008; Pesaro *et al.*, 2012). Auto-Antikörper wurden in den Ganglien von Kropf und Magendarmtrakt von an PDD leidenden Papageien nachgewiesen (Rossi *et al.*, 2012).

Im Jahr 2008 gelang es schließlich zwei unabhängig voneinander arbeitenden Forschungsgruppen, Bornaviren bei Papageien mit neuropathischer Drüsenmagendilatation nachzuweisen (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008). Mittlerweile sind Bornaviren als Erreger der PDD bestätigt und anerkannt. Sie sind durch eine hohe genetische Variabilität gekennzeichnet. Bei den in den Jahren 2015 und 2016 erfolgten Revisionen der Taxonomie der Bornaviren (Kuhn *et al.*, 2015; Afonso *et al.*, 2016) wurden die bei Papageien vorkommenden Viren den Virusarten *Psittaciform 1 Bornavirus* (avian/parrot Bornavirus 1, 2, 3, 4, 7) und *Psittaciform 2 Bornavirus* (mit parrot Bornavirus 5) zugeordnet.

Die bei den Psittaciformes (Papageienvögel) relevanten Bornavirus-Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens. Ob sie sich auch in ihrer Pathogenität unterscheiden, ist bisher noch unklar. Der in den Vereinigten Staaten bisher am häufigsten nachgewiesene Genotyp, sowohl bei an PDD erkrankten bzw. verstorbenen Vögeln, als auch bei subklinischen Carrier-Tieren, ist PaBV-4 (Gray *et al.*, 2010; Hoppes *et al.*, 2010; Payne *et al.*, 2011b). Dieser weist nach Meinung von Gray *et al.* eventuell auch eine größere Virulenz als die anderen Genotypen auf (Gray *et al.*, 2010). In Europa scheinen Genotyp PaBV-2 und -4 vorherrschend zu sein (Nedorost *et al.*, 2012). Eine neuere Untersuchung

an experimentell infizierten Nymphensittichen ergab eine höhere Anzahl an Vögeln mit klinischen Symptomen und einen schwereren Krankheitsverlauf bei Infektion mit einem PaBV-2-Virusstamm im Gegensatz zu einem PaBV-4-Stamm. Außerdem schien das verwendete PaBV-2-Virus vermehrt den Magen-Darm-Trakt zu betreffen, während bei dem PaBV-4-Stamm neben gastrointestinalen vor allem auch neurologische Symptome beobachtet wurden (Piepenbring *et al.*, 2012; Piepenbring *et al.*, 2016). Eine Studie, bei der die Gehirne von Papageienvögeln mit vorberichtlicher PDD mittels RT-PCR auf Bornaviren untersucht wurden, zeigte, dass es gelegentlich auch zu Mischinfektionen mit PaBV-2 und -4 bzw. -6 kommen kann (Nedorost *et al.*, 2012).

### 1.3 Epidemiologie

Das Vorkommen von Bornaviren bzw. PDD bei Vögeln wurde bereits in zahlreichen Ländern auf allen Kontinenten beschrieben. Dazu gehören neben den USA (Ridgway & Gallerstein, 1983; Woerpel & Rosskopf, 1984; Graham, 1991) und verschiedenen europäischen Staaten, wie unter anderem Deutschland (Gerlach, 1986; Mannl *et al.*, 1987; Rinder *et al.*, 2009a), auch Australien (Sullivan *et al.*, 1997; Doneley *et al.*, 2007; Weissenböck *et al.*, 2009a), Brasilien (Donatti *et al.*, 2014; Encinas-Nagel *et al.*, 2014; Philadelpho *et al.*, 2014), Japan (Ogawa *et al.*, 2011; Sassa *et al.*, 2013; Sassa *et al.*, 2015), Israel (Lublin *et al.*, 2006) und Südafrika (Last *et al.*, 2012). Es sind sowohl freilebende als auch in Gefangenschaft gehaltene Vögel betroffen (Delnatte *et al.*, 2011; Delnatte *et al.*, 2013; Encinas-Nagel *et al.*, 2014; Sassa *et al.*, 2015). In offenen Volieren gehaltene Vögel, die das Virus ausscheiden, stellen somit eine potentielle Gefahr für einheimische Wildvögel dar (Donatti *et al.*, 2014).

In einer Studie aus Japan wurden Nukleotidsequenzen von PaBV-2 und/oder PaBV-4 bei Wildvögeln nachgewiesen, die phylogenetisch sehr ähnlich zu denen waren, die auch bei als Haustieren gehaltenen Papageienvögeln zu finden waren. Zu den betroffenen Arten gehörten Enten (*Anas*), Kraniche (*Grus*), Möwen (*Larus*), Strandläufer (*Calidris*), Seeadler (*Haliaeetus*) und Ammern (*Emberiza*) (Sassa *et al.*, 2015). Ob diese Wildvögel jedoch tatsächlich mit PaBV infiziert waren, ist unklar.



Der Übertragungsweg des Virus ist bisher noch nicht vollständig bekannt. Virus-RNA wurde im Kot und in Kloakentupfern von erkrankten Tieren nachgewiesen (Rinder *et al.*, 2009a; Kistler *et al.*, 2010). Die orale oder nasale Aufnahme aus Ausscheidungen anderer Vögel wird demnach vermutet (Rinder *et al.*, 2009a; Kistler *et al.*, 2010; Raghav *et al.*, 2010). Dass einer horizontalen Übertragung eine zentrale Bedeutung zukommt, wird durch neuere molekularepidemiologische Studien unter Einbeziehung phylogenetischer Analysen gestützt (Rubbenstroth *et al.*, 2016).

Es existieren aber auch Studien und Beobachtungen, die auf eine vertikale Übertragung hinweisen (Lierz *et al.*, 2011; Kerski *et al.*, 2012; Last *et al.*, 2012; Monaco *et al.*, 2012). So konnte Bornavirus-RNA sowohl bei Embryonen einer frühen Entwicklungsstufe als auch in Gehirn, Leber und Augen von bereits weiter entwickelten Embryonen und im Blut eines 2 Wochen alten Nestlings nachgewiesen werden (Kerski *et al.*, 2012). Allerdings wurde nicht in allen Embryonen infizierter Elterntiere Bornavirus-RNA nachgewiesen. Es scheinen somit nicht alle Eier von infizierten Elterntieren mit Bornaviren infiziert zu sein. Kunstbrut von Eiern infizierter Zuchtvögel und anschließende Handaufzucht könnte demnach eine Infektion von Küken verhindern (Kerski *et al.*, 2012). Ob Bornaviren das Absterben von Embryonen verursachen ist bislang nicht geklärt (Lierz *et al.*, 2011).

Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine horizontale Übertragung bei immunkompetenten Tieren nicht so häufig vorkommt wie bei Vögeln mit herabgesetzten Immunsystem (Woerpel & Rosskopf, 1984; Rubbenstroth *et al.*, 2014a) und dass sich die Krankheit bei ungünstigen Haltungsbedingungen (dichte Belegung, hohe Tierzahl, etc.) schneller ausbreitet (Clipsham, 1989). Analysen von Speer (1990) zufolge sind vermehrt Vögel im Alter von bis zu vier Monaten von der Krankheit betroffen. Diese Ansicht wird unterstützt von Kistler *et al.* (2010), die bei noch nicht futterfesten Küken bereits zwei bis vier Wochen nach erster Virusexposition Zeichen von PDD entdeckten. Die Krankheit verlief bei jungen Tieren besonders rasch und schwer.

Über die Tenazität aviärer Bornaviren in der Umwelt liegen bisher nur wenige Informationen vor. Bornaviren blieben in pH-adjustierten Salzlösungen bei pH-Werten zwischen 6 und 11 relativ stabil und erhielten über fünf Minuten ihre Infektiosität, bei einem pH-Wert von 8 und 9 blieb die Infektiosität über den

gleichen Zeitraum sogar vollständig erhalten. Allerdings reagierten sie empfindlich auf Austrocknung und verloren bei einer Temperatur von 25°C und gleichzeitiger Luftfeuchtigkeit von 21% zwischen 8 Stunden und 4 Tagen 36 bis 100% ihrer Infektiosität, sodass ein Überleben nach dem Ausscheiden in die Umgebung im trockenen Milieu wohl nur von kurzer Dauer ist (Kranz *et al.*, 2015).

#### 1.4 Wirtsspektrum der Papageien-Bornaviren

Nach der ersten Beschreibung von PDD in den 70-er Jahren bei Aras sind in den letzten Jahrzehnten zahlreiche weitere betroffene Vogelspezies hinzugekommen, darunter allein über 70 Papageienarten (Woerpel & Roskopf, 1984; Mannl *et al.*, 1987; Graham, 1991; Gregory *et al.*, 1994; Shivaprasad *et al.*, 1995; Reavill & Schmidt, 2007). Besonders häufig betroffen sind Vertreter aus den Familien der *Psittacidae* und *Cacatuidae*, und zwar Aras (*Ara* sp.), Graupapageien (*Psittacus erithacus*), Amazonen (*Amazona* sp.), Kakadus (*Cacatua* sp.) Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) und andere Sittiche (z.B. *Aratinga* sp.) (Gancz *et al.*, 2010).

Clipsham (1989) vermutete, dass hauptsächlich amerikanische und australische Papageienarten erkranken und die afrikanischen Arten weniger stark beeinträchtigt sind, außerdem seien vermehrt weibliche Tiere betroffen (Clipsham, 1989). Diese Annahmen konnten in späteren Studien jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen Papageien scheinen allerdings Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*) gegenüber einer Infektion resistent zu sein (Reavill & Schmidt, 2007; Tizard *et al.*, 2013). Tizard *et al.* (2013) vermuteten, dass diese starke Resistenz mit einer früheren Exposition der Art gegenüber dem Virus zusammenhängt, im Gegensatz zu den Neuweltpapageien, die hochempfindlich sind und eine hohe Todesrate aufweisen. Nymphensittiche sind zwar infizierbar, könnten aber, möglicherweise aus ähnlichen Gründen, häufig als gesunde Carrier-Tiere fungieren und somit ein Bornavirus-Reservoir darstellen (Tizard *et al.*, 2013).

Der neuropathischen Drüsenmagendilatation gleiche oder ähnliche Krankheitsbilder und (histo-) pathologischen Läsionen wurden auch bei anderen Vogelordnungen, wie Passeriformes, Anseriformes, Pelecaniformes, Falconiformes und Piciformes, beschrieben (Shivaprasad, 2005; Perpignan *et al.*,

2007; Weissenböck *et al.*, 2009b; Gancz *et al.*, 2010; Delnatte *et al.*, 2011; Payne *et al.*, 2011a; Guo *et al.*, 2012; Delnatte *et al.*, 2013; Rubbenstroth *et al.*, 2013; Rubbenstroth *et al.*, 2014b). Nachweise von Bornaviren erfolgten bislang aber nur bei Passeriformes und Anseriformes, die beteiligten Viren grenzen sich unter anderem in ihrer Genomsequenz deutlich von den Papageien-Bornaviren ab und werden, wie oben beschrieben, mittlerweile anderen Bornavirus-Spezies zugeordnet (Kuhn *et al.*, 2015).

Ob Bornaviren der Art *Psittaciform 1 Bornavirus* stets eine Wirtsspezifität für Papageienvögel besitzen, ist noch nicht völlig geklärt. So wurden bei einem Himalaya-Glanzfasan (*Lophophorus impejanus*) aus der Ordnung der Hühnervögel (Galliformes), der mit Papageienvögeln zusammen gehalten wurde, typische Anzeichen einer PDD beobachtet. Das Tier litt an chronischem Gewichtsverlust, Schwäche und Ataxie, die pathologische Untersuchung ergab eine nichteitrigte Enzephalitis und lymphoplasmazelluläre myenterische Ganglioneuritis. Die Untersuchung von Gehirngewebe mittels RT-PCR ergab eine positive Reaktion auf PaBV-4 (Bourque *et al.*, 2015). In dieser Publikation wurde nicht mitgeteilt, ob die Papageien dieses Bestandes mit PaBV-4 infiziert waren. Ob hier vielleicht nur eine Kontamination des Gewebes mit Virusmaterial erfolgt ist oder ob Glanzfasane tatsächlich mit Papageien-Bornaviren infizierbar sind und erkranken, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Eine Übertragung von vogelspezifischen Bornaviren auf Tierarten anderer Klassen ist bisher noch nicht beschrieben worden. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass Säugerkzellen nicht oder nur in geringem Maß infiziert werden können (Rinder *et al.*, 2009a; Gray *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2014).

### **1.5 Klinik**

Die klinische Symptomatik der PDD ist sehr variabel. Die Inkubationszeit kann sehr unterschiedlich lang sein und variiert zwischen einem Minimum von 11 Tagen (Gregory *et al.*, 1997) bis hin zu einer Dauer von Monaten oder sogar Jahren (Gregory *et al.*, 1997; Gancz *et al.*, 2009). Nach heutigem Verständnis handelt es sich wohl um persistierende Infektionen (Staheli *et al.*, 2010).

Es sind mittlerweile zahlreiche Fälle bekannt, bei denen Bornavirus-RNA oder anti-Bornavirus-Antikörper nachgewiesen wurden, die Tiere aber keine klinische Symptomatik zeigten (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2011b).

Neben einer Reihe von unspezifischen Symptomen wie Lethargie und Anorexie, treten bei Papageien gastrointestinale Symptome wie das Ausscheiden unverdauter Körner im Kot, Durchfall, Kropfstase, Regurgitieren, sowie intermittierendes Erbrechen und damit Gewichtsverlust und Auszehrung auf (Clark, 1984; Woerpel & Rosskopf, 1984; Graham, 1991; Gregory *et al.*, 1994; Shivaprasad *et al.*, 1995). Viele Vögel sind dehydriert und in unterschiedlichem Grad unterernährt, bei längerem Krankheitsverlauf ist häufig die Pektoralismuskulatur atrophiert, das heißt, der Ernährungszustand ist reduziert, unabhängig davon, ob eine Anorexie besteht, die Futteraufnahme gleichbleibend oder sogar vermehrt ist (Woerpel & Rosskopf, 1984; Gancz *et al.*, 2010). Ein häufiges Symptom ist auch die Polyurie (Ridgway & Gallerstein, 1983). In vielen Fällen sind neurologische Ausfälle zu beobachten, verursacht durch eine Schädigung des zentralen Nervensystems und in einigen Fällen einhergehend mit der Entwicklung von Enzephalitis und Myelitis. Klinisch äußert sich dies in Depression, Ataxie, Tremor, Torticollis, Paraparesis und zentraler Blindheit, in stark ausgeprägten Fällen bis hin zum Status epilepticus (Woerpel & Rosskopf, 1984; Degernes *et al.*, 1991; Graham, 1991; Lutz & Wilson, 1991; Gregory *et al.*, 1994; Berhane *et al.*, 2001; Steinmetz *et al.*, 2008; Gancz *et al.*, 2010). Betroffene Vögel können lediglich gastrointestinale oder neurologische Krankheitsanzeichen oder beides in Kombination entwickeln (Gregory *et al.*, 1997). Auch Federrupfen wurde bei einigen Vögeln mit bestätigten Bornavirusinfektionen oder bei PDD-Verdachtsfällen beobachtet (Horie *et al.*, 2012; Philadelpho *et al.*, 2014). Ob dies ätiologisch mit einer Bornavirusinfektion in Verbindung zu bringen ist, ist allerdings noch unklar.

In einem Fallbericht von Steinmetz *et al.* (2008) über einen an PDD erkrankten Graupapagei wurde neben den typischen Veränderungen am Magen-Darmtrakt eine Degeneration der Retina mit lymphoplasmazellulären Einschlüssen und einem daraus folgenden Funktionsverlust mit Blindheit festgestellt. Generell wurde ein gehäuftes Auftreten von Fundusläsionen mit Beeinträchtigung des Visus bei Papageien beobachtet, die mit Bornaviren infiziert und

an PDD erkrankt waren (Korbel & Rinder, 2011).

Insgesamt treten große Variationsbreiten hinsichtlich der Schwere der Symptome auf (Gancz *et al.*, 2010). Gelegentlich wird über Vögel berichtet, bei denen der Tod plötzlich, ohne vorherige Krankheitsanzeichen, eintritt (Gancz *et al.*, 2010; Philadelpho *et al.*, 2014). Meistens verläuft die Krankheit aber chronisch progressiv oder schubweise mit Phasen ohne Krankheitsanzeichen.

Für eine Bornavirusinfektion oder eine PDD spezifische Veränderungen von hämatologischen und blutchemischen Parametern sind bisher nicht bekannt (Gancz *et al.*, 2010). Es existieren derzeit lediglich Fallberichte, bei denen Blutuntersuchungen bei Vögeln mit vermuteter oder auch nachgewiesener PDD durchgeführt wurden. In diesen Fällen handelte es sich stets um natürlich infizierte Vögel, das gleichzeitige Vorkommen von anderen Erkrankungen oder Infektionen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die beschriebenen Veränderungen sind sehr vielfältig und heterogen. Zu mehrfach genannten Auffälligkeiten zählen Leukozytose, oft in Verbindung mit Heterophilie (Woerpel & Rosskopf, 1984; Rich, 1992; Suedmeyer, 1992; Bond *et al.*, 1993; Doneley *et al.*, 2007; Gancz *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2010), (leichte) Anämie (Ridgway & Gallerstein, 1983; Joyner *et al.*, 1989; Degernes *et al.*, 1991; Suedmeyer, 1992; Doneley *et al.*, 2007; Gancz *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2010), Hypoproteinämie bzw. Hypoalbuminämie (Ridgway & Gallerstein, 1983; Degernes *et al.*, 1991; Suedmeyer, 1992; Boutette & Taylor, 2004; Hadley *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2010), Hyperglobulinämie (Keller *et al.*, 2010), erhöhte Werte der Enzyme Aspartataminotransferase, Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase (Jenkins, 1991; Hadley *et al.*, 2005; Gancz *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2010), Hypoglykämie (Ridgway & Gallerstein, 1983), erhöhte Lipaselevel (Boutette & Taylor, 2004), Hyperamylasämie (Doneley *et al.*, 2007) und Hyperurikämie (Doneley *et al.*, 2007).

### 1.6 Pathologie und Histologie

Auch schon vor der Entdeckung des Bornavirus wurden pathologische und histologische Veränderungen der PDD beschrieben, die als charakteristisch gelten (Hoppes *et al.*, 2010). Ein erweiterter Drüsenmagen mit dünner Wand und lymphoplasmazelluläre Infiltrationen in myenterischen Ganglien und Nerven von Kropf, Drüsen- und Muskelmagen wurden von einigen Autoren als

pathognomisch angesehen (Woerpel & Rosskopf, 1984; Berhane *et al.*, 2001). Der reduzierte Muskeltonus führt zu einer Anschoppung von Ingesta (Clark, 1984) und damit letztendlich zu der Vergrößerung des Drüsenmagens, also der Veränderung, die der Erkrankung den Namen gab. Außerdem kann es zu Ulzerationen und zur Ruptur der Drüsenmagenwand mit daraus resultierender Peritonitis kommen (Gancz *et al.*, 2010). Ebenso kann das Duodenum erweitert sein. Auch eine durch den Druck des vergrößerten Drüsenmagens verursachte Atrophie anderer viszeraler Organe wurde beschrieben (Clark, 1984). Läsionen finden sich außerdem in Kropf und Ösophagus, Darm, Herz, Nebeniere, Rückenmark und Gehirn und in den Nervi ischiadicus, brachialis und vagus (Berhane *et al.*, 2001) sowie in der Bauchspeicheldrüse, am Auge und in der Haut (Clipsham, 1989; Vice, 1992; Shivaprasad *et al.*, 1995). Die Verteilung der Läsionen variiert jedoch von Fall zu Fall (Hoppes *et al.*, 2010). Unabhängig davon, ob beim lebenden Vogel eher gastrointestinale Krankheitsanzeichen oder eher ZNS-Symptome festgestellt worden waren, finden sich häufig Läsionen sowohl am Magen-Darmtrakt als auch im zentralen Nervensystem (Gancz *et al.*, 2010).

Seit der Entdeckung der aviären Bornaviren als Erreger der PDD wurden eine ganze Reihe von Untersuchungen zum Virusnachweis in unterschiedlichen Organen und Geweben durchgeführt. Bemerkenswert ist hier, dass die Viren nicht zytopathogen sind, also infizierte Zellen keine pathologischen Veränderungen zeigen, und dass das Vorkommen von entzündlichen Veränderungen, also von lymphoplasmazytären Infiltraten, nicht mit dem Vorkommen von Bornaviren korreliert (Rinder *et al.*, 2009a; Raghav *et al.*, 2010).

Mit Hilfe der Reversen Transkriptions-PCR konnte die Anwesenheit von Virus-Antigen in sehr vielen Organen von an PDD erkrankten Vögeln nachgewiesen werden (Rinder *et al.*, 2009a; Kistler *et al.*, 2010; Raghav *et al.*, 2010; Löffler, 2011). Zu den Geweben, die in der pathologischen Untersuchung positiv auf Bornavirus-RNA getestet wurden, gehören unter anderem Groß- und Kleinhirn, Rückenmark, Nervus ischiadicus, Ösophagus, Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, Dünndarm, Dickdarm (einschließlich Enddarm und Kloake), Pankreas, Niere, Nebeniere, Lunge, Leber, Herz, Milz, Bursa fabricii, Hoden, Muskel, Haut und Federn (Rinder *et al.*, 2009a; Kistler *et al.*, 2010; Löffler, 2011). Im Gegensatz zum BoD-Virus der Säugetiere, welches vor allem das

zentrale Nervensystem befällt, liegt bei Infektionen mit PaBV also ein breiter Gewebe- und Zelltropismus vor (Rinder *et al.*, 2009a; Kistler *et al.*, 2010). Außerdem ist bemerkenswert, dass Virus-RNA in allen Organen zu finden war, welche unter Umständen an der Virusausscheidung beteiligt sind (Speiseröhre, Kropf, Darm, Niere, Lunge, Trachea, Hoden, Haut und Federn) (Löffler, 2011). Es konnte mit dieser Methode allerdings nicht bei allen untersuchten Tieren, die aufgrund typischer PDD-Symptomatik gestorben waren bzw. eingeschläfert wurden, auch Virus-RNA nachgewiesen werden (Rinder *et al.*, 2009a). Mögliche Erklärungen dafür, neben einer inkorrekten klinischen Diagnose, könnte das Vorhandensein anderer Bornavirus-Genotypen sein, die mit der aktuell verwendeten PCR nicht entdeckt werden können oder aber es existieren bisher unbekannte (virale) Erreger, welche ein ähnliches Krankheitsbild hervorrufen (Rinder *et al.*, 2009a).

Bei immunhistochemischen Untersuchungen mittels Antiseren, die gegen Bornavirus-Nukleoprotein (N-Protein) gerichtet waren, konnten in den Gehirnen von PDD-verdächtigen Tieren Zellen mit Bornavirus-N-Protein identifiziert werden (Ouyang *et al.*, 2009). Weitere immunhistochemische Analysen ergaben jedoch auch, dass sich aviäre Bornaviren nicht nur auf die Zellen des Nervensystems beschränken (Rinder *et al.*, 2009a). Mit dieser Methode konnten zahlreiche Organe positiv getestet werden (Rinder *et al.*, 2009a; Raghav *et al.*, 2010; Löffler, 2011; Wünschmann *et al.*, 2011). Neben Gehirn, Rückenmark, Leber, Pankreas, Herz, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt waren auch die Augen, der Sehnerv und Gefäßwände betroffen (Löffler, 2011). Unstimmigkeit herrscht allerdings darüber, ob die Antigenverteilung bei Tieren, die durch eine besonders schwere PDD-Symptomatik aufgefallen waren, hauptsächlich nur Gewebe des zentralen Nervensystems und des Gastrointestinaltraktes betrifft (Kistler *et al.*, 2010). Wahrscheinlicher ist, dass es gerade bei diesen Tieren aufgrund von Virämie zu einer Verteilung im gesamten Organismus kommt, während sich bei nicht an PDD erkrankten Vögeln hingegen die Ausbreitung des Virus eventuell auf das Nervengewebe beschränkt (Lierz *et al.*, 2009). Bei vergleichenden Untersuchungen ergab sich eine große Übereinstimmung bei den Ergebnissen von Immunhistochemie und PCR, wobei letztere allerdings sensitiver zu sein scheint (Löffler, 2011).

Auch mittels in situ Hybridisierung (ISH) konnten virales Genom und mRNA im Gewebe von betroffenen Vögeln lokalisiert werden. ISH-Signale wurden im Gehirn, im vegetativen Nervensystem, im Drüsenepithel und in Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes und in Kardiomyozyten nachgewiesen (Weissenböck *et al.*, 2010).

### 1.7 Pathogenese

Auch neun Jahre nach der Entdeckung des Zusammenhangs zwischen der Bornavirusinfektion bei Papageienvögeln und der neuropathischen Drüsenmagendilatation ist aktuell die genaue Pathogenese immer noch nicht vollständig aufgeklärt.

Bisher wurden zahlreiche Unterschiede in der Pathogenese zwischen den Bornaviren bei Säugern und bei Papageienvögeln festgestellt. So haben immunhistochemische Untersuchungen gezeigt, dass sich eine Bornavirus-Infektion bei Vögeln nicht nur auf Zellen des Nervensystems beschränken muss. Auch in extraneuralen Geweben konnte Virusantigen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Borna Disease Virus der Säugetiere zeichnen sich die vogelspezifischen Bornaviren also durch einen weiten Gewebs- und Zelltropismus aus. (Ouyang *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2009a; Weissenböck *et al.*, 2009a; Weissenböck *et al.*, 2010; Piepenbring *et al.*, 2012). Ein weiterer Unterschied der Bornavirusinfektion bei Vögeln besteht darin, dass intrazellulär im Vergleich zur genomischen Virus-RNA eine geringere Menge an mRNA nachweisbar ist, während bei Borna Disease Viren das Umgekehrte beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass bedingt durch eine größere Effektivität der Abwehrmechanismen des Wirtes die Transkriptions-Effizienz der aviären Bornaviren niedriger ist. Eine Konsequenz davon könnte möglicherweise auch der generell eher chronische Verlauf der Krankheit bei Vögeln sein (Weissenböck *et al.*, 2010).

Möglicherweise gibt es aber auch Gemeinsamkeiten in der Pathogenese zwischen dem Borna Disease Virus und dem Psittaciform 1 Bornavirus. So wurde bei in-vitro-Versuchen festgestellt, dass aviäre Bornaviren, ebenso wie das Borna-Disease-Virus, möglicherweise der Erkennung durch das angeborene Immunsystem des Wirtes entgehen können, indem sie die 5'-Enden ihrer genomischen und anti-genomischen RNA kürzen und so alle tri-phosphor-Reste



entfernen, die von den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden können (Reuter *et al.*, 2010). Außerdem wurden in-vitro bei persistent mit Bornaviren infizierten Wachtelzellen zwar intrazellulär große Mengen an Virus-RNA gefunden, in den Überständen der infizierten Kulturen jedoch kein biologisch aktives Typ 1 Interferon nachgewiesen. Auch bei Borna Disease Virus ist bekannt, dass es nur zur geringen Interferon-Induktion kommt. Diese Ergebnisse stützen daher die Auffassung, dass aviäre Bornaviren vergleichbare Strategien anwenden, um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen (Reuter *et al.*, 2010).

Bei vielen infizierten Vögeln konnten, ähnlich wie bei befallenen Säugetieren, nichteitrige Entzündungen im Gehirn und in weiteren Teilen des Nervensystems festgestellt werden. Nicht bekannt ist allerdings, ob sich diese Entzündungen vom Gehirn aus über die Gehirnnerven und das Rückenmark zentrifugal ausbreiten oder umgekehrt (Tizard *et al.*, 2016). Eine besondere Bedeutung in der Pathogenese kommt möglicherweise den *Nervi opticus* und *vagus* zu. Eine Ausbreitung der Infektion über diese Nerven könnte somit zu Retinitis und Blindheit führen bzw. eine Dilatation des Drüsenmagens verursachen (Steinmetz *et al.*, 2008; Tizard *et al.*, 2016). Neurologische Symptome wie Ataxie und Lähmungen könnten hingegen auf eine Ausbreitung durch das Rückenmark zurückzuführen sein (Tizard *et al.*, 2016).

### 1.8 Differentialdiagnosen

Zu den Differentialdiagnosen einer neuropathischen Drüsenmagendilatation gehören chronische Magen-Darmerkrankungen infektiöser oder nichtinfektiöser Ursache und Erkrankungen mit ZNS-Symptomatik:

Die infektiösen Ursachen können hierbei weiter unterteilt werden in bakterielle Erreger, wie Chlamydien, Mykobakterien, Salmonellen und Enterobacteriaceae, Virusinfektionen, unter anderem Paramyxo-, Herpes- oder Adenoviren und Parasiten, hierbei vor allem Spul- und Bandwürmer (Woerpel & Roskopf, 1984; Graham, 1991; Rinder *et al.*, 2009b; Gancz *et al.*, 2010). Daneben können auch einige Mykosen, wie Aspergillose, Candidose oder Megabakteriose Krankheitssymptome ähnlich denen einer PDD hervorrufen (Rinder *et al.*, 2009b; Gancz *et al.*, 2010). Zu den nichtinfektiösen Differentialdiagnosen gehören mechanische Probleme beim Transport der Ingesta durch den Magen-Darm-Trakt,

verursacht beispielsweise durch Verlegungen aufgrund von Fremdkörpern, Bezoaren und Tumoren oder auch durch eine Coracoid-Fraktur (Woerpel & Rosskopf, 1984; Gerlach, 1986). Weiterhin müssen Vergiftungen mit Pflanzengiften und vor allem mit Schwermetallen wie Blei oder Zink ausgeschlossen werden (Ridgway & Gallerstein, 1983; Woerpel & Rosskopf, 1984; Phalen, 1986; Graham, 1991; Rinder *et al.*, 2009b; Gancz *et al.*, 2010). Außerdem sollten auch ein möglicher Vitamin E-/Selen-Mangel und die physiologische Magendilatation bei Jungvögeln berücksichtigt werden (Woerpel & Rosskopf, 1984; Rinder *et al.*, 2009b).

### 1.9 Diagnostik

Vor der Entdeckung der aviären Bornaviren galt, neben den klinischen Symptomen, die histologische Untersuchung einer Biopsie der Wand des Magen-Darm-Traktes mit Nachweis lymphoplasmazytärer Infiltrate und einer Degeneration von Ganglien als Gold-Standard für die Diagnose einer neuropathischen Drüsenmagendilatation am lebenden Tier (Bond *et al.*, 1993). Da die Entnahme einer Biopsie aus Drüsen- oder Muskelmagen einen sehr invasiven Eingriff darstellt, wurden häufig Kropfbiopsien genommen (Doolen, 1994). Die Sensitivität dieser Methode war allerdings gering. Bei einer Evaluierungsstudie über die histologischen Untersuchungen von Kropfbiopsaten ergaben sich falsch-negative Ergebnisse in ca. 24% der Fälle (Gregory *et al.*, 1996a). Durch Sondenfütterung, die bei abgemagerten Vögeln häufig durchgeführt wird, kann es zu Verletzungen der Kropfschleimhaut kommen, was die Beurteilung einer Biopsie erschwert. Der linke, kraniale Teil des Kropfes ist aber in der Regel nicht beeinträchtigt und eignet sich damit bevorzugt für eine Biopsie (Gregory *et al.*, 1996a).

Weitere Methoden, die im Rahmen der PDD-Diagnostik angewendet werden, dienen dazu, klinische Symptome nachzuweisen, die allerdings nicht pathognomonisch sind und auch nicht konstant in allen Fällen auftreten. So werden häufig in frühen Phasen der diagnostischen Kaskade bildgebende Verfahren, wie Röntgen, inklusive Kontraströntgen (Woerpel & Rosskopf, 1984; Gerlach, 1986; Bond *et al.*, 1993; Degernes *et al.*, 1996) und Sonographie eingesetzt. Radiologisch feststellbare Veränderungen treten jedoch nicht konstant auf (Degernes *et al.*, 1996). Häufig wird nach Einsatz eines Röntgenkontrastmittels ein erweiterter Drüsenmagen, gefüllt mit Ingesta und

eventuell mit variablen Anteilen an Gas, beobachtet (Doneley *et al.*, 2007; Gancz *et al.*, 2010). Daneben können aber auch andere Teile des Magen-Darm-Traktes, wie Kropf, Muskelmagen oder kraniale Dünndarmanteile, erweitert sein. Mit Kontrastströntgenstudien können nicht nur die Größe und die Lage der einzelnen Abschnitte des Magen-Darm-Traktes, sondern auch Passagezeiten ermittelt werden (Bond *et al.*, 1993; Gancz *et al.*, 2010). Bei Vögeln mit PDD wurde in einigen Fällen eine verlängerte Passagezeit festgestellt (Bond *et al.*, 1993; Gregory *et al.*, 1994). Allerdings wurden auch normale oder verkürzte Passagezeiten nachgewiesen, (Gancz *et al.*, 2010).

Seit der Entdeckung der Bornaviren als ursächliche Erreger der PDD stützt sich die Diagnose der Krankheit bei Vögeln mit einer entsprechenden klinischen Symptomatik auf den direkten oder indirekten Virusnachweis. Dazu wurden verschiedene molekularbiologische Methoden zum Nachweis der Virus-RNA und serologische Verfahren zum Antikörpernachweis etabliert, mit deren Hilfe sich die persistierende Infektion bestätigen lässt.

Reverse Transkriptase-PCR-Techniken zum Nachweis von Bornavirus-RNA wurden erstmals im Jahre 2008 entwickelt und angewendet (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008). Es existieren verschiedene Realtime- und konventionelle PCR-Protokolle, die auf unterschiedliche Zielgene, und zwar meist auf das L-Polymerase-, Matrix-, Nukleoprotein- oder Phosphoprotein-Gen gerichtet sind. Sie werden zum Nachweis von Bornavirus-RNA bei lebenden Tieren und bei Organgewebe im Rahmen einer pathologischen Untersuchung eingesetzt (Brüggemann, 2012).

Bei lebenden Tieren werden als Untersuchungsmaterial meist Choanen-, Kropf- und Kloakentupfer, seltener Kotproben oder Federkiele, herangezogen. Bei nicht-gefäßhaltigen Federkielen aus dem Brustdeckgefieder soll auch nach vierwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur noch Bornavirus-RNA nachweisbar sein (De Kloet *et al.*, 2011).

Beim lebenden Tier sind PCR-Untersuchungen aus Choanen-, Kropf- und Kloakentupfern aber nicht in jedem Fall ausreichend sensitiv, da bei einigen Vögeln mit negativem Befund post mortem Bornavirus-RNA im Gehirn oder in anderen Organen nachgewiesen wurde (Lierz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2010b).

Serologische Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen Bornaviren

werden bei Papageienvögeln mittlerweile standardmäßig eingesetzt. Sie zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus und erlauben häufig den Nachweis einer Infektion bei Vögeln zu einem Zeitpunkt, an dem die Virusausscheidung über Epithelien des Gastrointestinaltraktes und die Kloake noch so gering ist, dass die PCR negativ ausfällt. In der Regel finden ELISA-Techniken oder die Immunfluoreszenz Anwendung.

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein mittlerweile sehr bewährtes serologisches Diagnostikverfahren (Rinder *et al.*, 2010a; De Kloet *et al.*, 2011). Bei der Bestimmung der Sero-Prävalenz von Bornavirusinfektionen in einem Papageienbestand wurden bei 16 von 39 Vögeln Anti-Bornavirus-Antikörper nachgewiesen, Virus-RNA konnte mittels rRT-PCR in den Kotproben von 6 Tieren gefunden werden, klinische Anzeichen einer PDD zeigte nur ein Vogel (Rinder *et al.*, 2010a). In einer anderen Studie konnten ebenfalls gute Ergebnisse in der Identifikation von Anti-Bornavirus Nukleoprotein P40 Antikörpern erzielt und somit viele infizierte Vögel erkannt werden, auch in den Fällen, bei denen eine RT-PCR nicht anschluss (De Kloet *et al.*, 2011).

Herzog *et al.* (2010) etablierten den indirekten Immunofluoreszenz Assay (indirect immunofluorescence assay, IIFA) zum *intra vitam* Nachweis von bornaviruspezifischen Serumantikörpern. Der IIFA basiert hier auf der Kreuzreaktivität von psittazinen Antikörpern mit Säugetier-BoDV-Antigenen und der Bindung an Bornavirus-Antigenen. Er erreichte in dieser Studie eine Sensitivität, die mit einem IIFA mit PaBV-Antigen vergleichbar war (Herzog *et al.*, 2010). Allerdings wurden in einer anderen Studie Sensitivitätsunterschiede im IIFA bei Verwendung unterschiedlicher Antigene belegt und die höchste Sensitivität für den Nachweis von anti-PaBV-Antikörpern bei Papageien wurde mit PaBV als Antigen erreicht (Zimmermann *et al.*, 2014).

Der Western-Blot wurde ebenfalls als serologisches Verfahren bei Vögeln zur Detektion von anti-Bornavirus-Antikörpern getestet (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2010b; Villanueva *et al.*, 2010). Im Vergleich zum ELISA besitzt der Western-Blot jedoch eine geringere Sensitivität (Rinder, persönl. Mitteilung). Außerdem handelt es sich hierbei um eine teure und arbeitsintensive Technik, die für die Routinediagnostik oder eine größere Probenzahl daher weniger geeignet ist (Hoppes *et al.*, 2010 und Rinder, persönliche Mitteilung).

Die große genetische Diversität stellt die Bornavirus-Diagnostik vor Herausforderungen. Während die verwendeten serologischen Verfahren, insbesondere der ELISA, in der Regel ein breites Spektrum an genetischen Varianten erkennen, können bei PCR-Techniken Mutationen in der Primer- oder der Sondenregion zu falsch negativen Ergebnissen führen. So ist es zu erwarten, dass mittels PCR entfernt verwandte oder bisher unbekannte Genotypen möglicherweise nicht erkannt werden (Rubbenstroth *et al.*, 2012).

Ein in der Routinediagnostik häufiges Untersuchungsergebnis ist mittels serologischer Verfahren erfolgter Antikörpernachweis bei gleichzeitig negativem Virus-RNA-Nachweis in der PCR-Untersuchung (Rinder *et al.*, 2009b; Rinder *et al.*, 2010a; Villanueva *et al.*, 2010). Ein solches Ergebnis spiegelt also vermutlich eine frühe Phase der Infektion wider und vielleicht nur gelegentlich ein falsch negatives PCR-Ergebnis (siehe auch Rinder *et al.*, 2010a). Insbesondere bei niedriger Intensität der Reaktion besteht jedoch die Gefahr, dass unspezifische serologische Reaktionen als falsch positiv beurteilt werden. Über positive PCR-Ergebnisse bei negativer Serologie wurde auch gelegentlich berichtet, wobei hier natürlich zu bedenken ist, dass ein falsch positives Ergebnis der PCR aufgrund von Kontaminationen nicht immer ganz ausgeschlossen werden kann. Für eine möglichst sichere intra-vitam-Diagnostik empfiehlt es sich daher sowohl eine PCR als auch serologische Verfahren anzuwenden.

### **1.10 Therapiemöglichkeiten und Prävention**

Es existiert bis heute noch keine kausale Therapie für die neuropathische Drüsenmagendilatation. Aufgrund der Persistenz der Virusinfektion muss von einer Mortalitätsrate von bis zu 100% ausgegangen werden. Die angewandten therapeutischen Maßnahmen sind symptomatischer bzw. palliativer Natur (Gancz *et al.*, 2012) und können in der Regel das Fortschreiten der Entkräftung und der ZNS-Störungen sowie das Auftreten von Sekundärinfektionen zwar verzögern, aber nicht stoppen (Dahlhausen & Orosz, 2015). Behandlungsempfehlungen stützen sich bislang primär auf klinisch-empirische Erfahrungen und Einzelfälle. Kontrollierte Studien mit einer größeren Zahl von Patienten existieren bislang nicht.

Zum Ausgleich der beeinträchtigten Funktion des Magen-Darm-Traktes bei der Verdauung ist es, insbesondere bei Vögeln mit Magen-Darm-Symptomatik,

erforderlich, die Fütterung auf eine leicht verdauliche und hochenergetische Diät (zum Beispiel Pellets) umzustellen (Gregory *et al.*, 2000; Clubb & Meyer, 2006). Bei starker Abmagerung und reduziertem Allgemeinbefinden ist häufig zunächst eine Zwangsfütterung mit energiereichem Brei notwendig. Bei der Fütterung mittels Kropfsonde sollte beachtet werden, dass bei kranken Vögeln, die nur geringe Mengen Futter aufnehmen, das Kropfvolumen verringert sein kann (Orosz, 2015).

Arzneistoffe wie Metaclopramid oder Cisaprid, die die Peristaltik des Magendarmtraktes anregen, führen häufig zu einer verbesserten Passage der Ingesta bei betroffenen Vögeln (Clubb & Meyer, 2006; Dahlhausen & Orosz, 2015).

Aufgrund des entzündlichen Charakters der Ganglioneuritis und Enzephalomyelitis hat sich bei erkrankten Vögeln der Einsatz von selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren als lebensverlängernde und lebensqualitätsverbessernde Maßnahme erwiesen (Dahlhausen *et al.*, 2002; Dahlhausen & Orosz, 2015). Der Wirkstoff Celecoxib zeigte sich hierbei als besonders hilfreich, sicher und gut verträglich (Dahlhausen *et al.*, 2002). Der Behandlungserfolg wird allerdings als variabel eingestuft, und bei fortgeschrittener klinischer Erkrankung verläuft die Therapie meistens nicht mehr zufriedenstellend (Gancz *et al.*, 2012). Eine Verbesserung des klinischen Allgemeinbefindens wird in der Regel in den ersten 7-14 Tagen der Behandlung beobachtet. Bei vorzeitiger Beendigung der Therapie kann es allerdings wieder zu einer Verschlechterung der Krankheitssymptome kommen (Dahlhausen *et al.*, 2002). Am größten ist der Behandlungserfolg mit Celecoxib bei Vögeln, die sich noch in einem frühen Stadium der Krankheit befinden (Dahlhausen *et al.*, 2002). Meloxicam, ein weiteres nichtsteroidales Antiphlogistikum, hat sich im Vergleich zu Celecoxib als weniger effektiv erwiesen (Gancz *et al.*, 2012). Positive Erfahrungen liegen einem Fallbericht zufolge für Tepoxalin vor, ein Wirkstoff mit hemmender Wirkung für Cyclooxygenase-1 und -2 und für 5-Lipoxygenase (Gancz *et al.*, 2010).

Möglicherweise besitzt auch Cyclosporin A eine positive Wirkung. So wurde ein Fallbericht publiziert, bei dem ein Graupapagei mit nachgewiesener PaBV-4-Infektion und klinisch ausgeprägter PDD über 5 Monate mit 10mg/kg 2x täglich oral mit einem Cyclosporin-A Präparat behandelt wurde. Dabei wurde eine

klinische Heilung über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten erzielt, eine Viruselimination konnte allerdings nicht erreicht werden (Gancz *et al.*, 2012).

In-vitro-Untersuchungen ergaben eine durch Typ 1 Interferon reduzierte Aktivität von aviären Bornaviren in persistent infizierten Wachtelzellen, möglicherweise verursacht durch eine Blockade im Replikationszyklus des Virus (Reuter *et al.*, 2010). Auch mithilfe von Ribavirin, einem antiviralen Nukleosid-Analogen, konnte die Replikation von PaBV in infizierten aviären Zellen verhindert werden und es kam zu einer Abnahme der Viruslast (Musser *et al.*, 2015; Reuter *et al.*, 2016). Als besonders wirksam beim in-vitro-Versuch erwies sich jedoch eine Kombination aus beiden, Ribavirin und rekombinantem Interferon  $\alpha$ , wodurch sich die antivirale Effektivität verbessern ließ. Diese kombinierte Anwendung könnte nach Meinung der Autoren eine neue Behandlungsmöglichkeit für mit Bornaviren infizierte Papageien darstellen (Reuter *et al.*, 2016). Eine japanische Forschungsgruppe untersuchte die antivirale Aktivität von Favipiravir (T-705) gegen Säugetier- und Vogel-Bornaviren in der Zellkultur. Hiermit konnte die Viruslast auf ein basales Level gebracht werden und nach Beendigung der T-705-Behandlung setzte die virale Replikation von BoDV-1 auch nicht wieder ein (Tokunaga *et al.*, 2017). Inwieweit es mit Favipiravir möglich ist, Bornaviren aus infizierten Zellen, auch in vivo, zu eliminieren, ist noch nicht geklärt.

Eine zusätzliche Therapie mit antibakteriellen und/oder antifungalen Medikamenten ist ebenfalls indiziert, um dem Wachstum von fakultativ pathogenen Anaerobiern und Hefepilzen Einhalt zu gebieten (Clubb & Meyer, 2006; Dahlhausen & Orosz, 2015). Zur Wiederherstellung der physiologischen Darmmikrobiota können außerdem Pre- oder Probiotika unterstützend wirksam sein (Gray *et al.*, 2009; Dahlhausen & Orosz, 2015).

Für eine Bestandssanierung bei Züchtern ist es erforderlich, (sero-) positive Tiere abzutrennen. Aufgrund einer fehlenden ätiologischen Therapie und dem Persistieren der Infektion ist das Verhindern einer Einschleppung derzeit die einzige wirksame Maßnahme, freie Bestände auch frei zu halten. Es müssen also Eingangsuntersuchungen durchgeführt werden und positive Tiere dürfen nicht in den Bestand aufgenommen werden.

Nachkommen, Geschwister- und Partnertiere von bereits infizierten bzw. erkrankten Vögeln sollten besonders gut beobachtet und gegebenenfalls isoliert

werden. Außerdem ist es sinnvoll, eine stressarme Umgebung für diese Tiere zu schaffen und potentielle Sekundärinfektionen zu behandeln. Auf diese Weise können auch betroffene Kontaktvögel noch Monate oder sogar Jahre überleben und eventuell auch komplett symptomfrei bleiben (Gregory *et al.*, 2000). Eine Infektion mit Bornaviren ist daher noch keine Indikation für eine Euthanasie.

Ob Impfungen eine Möglichkeit der Bekämpfung von Infektionen mit aviären Bornaviren oder von durch sie induzierte Erkrankungen darstellen, ist derzeit noch unklar. Erste Erfahrungen wurden im Jahr 2016 mit Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) und Kanarienvögeln (*Serinus canaria* forma domestica) als Versuchstieren publiziert (Olbert *et al.*, 2016). Mithilfe zweier verschiedener viraler Vektoren, einem rekombinanten Newcastle Disease-Virus und einem Modified-Vaccinia-Ankara-Virus, in die unterschiedliche Fragmente von PaBV-4 oder CnBV-2 einligiert waren, also unter Verwendung rekombinanter Vakzinen, konnte eine Bornavirus-spezifische Immunantwort in den Versuchstieren erzeugt werden. Nach Belastungsinfektion mit den jeweiligen Bornaviren, PaBV-4 bzw. CnBV-2, waren die Ausscheidung von Bornavirus-RNA und die Viruslast in Gewebeproben bei den immunisierten Vögeln im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Dennoch entwickelten zwei von fünf geimpften Nymphensittichen klinische Symptome, während dies bei keinem der sechs Kontroll-Nymphensittichen der Fall war. Auch wenn diese Impfung den Verlauf der Bornavirusinfektion verzögern konnte, bewirkte sie dennoch keinen Schutz gegen PDD (Olbert *et al.*, 2016).

In einer Folgestudie (Runge *et al.*, 2017), ebenfalls unter der Verwendung von Nymphensittichen als Versuchstiere und der gleichen Vektorvakzine mit PaBV-4, wurde von dieser Arbeitsgruppe ein ähnlicher Versuchsaufbau gewählt. Die Belastungsinfektion wurde diesmal allerdings mit einem heterologen Parrot Bornavirus 2 durchgeführt, welches zusätzlich in einer etwa 10-fach niedrigeren Dosis verabreicht wurde. Bei dem so durchgeführten Experiment wurden nur geringe Mengen Virus-RNA bei zwei von sechs Tieren in den Organen nachgewiesen, klinische Auffälligkeiten oder makroskopische Läsionen wurden nicht festgestellt. Neben dem höheren Alter der diesmal verwendeten Tiere könnte auch die niedrigere Dosis des Infektionsvirus oder die vermutete langsamere Kinetik einer PaBV-2 Infektion (im Vergleich zu einer PaBV-4 Infektion) für den besseren Schutz verantwortlich sein (Runge *et al.*, 2017).



Auch eine amerikanische Forschungsgruppe arbeitet derzeit offenbar an der Entwicklung eines Impfstoffes, genaue Informationen wurden bislang aber nicht publiziert (Hameed *et al.*, 2016).

### 1.11 Infektionsversuche

Seit ihrer Entdeckung 2008 wurden bereits mehrere, meist erfolgreiche, Infektionsversuche mit Bornaviren bei verschiedenen Vogelarten publiziert. Einige Infektionsversuche beschäftigten sich zunächst damit, Modelle für die Infektion mit Papageien-Bornaviren aus dem Versuchstierbereich zu finden. Papageienvögel sind Tiere mit großer kognitiver Intelligenz, sie stellen hohe Anforderungen an ihre Haltung.

Zur Evaluierung von Enten als mögliche Modell-Versuchstiere wurden 22 SPF-Khaki-Campbell-Entenküken intramuskulär, intraokulär und per os mit Bornaviren des Typs PaBV-4 infiziert, die von einem an PDD erkrankten Papagei stammten und in Enten-Embryo-Fibroblasten kultiviert worden waren. Mittels Western Blot wurde 20 Wochen p.i. im Gehirn der Enten Bornavirusmaterial nachgewiesen, das Krankheitsbild einer PDD wurde jedoch nicht reproduziert (Gray *et al.*, 2009). Ob es sich bei dem im Gehirn der Enten nachgewiesenen Virus tatsächlich um das Infektionsvirus handelt, wurde nicht dokumentiert.

Ein weiterer Versuch zielte auf die Evaluierung der Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) als mögliches Tiermodell für Infektionen mit Bornaviren und die Neuropathische Drüsenmagendilatation ab (Brüggemann, 2012). Wachteln stellen generell geeignete Versuchstiere dar, da sie aufgrund ihrer geringen Größe niedrige Platz- und Futteransprüche haben und eine schnelle Embryonalentwicklung und eine frühe Geschlechtsreife aufweisen. Sie wurden außerdem ausgewählt, weil sich bei in-vitro Versuchen die Wachtelzelllinie CEC-32 als sehr gut geeignet für die Anzucht von Bornaviren erwiesen hat. Zu Beginn wurden 20 Tiere im Alter von 10 Tagen auf okulonasalem Weg mit in Zellkultur vermehrtem und aufgereinigtem ABV-4 (PaBV-4) infiziert. Zehn Wachteln wurden 4 Wochen p.i. als Kontakttiere dazugesetzt und weitere fünf Wachteln dienten als nicht infizierte Kontrollen. Über einen Beobachtungszeitraum von 3 Monaten wurden in 2-wöchigem Abstand Kloakentupfer und Blutproben mittels rRT-PCR und ELISA auf Virus-RNA bzw. Antikörper untersucht. Außerdem wurden Allgemeinbefinden und Gewicht der Tiere regelmäßig beurteilt. Nach der

Euthanasie wurden die Organe der Wachteln histologisch, immunhistochemisch und mittels rRT-PCR untersucht. Es ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine erfolgreiche Infektion oder die Entwicklung einer PDD (Brüggemann, 2012).

Die Suche nach Tiermodellen für die Forschung der Bornavirusinfektion und neuropathischen Drüsenmagendilatation blieb bisher erfolglos und die experimentelle Forschung auf diesem Gebiet war daher bislang auf die Verwendung von Psittaciformes angewiesen. Da es keine klassische Versuchstierzucht bei dieser Vogelgruppe gibt, wurden die ersten Infektionsversuche mit Tieren durchgeführt, bei denen eine Erregerfreiheit vor Versuchsbeginn nicht sicher nachgewiesen wurde.

In einer der ersten publizierten Studien auf diesem Gebiet wurden zwei Felsensittiche (*Cyanoliseus patagonis*) intramuskulär und per os mit Zellkultur-Virusmaterial infiziert, das ursprünglich aus den Gehirnen von Vögeln stammte, bei denen eine neuropathische Drüsenmagendilatation bestätigt worden war. Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um vorher bei Privatpersonen gehaltene Vögel, die bekannte Träger von Psittaziden-Herpesviren waren, deren exakte Vorgeschichte, auch hinsichtlich einer möglichen Bornavirusinfektion, aber unbekannt war. Bei den Vögeln waren Antikörper gegen Bornaviren ab Tag 33 p.i. nachweisbar, sie schieden Viren ab Tag 60 p.i. mit dem Kot aus und entwickelten 66 Tage nach der Infektion klinische Anzeichen einer PDD. Eine Infektion mit Bornaviren wurde mittels RT-PCR bestätigt und einer PDD entsprechende histologische und pathologische Veränderungen wurden ebenfalls nachgewiesen. Ein Kontrollvogel, der Zellkulturen aus nichtinfektiösem Gewebe erhalten hatte, blieb gesund und zeigte weder Läsionen in der pathologischen und histopathologischen Untersuchung noch einen positiven Virus-RNA-Nachweis im Gehirn. (Gray *et al.*, 2010).

Nymphensittiche haben sich bei Infektionsversuchen als geeignete Versuchstiere erwiesen. In einem ersten Versuch mit dieser Vogelart, bei dem Vögel von einem lokalen Züchter verwendet wurden, wurden drei Tiere auf verschiedenen Routen (intramuskulär, intraokular, intranasal und oral) mit Gehirnhomogenisaten eines an PDD erkrankten Graupapagei, bei welchem Parrot Bornavirus 4 nachgewiesen worden war, infiziert. Zwei der Tiere entwickelten klinische Anzeichen einer PDD. Makro- und mikroskopische Läsionen, die auf eine PDD hindeuten, wurden bei allen drei infizierten Nymphensittichen gefunden. Außerdem konnte mittels

RT-PCR Virus-RNA, nahezu identisch zu der, mit welcher die Tiere infiziert wurden, in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden. Zwei weitere Vögel, die als Kontakttiere dienten, zeigten keine klinischen oder pathologischen Anzeichen einer PDD und auch die RT-PCR und die immunhistochemische Untersuchung erbrachten hier ein negatives Ergebnis. Die von den Autoren gezogene Schlussfolgerung eines kausalen Zusammenhanges zwischen einer Bornavirusinfektion mit PaBV-4 und einer PDD bei Nymphensittichen (Gancz *et al.*, 2009) wird allerdings dadurch beeinträchtigt, dass in dem Herkunftsbestand der Nymphensittiche im Laufe des Versuches natürliche Infektionen mit PaBV-2 nachgewiesen wurden und weitere Informationen über dort vorkommende Erkrankungen nicht übermittelt wurden.

Auch in zwei weiteren Experimenten wurden Nymphensittiche verwendet, die bereits natürlich mit aviären Bornaviren infiziert waren. So wurden zwei adulte Nymphensittiche, die mit PaBV-4 subklinisch infiziert waren, mit einem ABV-2 (PaBV-2)-Isolat, bei dem eine niedrige Virulenz angenommen wurde, infiziert. Dieses PaBV-2-Isolat stammte aus dem Gehirn eines Nymphensittichs, der keine klinischen Symptome einer PDD gezeigt hatte und bei der histopathologischen Untersuchung nur leichte Entzündungsprozesse am Herzen und im Gehirn, nicht aber am Magen-Darm-Trakt aufwies. Die beiden Vögel wurden sowohl oral als auch intramuskulär infiziert und zeigten 33 bzw. 41 Tage später klinische Anzeichen einer PDD. Die pathologische Untersuchung ergab bei beiden Tieren Veränderungen am Magen-Darm-Trakt, und zwar einen leicht vergrößerten Drüsenmagen, und außerdem histologisch erkennbare Läsionen, typisch denen einer PDD, in einigen Organen (Mirhosseini *et al.*, 2011).

Bei einem weiteren Versuch (Payne *et al.*, 2011b) mit vier Tieren aus dem gleichen Bestand, die ebenfalls klinisch gesunde Carrier von ABV-4 (PaBV-4) waren, wurde für die experimentelle Infektion ein virulenter PaBV-4-Stamm (M24) aus einer Enten-Embryofibroblasten-Zellkultur verwendet. Die vier Vögel blieben bis Tag 92 post infectionem bei guter Gesundheit, dann verstarb ein Tier plötzlich und die übrigen Nymphensittiche entwickelten schwerwiegende neurologische Symptome, Ataxien und Krämpfe und wurden daraufhin an Tag 110 p.i. euthanasiert. Auch bei diesen Tieren war der Drüsenmagen jeweils leicht vergrößert. Im Gegensatz zum vorher beschriebenen Versuch ergab die histopathologische Untersuchung jedoch ungewöhnlich starke und weitgestreute

Gewebeschädigungen. Es wurde gefolgert, dass die bereits bestehende, natürliche Bornavirusinfektion mit PaBV-4 nicht zu einer schützenden Immunität gegenüber einer Superinfektion mit einem anderen PaBV-4-Stamm geführt hat, sondern eventuell sogar für die besondere Schwere der Krankheit nach der künstlichen Infektion verantwortlich war. Für die besonders starken Gewebsschädigungen im Vergleich zur Studie von Mirhosseini *et al.* (2011) führten die Autoren zwei mögliche Ursachen an. Zum einen könnte die, im Vergleich zum ersten Versuch, längere Überlebensdauer dazu geführt haben, dass sich stärkere mikroskopische Läsionen ausbildeten. Zum anderen wäre auch die Möglichkeit einer zellmedierten Hypersensitivitätsreaktion in Betracht zu ziehen, die nach Sensibilisierung durch die natürliche Infektion bei der experimentellen Infektion ausgelöst wurde und die außergewöhnlich schwerwiegende Entzündungsreaktion zur Folge hätte (Payne *et al.*, 2011b).

In der ersten Studie, in der Nymphensittiche mit vor Versuchsbeginn nachgewiesener und damit gesicherter Freiheit von Infektionen mit aviären Bornaviren verwendet wurden (Piepenbring *et al.*, 2012), wurden insgesamt 18 Tiere, zur Hälfte intracerebral, zur Hälfte intravenös, mit Bornaviren, Genotyp PaBV-4, infiziert. Die Vögel wurden über einen Zeitraum von 33 Wochen nach der Infektion beobachtet und Serokonversion, Anwesenheit von Virus-RNA und -Antigen, klinische Symptome und histopathologische Veränderungen genau dokumentiert. Es kam bei allen Tieren zu einer persistierenden Infektion, die klinischen Verläufe unterschieden sich jedoch. Die Krankheitsanzeichen waren gastrointestinal und/oder neurologischer Natur. Außerdem gab es sowohl klinisch gesunde Vögel als auch plötzliche Todesfälle. Alle 18 Nymphensittiche wiesen charakteristische mononukleäre Infiltrate in zahlreichen Organen auf, makroskopische Veränderungen, wie die Erweiterung des Drüsenmagens, wurden hingegen nur bei sieben Tieren gefunden. Bornavirus-RNA konnte ab 19 Tagen p.i. nachgewiesen werden, wobei dies bei den intracerebral infizierten Vögeln signifikant früher der Fall war. Antikörper wurden das erste Mal sieben Tage p.i. entdeckt und die Titer stiegen während des Untersuchungszeitraumes weiter an, ohne jedoch den Ausbruch der Erkrankung zu beeinflussen. Die Autoren schlossen daraus, dass das Vorhandensein von anti-Bornavirus-Antikörpern keine antivirale Immunität bedeutet, sondern lediglich auf eine Infektion hinweist, mit dem möglichen Risiko, eine PDD zu entwickeln. Unterschiede zwischen den

Vögeln im Infektionsstatus und bei der Entwicklung von Krankheitssymptomen wurden als Folge von Wirtsfaktoren, wie Alter, Immunstatus und die relativ hohe genetische Variabilität der Nymphensittiche interpretiert, gerade im Vergleich zu speziell gezüchteten Labormäusen. In dieser Studie wurden Bornaviren als ursächliche Erreger der neuropathischen Drüsenmagendilatation erstmals sicher bestätigt und klinische Verläufe produziert, die in ihrem Bild und ihrer Variabilität natürlichen Infektionen ähnelten (Piepenbring *et al.*, 2012). Eine Folgestudie, die im Jahr 2016 veröffentlicht wurde, wurde mit einem identischen Versuchsaufbau durchgeführt, nur dass ein PaBV-2-Stamm verwendet wurde anstelle eines PaBV-4-Isolates. Auch hier wurde experimentell eine persistierende Infektion mit einer Serokonversion ab sechs Tage p.i und dem Ausscheiden von Virus-RNA ab 27 Tage p.i. erzeugt. Die Krankheit verlief bei den betroffenen Tieren schwerer und betraf hauptsächlich den Verdauungstrakt (Piepenbring *et al.*, 2016). Ebenfalls mit dem gleichen Versuchsaufbau, aber mit dem Ziel, mögliche natürliche Infektionsrouten zu untersuchen, wurde eine dritte Studie durchgeführt (Heckmann *et al.*, 2017). Hierbei wurden je neun Nymphensittiche oral bzw. nasal mit PaBV-4 infiziert. Während eines Beobachtungszeitraumes von sechs Monaten wurden weder klinische Anzeichen oder typische histopathologische Läsionen noch anti-PaBV-Antikörper und infektiöses Virus bei den Vögeln gefunden. Eine persistierende Infektion, wie im ersten Versuch durch intracerebrale bzw. intravenöse Injektion, kam also nicht zustande. Die Autoren folgern daraus, dass die orale oder nasale Route möglicherweise nicht, wie bisher angenommen, der bevorzugte natürliche Infektionsweg bei immunkompetenten Nymphensittichen ist. Allerdings könnten auch andere Faktoren, wie eine zu geringe Menge Infektionsvirus, die Tatsache, dass das verwendete PaBV-Isolat von einer anderen Spezies gewonnen wurde, eine mögliche Veränderung des Virus in der Zellkultur oder das Alter der Versuchstiere eine erfolgreiche Infektion verhindert haben (Heckmann *et al.*, 2017).

Unterschiede in der Infektiosität und Virulenz zwischen verschiedenen Stämmen unterschiedlicher Bornavirus-Genotypen ergaben sich auch bei einer experimentellen Infektion von Rosenköpfchen (*Agapornis roseicollis*) mit Parrot Bornavirus 2- oder 4-Stämmen, jeweils intranasal und intramuskulär. Eine Ausscheidung von Virus-RNA wurde wöchentlich mittels Kloakentupfer über

einen Zeitraum von 28 Wochen untersucht. Außerdem wurden Blut und Urin serologisch und mittels PCR kontrolliert. Bei Versuchsende wurden die euthanasierten Vögel pathologisch untersucht und Gewebe für Histologie und PCR entnommen. Es konnten über den gesamten Zeitraum weder klinische Krankheitsanzeichen noch persistierende Virusausscheidung beobachtet werden. Auch die makro- und mikroskopischen Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine Infektion mit Bornaviren. In den Gehirnen der mit PaBV-2 infizierten Tiere konnte allerdings PaBV-2 Virus-RNA nachgewiesen werden, dies war bei den mit PaBV-4 infizierten Vögeln nicht der Fall. Aus beiden Gruppen serokonvertierten aber Vögel und zeigten positive PCR-Ergebnissen für Virus-RNA aus dem Urin. Der Versuch bestätigte Unterschiede in der Infektiösität und Virulenz zwischen Bornavirus-Stämmen unterschiedlicher Genotypen bei Papageienvögeln (Gentry *et al.*, 2015).

Zur Untersuchung einer natürlichen Infektionsübertragung zwischen Vögeln, wurden zunächst adulte Kanarienvögel mit *Passeriform 1 Bornavirus* und adulte Nymphensittiche mit PaBV-4 experimentell infiziert, das Virusmaterial wurde intramuskulär und peroral verabreicht (Rubbenstroth *et al.*, 2014a). Dabei kam es bei allen Tieren zu einer persistenten Infektion, ermittelt durch einen positiven Antikörpernachweis. Klinische Symptome traten während eines Beobachtungszeitraums von fünf Monaten allerdings nur bei den Nymphensittichen, nicht bei den Kanarienvögeln auf. In dieser Studie wurden ein Monat p.i. nicht-infizierte Vögel als Sentinelvögel zugesetzt. Bei keinem Kontakttier wurden bis zum Versuchsende Virus-RNA oder spezifische Antikörper nachgewiesen. Die Autoren sahen daher den Weg der horizontalen Übertragung durch direkten Kontakt bei ausgewachsenen, immunkompetenten Kanarienvögeln und Nymphensittichen als ineffizient an (Rubbenstroth *et al.*, 2014a).

Infektionsversuche mit Großpapageien, bei denen klinisch stark ausgeprägte Verläufe nach natürlicher Infektion besonders relevant sind, wurden bislang nur von der Arbeitsgruppe in München durchgeführt. In einer Vorgängerstudie zu der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Untersuchung wurde sechs Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*), die unter standardisierten SPF-Bedingungen gehalten wurden, PaBV-4 Virusmaterial aus Zellkultur oculonasal verabreicht. Im weiteren Versuchsverlauf wurden aber weder Virus-RNA und Bornavirus-

---

Antikörper noch klinische Krankheitssymptome festgestellt. Somit konnte keine erfolgreiche Infektion dokumentiert werden (Korbel *et al.*, 2011; Rinder *et al.*, 2013).

## 2. Proteinelektrophorese

Die Proteinelektrophorese ist eine schon länger bekannte Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen. Im klinischen Bereich wird sie in der Regel für die Untersuchung von Proteinen aus Serum, Plasma oder Urin eingesetzt. Zunächst hauptsächlich in der Humanmedizin angewendet, gewann sie im Laufe der Zeit auch in der Veterinärmedizin an Bedeutung. Seit knapp 30 Jahren wird die Proteinelektrophorese auch in der Vogelmedizin eingesetzt (Lumeij, 1987, 1993; Cray *et al.*, 1995).

### 2.1 Methode

Das Prinzip der Proteinelektrophorese basiert auf dem Auftrennen von Proteinen aus einem Gemisch durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld. Mikroproben werden auf eine dünne Schicht Agarosegel oder einen anderen Träger (früher häufig Celluloseacetat) aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt. Je nach Ladung, Größe und Form wandern die einzelnen Proteinfractionen unterschiedlich schnell und können so nach Fixation des Gels angefärbt und mittels Densitometrie gemessen werden. Quantifiziert werden die einzelnen Fraktionen durch ihren prozentualen und absoluten Anteil am Totalprotein (Cray & Tatum, 1998; Counotte, 2010). Die Messung des Totalproteins erfolgt in der Regel mittels Refraktometrie oder der Biuretmethode (Lumeij, 1993; Cray *et al.*, 2008). Weiterführende Elektrophoresemethoden sind zum einen die hochauflösende Elektrophorese (High Resolution Electrophoresis, HRE), mit der eine bessere Auflösung der Fraktionen und somit eine akkuratere Bestimmung der Proteinveränderungen möglich ist. Außerdem eignet sie sich auch für die Auftrennung der akute-Phase-Proteine und zur Untersuchung monoklonaler Gammopathien (Cray, 1997). Zusätzlich gibt es das Verfahren der Immunelektrophorese (IFE), welches eine Kombination aus Serumelektrophorese und Immundiffusion darstellt und zum qualitativen Nachweis von Immunglobulinen genutzt wird. Hierbei erfolgt zunächst die Auftrennung der Proteine aus dem Patientenserum mittels Elektrophorese. Anschließend wird Antiserum direkt auf die Geloberfläche aufgetragen, welches diffundiert und mit den Antikörpern aus dem Patientenserum reagiert. Die Antigen-Antikörperkomplexe bilden Präzipitationslinien, mit Hilfe derer die einzelnen Immunglobuline dargestellt werden können (Laurell, 1973; Cray, 1997). Eine



neuere, automatisierte Technik ist die Kapillarzonenelktrophorese (CZE), die den Vorteil einer vergleichsweise höheren Auflösung und einer höheren Effizienz bei der Auftrennung der Proteine besitzt, was sich in einer größeren Anzahl engerer Peaks äußert (Crivellente *et al.*, 2008; Counotte, 2010). Darüber hinaus werden heutzutage, auch in der Vogelmedizin, außerdem spezifische Nachweise für akute-Phase-Proteine (APP) verwendet (Delk *et al.*, 2015). Als Interpretationshilfe bei der Auswertung von Proteinelektrophorese-Werten kann das Verhältnis vom Albumin- zum Globulinanteil, also die A/G-Ratio, genutzt werden. Normalerweise ist Albumin die größte Fraktion. Im Falle eines Entzündungsprozesses kommt es beispielsweise nur in manchen Fällen zu einem Anstieg des Totalproteins aufgrund von erhöhten Globulinkonzentrationen, da das Albumin in dieser Situation hingegen oft vermindert ist. Somit verringert sich auch die A/G-Ratio und gibt Aufschluss über ein Krankheitsgeschehen, selbst wenn sich das Totalprotein insgesamt noch im Referenzbereich befindet (Lumeij, 1987, 1993; Cray *et al.*, 1995; Cray & Tatum, 1998).

## 2.2 Aufteilung der Fraktionen

Durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld lassen sich verschiedene Fraktionen unterscheiden. Diese können allerdings zwischen den einzelnen Tierarten bzw. Klassen variieren. Die einzelnen Fraktionen sind (ggf.) Präalbumin, Albumin,  $\alpha$ -Globuline (ggf.  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ),  $\beta$ -Globuline (ggf.  $\beta 1$  und  $\beta 2$ ) und  $\gamma$ -Globuline (ggf.  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$ ). Präalbumin, bzw. Albumin liegt dabei am nächsten an der positiven Elektrode und der  $\gamma$ -Peak am nächsten an der negativen Elektrode (O'Connell *et al.*, 2005). Die wichtigsten Plasmaproteine, ihre Funktionen und die Veränderungen bei Krankheiten sind in **Tabelle 1** aufgelistet.

**Tabelle 1.** Plasmaproteine, ihre Funktionen und pathologischen Veränderungen bei Säugetieren.\*

Protein	Funktion	Veränderung bei Krankheit
Präalbumin	Thyroxintransport	Anstieg: nephrotisches Syndrom Abfall: Lebererkrankung, Proteinmangel
Albumin	Regulation des osmotischen Druckes, Transportprotein	Anstieg: Dehydratation Abfall: Leber-,Nieren- oder Magen-Darm-Erkrankung, Fehlernährung, Blut- und Plasmaverlust

<i>α-Globuline</i> ( <i>α1 und α2</i> )		
α1-Antitrypsin	Trypsininhibitor	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung Abfall: Lebererkrankung, chronische Lungenerkrankung
α2-Lipoprotein	Lipidtransport	Anstieg: nephrotisches Syndrom, Diabetes mellitus, Hypothyreose, Steroidtherapie
α2-Makroglobulin	Binden von Insulin, Trypsininhibitor	Anstieg: nephrotisches Syndrom, chronisch aktive Lebererkrankung, akute entzündliche Erkrankung
Ceruloplasmin	Kupfertransport, Ferrioxidase	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung
Haptoglobin	Binden von Hämoglobin	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung
Protein C	Protease, Antikoagulant	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung
<i>β-Globuline</i> ( <i>β1 und β2</i> )		
β2-Lipoprotein	Lipidtransport	Anstieg: nephrotisches Syndrom, Hypothyreose, Gallengangserkrankung
Transferrin	Eisentransport	Anstieg: Anämie, Eisenmangel, Trächtigkeit, akute Lebererkrankung, nephrotisches Syndrom Abfall: Eisenspeicherkrankheit, akute entzündliche Erkrankung
C3-Complement	Complement C3 Faktor	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung, atopische Dermatitis Abfall: Autoimmunerkrankung
C-reaktives Protein	Complementaktivierung	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung
C4-Complement	Complement C4 Faktor	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung Abfall: Autoimmunerkrankung
Fibrinogen	Fibrinorstufe, Gerinnung	Anstieg: akute entzündliche Erkrankung Abfall: disseminierte intravaskuläre Gerinnung, Afibrinogenämie
<i>γ-Globuline</i> ( <i>γ1 und γ2</i> )		
Immunglobulin G (IgG)	Hauptantikörper, gebildet bei infektiösen Erregern, Toxinen	Anstieg: Infektionskrankheit, Bindegewebserkrankung, Lebererkrankung, Myelome und andere Tumore des retikuloendothelialen Systems Abfall: Fetus, neugeborene Tiere vor Kolostrumaufnahme, Immundefizienzerkrankungen, Agammaglobulinämie
Immunglobulin A (IgA)	sekretorische Antikörper in den Flüssigkeiten des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes	Anstieg: Infektionskrankheit, Bindegewebserkrankung, Lebererkrankung, Myelome und andere Tumore des retikuloendothelialen Systems Abfall: Fetus, neugeborene Tiere vor Kolostrumaufnahme, Immundefizienzerkrankungen, Agammaglobulinämie
Immunglobulin E (IgE)	Antikörper bei Allergien	Anstieg: Allergien, Anaphylaxie Abfall: Aglobulinämie
Immunglobulin M (IgM)	Kälteagglutinin, Initiator	Anstieg: chronische Erkrankung, primäre Zellreaktionen, Makroglobulinämie (Waldenström's)
Immunglobulin D (IgD)	nicht bekannt bei Tieren	

\*(Modifiziert nach Kaneko, Serum proteins and the dysproteinemias, Clinical biochemistry of domestic animals (1997))

### 2.2.1 Präalbumin

Im Serum des Menschen ist das Präalbumin die am schnellsten wandernde Fraktion, kann aber normalerweise nur schwer dargestellt werden (Jeppsson *et al.*, 1979). Präalbumin wurde bisher bei Haussäugetieren nicht nachgewiesen und seine Existenz gilt als unwahrscheinlich (Kaneko, 1997). Auch bei Reptilien wurde diese Fraktion nicht beobachtet (Gimenez *et al.*, 2010; Musilova *et al.*, 2015), bei Vögeln ist das Vorkommen speziesabhängig (s. unten). Proteinelektrophoretische Untersuchungen bei weißgepunkteten Bambushaien (*Chiloscyllium plagiosum*) ergaben eine, wenn auch sehr kleine, Präalbuminfraktion (Krol *et al.*, 2014). Die Funktion des Präalbumins liegt im Binden und im Transport von Thyroxin (Oppenheimer *et al.*, 1965; Kaneko, 1997). Wie das Albumin zählt es zu den negativen akute-Phase-Proteinen, liegt also bei akutem Krankheitsgeschehen in verminderter Plasmakonzentration vor (Jeppsson *et al.*, 1979).

### 2.2.2 Albumin

Albumin stellt mit 60-67% bei Menschen und Primaten und mit 35-50 % bei den restlichen Tieren den größten Anteil am Totalprotein dar. Die Schärfe seines Peaks kann als Index für die Qualität einer proteinelektrophoretischen Messung herangezogen werden. Albumin wird, wie die meisten anderen Plasmaproteine mit Ausnahme der Immunglobuline, in der Leber synthetisiert und von allen metabolisch aktiven Geweben abgebaut. Albumin ist aufgrund seiner Häufigkeit und seiner geringen Größe das Plasmaprotein mit der stärksten osmotischen Wirkung. Seine wichtigste Aufgabe ist das Binden und Transportieren von Proteinen. Durch die Bindung an Albumin können auch andere Substanzen, zum Beispiel Fettsäuren, die aufgrund ihrer Eigenschaften ansonsten nicht in Plasma löslich sind, effektiv transportiert werden. Gleichzeitig wird durch die Bindung eine renale Ausscheidung verhindert (Kaneko, 1997).

### 2.2.3 Globuline

Bei den Globulinen spielen die sogenannten akute-Phase-Proteine, die sowohl in der  $\alpha$ -, als auch in der  $\beta$ -Fraktion vorkommen, eine besondere Rolle. Sie treten in frühen Stadien eines Entzündungsprozesses auf und liefern somit erste wichtige Hinweise auf dessen Vorhandensein (Kaneko, 1997).

### 2.2.3.1 $\alpha$ -Globuline

Die  $\alpha$ -Globuline bilden die am schnellsten wandernde Globulinfraktion. Bei den meisten Säugetieren, aber zum Beispiel nicht bei Wiederkäuern, spalten sie sich in eine schnelle  $\alpha 1$ - und eine langsamere  $\alpha 2$ -Fraktion auf, wobei die  $\alpha 1$ -Globuline generell kleiner sind als die  $\alpha 2$ -Globuline (Kaneko, 1997). Auch bei Vögeln wurden zwei  $\alpha$ -Globulinfraktionen beobachtet. Bei Reptilien scheint es artspezifische Unterschiede zu geben. So können bei grünen Leguanen (*Iguana iguana*) in einigen Fällen zwei Peaks in der  $\alpha$ -Fraktion zu finden sein, bei nordamerikanischen Schmuckschildkröten (*Trachemys scripta*) hingegen nur eine (Gimenez *et al.*, 2010; Musilova *et al.*, 2015). Bei Fischen (Haien) konnten ebenfalls eine kleine  $\alpha 1$ - und eine größere  $\alpha 2$ -Fraktion nachgewiesen werden (Krol *et al.*, 2014). Die meisten  $\alpha$ -Globuline werden in der Leber synthetisiert. Beim Vogel diagnostisch bedeutsame akute-Phase-Proteine der  $\alpha$ -Globulinfraktion sind Haptoglobin, Serum-Amyloid A,  $\alpha$ -Lipoprotein,  $\alpha$ -Antitrypsin und  $\alpha 2$ -Makroglobulin (Cray, 1997; Fischer *et al.*, 2014).

### 2.2.3.2 $\beta$ -Globuline

Auch bei den  $\beta$ -Globulinen kann bei den meisten Haussäugetieren zwischen einer schnellen  $\beta 1$ - und einer langsameren  $\beta 2$ -Fraktion unterschieden werden. Bei Vögeln, Reptilien und Fischen kann normalerweise nur eine  $\beta$ -Fraktion identifiziert werden, auch wenn, zumindest bei einigen Vogelarten, zwei Fraktionen vermutet werden (Cray *et al.*, 2007; Gimenez *et al.*, 2010; Krol *et al.*, 2014; Musilova *et al.*, 2015). In der  $\beta$ -Globulin-Fraktion der Vögel finden sich ebenfalls eine Reihe von akute-Phase-Proteinen, zum Beispiel Fibrinogen, das in die  $\beta 2$ -Fraktion einwandert, Komplement, Komplement-Degradationsprodukte, Fibronektin und  $\beta$ -Lipoprotein (Cray & Harris, 1996). Transferrin, ebenfalls ein  $\beta$ -Globulin, wird bei Säugetieren zu den negativen akute-Phase-Proteinen gerechnet, wohingegen bei Vögeln ein Anstieg als Reaktion auf eine Entzündung oder Infektion beschrieben wurde (Cray, 1997; Xie *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2004). Außerdem wandern, zumindest bei Säugetieren, einige Immunglobuline, nämlich IgA und IgM, in die  $\beta 2$ -Region ein (Kaneko, 1997).

### 2.2.3.3 $\gamma$ -Globuline

Die  $\gamma$ -Globuline setzen sich zum größten Teil aus den Immunglobulinen zusammen. Dabei handelt es sich um Glykoproteine, die jeweils aus zwei

schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten, verbunden durch Disulfidbrücken, bestehen. Anhand der Struktur der H-Kette lassen sich verschiedene Immunglobulinklassen bestimmen. Beim Säugetier nachgewiesen wurden bisher Folgende: IgA, IgM, IgE und IgG. Dabei werden IgA, IgM und IgE vor allem in der schnellen  $\gamma 1$ -Fraktion und IgG in der langsameren  $\gamma 2$ -Fraktion gefunden. Die meisten Antikörper, die gegen Viren, Bakterien oder Toxine gebildet werden, sind dem IgG-Typ zuzuordnen. Bei Vögeln wurden drei verschiedene Antikörperklassen beschrieben: IgA, IgM und IgY, wobei IgY das funktionelle Äquivalent zum IgG der Säugetiere darstellt, diesem allerdings bezüglich Aufbau und Funktionen nicht komplett gleichgestellt ist (Ambrosius & Hadge, 1987; Cray, 1997; Bizelli *et al.*, 2015). IgY ist die am häufigsten im aviären Serum vorkommende Antikörperklasse (Bizelli *et al.*, 2015). Veränderungen in der  $\gamma$ -Globulinfraktion können sich in einer monoklonalen oder polyklonalen Gammopathie äußern. Erstere zeichnet sich aus durch einen homogenen spitzen Peak und steht im Zusammenhang mit einem (potentiell) malignen Prozess (O'Connell *et al.*, 2005). Dazu kommt es, wenn eine Überproduktion einer einzelnen, also monoklonalen, Immunglobulinart (M-Protein) aufgrund der Aktivierung einer bestimmten Plasmazellpopulation mit dem gleichen genetische Ursprung (Klon), stattfindet (Kaneko, 1997; Hess & Heijnen, 2004). Eine Gruppe von Klonen mit unterschiedlichem genetischen Ursprung resultiert in der Überproduktion eines heterogenen Mix von Immunglobulinen, was zu einer diffusen oder breiten hyperglobulinämischen Region, einer „polyklonalen“ Gammopathie, führt (Kaneko, 1997).

### **2.3 Vor- und Nachteile der Methode der Proteinelektrophorese in der Vogelmedizin**

Wie jede diagnostische Methode weist auch die Proteinelektrophorese verschiedene Vor- und Nachteile auf. Ein für die Praxis bedeutsamer Vorteil besteht im vergleichsweise geringen finanziellen Aufwand (ca 9,- € (inkl MwSt) als separate Einzeluntersuchung im externen Labor, Stand 2014), der eine Nutzung in der Klinikroutine zulässt. Außerdem sind aufgrund der weiten Verbreitung der Methode die meisten Labore mit Geräten auf hohem technischen Standard ausgestattet (Cray & Tatum, 1998). Die geringe Menge an benötigtem Probenmaterial, es reichen schon 100  $\mu$ l aus, stellt einen weiteren Vorteil dar (Cray & Tatum, 1998). Besonders in der Vogelmedizin, wo es aufgrund der

geringen Körpergröße vieler Arten nicht möglich ist, große Mengen Blut zu entnehmen, kommt dieser Vorteil zum Tragen.

Die Proteinelektrophorese eignet sich außerdem zum Aufstellen einer Prognose. Veränderungen bei den akute-Phase-Proteinen sind oft schon sichtbar, bevor es zu einer Stimulation des spezifischen Immunsystems, bzw. zu Auffälligkeiten bei serologischen, hämatologischen und blutchemischen Werten oder auch klinischen Symptomen kommt und können so den Gesundheitsstatus des Patienten widerspiegeln (Cray & Tatum, 1998; Cerón *et al.*, 2005). Dies gilt vor allem im Hinblick auf die Funktion von Leber, Niere und Immunsystem (Cray & Tatum, 1998). Auch das Ansprechen des Patienten auf eine Therapie kann mittels Proteinelektrophorese kontrolliert werden. In diesem Fall ist häufig, obwohl der serologische Status oft noch positiv ist, ein Wiederanstieg des Albumins und ein Rückgang bei den Globulinfractionen und somit eine Normalisierung der A/G-Ratio zu verzeichnen (Lumeij, 1987; Cray & Tatum, 1998). Auf der anderen Seite können mittels Elektrophorese aber auch chronische Infektionen nachgewiesen werden, die bei behandelten Tieren ansonsten unbemerkt blieben (Cray & Tatum, 1998).

Ein Nachteil der Methode ist hingegen, dass Veränderungen im Proteinmuster bei der Proteinelektrophorese für sich allein nicht pathognomonisch sind, sondern immer im Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik und anderen diagnostischen Tests gesehen werden müssen (Quesenberry & Moroff, 1991). Außerdem können verschiedene Umstände die Ergebnisse negativ beeinflussen. Zunächst ist immer darauf zu achten, dass die Plasma- oder Serumproben nicht von hämolytischem oder lipämischen Blut stammen. Untersuchungen hämolytischer Proben von Streifengänsen (*Anser indicus*) und Schwarzmilanen (*Milvus migrans*) zeigten fälschlich erhöhte Totalprotein-,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulinkonzentrationen, welche die Situation einer chronischen Entzündung mit Antigenstimulation simulieren und somit eine Misinterpretation hervorrufen können (Roman *et al.*, 2009a). Die Lagerung der Proben spielt ebenfalls eine Rolle. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank (+4°C) können bereits nach zwei Tagen Veränderungen auftreten, ebenso bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen (Cray *et al.*, 2007).

Außerdem haben die in den Laboren verwendeten Geräte und Reagenzien einen großen Einfluss auf das Verteilungsmuster der Proteine in den unterschiedlichen

Fraktionen. Bei einem Vergleich von drei verschiedenen Geräten (Beckman Paragon, Helena SPIFE 3000 und Sebia Hydrasys) zeigten sich zum Teil signifikante Unterschiede. Plasmaproben von Papageien ergaben mit dem Sebia Hydrasys-Gerät einen deutlich geringeren Präalbuminanteil, dafür aber eine stark erhöhte  $\alpha$ 1-Globulinfraktion im Vergleich zu den anderen beiden Systemen. Als mögliche Erklärung hierfür wurden Unterschiede in der Wanderung der einzelnen Fraktionen und der Anfärbungszeit der Proteine angegeben. Verursacht werden kann dies durch Unterschiede in der Agarosegelkonzentration, der angelegten Spannung, der Laufzeit und im pH-Wert des verwendeten Puffers (Cray *et al.*, 2011b). Innerhalb eines Labors können die Maschinenkalibration, die technischen Aspekte und die Reagenzien an sich von Tag zu Tag variieren. Besonders die Messungen der Präalbumin- und Globulinfraktionen erreichen bisweilen keine ausreichende Reliabilität, sowohl zwischen den verschiedenen Laboren als auch innerhalb eines einzelnen Labors. Bedingt wird dies wohl auch durch geringe Mengen dieser Proteine bei Vögeln, die daraus folgende erschwerte Messbarkeit und damit verbunden eine gewisse Variationsbreite beim Ablesen der Elektrophoresekurven durch verschiedene Personen (Rosenthal *et al.*, 2005). Der größte ermittelte Variationskoeffizient beim Plasma von gesunden Papageienvögeln befindet sich in der schwer zu definierenden  $\alpha$ -Globulinfraktion. Dies kann aber auch die Bestimmung der anderen Fraktionen beeinflussen. Der Variationskoeffizient war außerdem höher, wenn mit den absoluten Werten gerechnet wurde anstatt mit den prozentualen Anteilen (Cray *et al.*, 2007).

## 2.4 Physiologische Einflüsse auf die Proteinzusammensetzung

Krankheiten stellen nur eine mögliche Ursache für Veränderungen in den Proteinelektrophoresekurven dar. Daneben gibt es noch eine Reihe von physiologischen Zuständen, die ebenfalls Einfluss nehmen können und die bei der Diagnostik berücksichtigt werden müssen.

### 2.4.1 Besonderheiten bei Säugetieren

Während der pränatalen Entwicklung eines Fötus steigt die Konzentration von Totalprotein und Albumin an, die Globuline ändern sich wenig, eine  $\gamma$ -Globulinfraktion ist nicht existent. Mit der Geburt und der ersten Aufnahme von Nahrung kommt es bei Säugetieren dann zu einem signifikanten Anstieg der  $\gamma$ -Globuline

durch die im Kolostrum enthaltenen Antikörper. Parallel zum Älterwerden vollziehen sich ein Anstieg des Totalproteins, eine Abnahme von Albumin und eine Zunahme der Globuline. Bei sehr alten Tieren nimmt der Gehalt an Totalprotein wieder ab (Kaneko, 1997).

Während Gravidität und Laktation treten ebenfalls Veränderungen in den verschiedenen Proteinfractionen auf. Hormone können entweder einen anabolen Effekt haben (Testosteron, Östrogene, Wachstumshormone), der sich in einem Anstieg des Totalproteins äußert, oder einen katabolen Effekt zeigen (Thyroxin, Kortisol), der das Gegenteil bewirkt (Kaneko, 1997). Die Plasmaproteine reagieren aber auch auf ernährungsbedingte Einflüsse. So entwickelt sich z.B. bei einem zu geringen Proteinanteil im Futter eine Hypoproteinämie und Hypalbuminämie. Neben einer zu geringen Menge an zugeführtem Protein kann auch eine Denaturierung, wie sie bei Fieber oder Hypothermie durch Zerstörung der Proteinstruktur ausgelöst wird, zu einem verringerten Totalprotein und Albumin führen. Eine Dehydratation führt hingegen aufgrund der erhöhten Konzentration des Blutes zu einer Hyperproteinämie (Kaneko, 1997).

#### **2.4.2 Besonderheiten beim Vogel**

Die Anwendung der Proteinelektrophorese in der Vogelmedizin erfordert eine Berücksichtigung der klassen- und speziesspezifischen Unterschiede, auch im Vergleich zu Säugetieren bzw. zum Menschen (Kaneko, 1997). Sogar innerhalb der Familie *Psittacidae* wurden Variationen bei den Fraktions-Migrationskurven festgestellt (Cray *et al.*, 2007). Generell ist die Serum- oder Plasmaproteinkonzentration bei Vögeln deutlich niedriger als bei Säugern (Lumeij, 1987). Ähnlich wie bei anderen Tierklassen gibt es aber auch bei den meisten Vögeln die fünf Hauptfraktionen Albumin, Alpha 1-, Alpha 2-, Beta- und Gammaglobuline (Quesenberry & Moroff, 1991). Einen wichtigen Unterschied stellt die Existenz einer Präalbuminfraktion dar, die bei verschiedenen Vogelarten beschrieben wurde (Quesenberry & Moroff, 1991; Lumeij, 1993), nicht jedoch bei Säugetieren, mit Ausnahme des Menschen, vorzukommen scheint (Cray & Tatum, 1998). Es gibt hier jedoch deutliche artspezifische Unterschiede. So weisen beispielsweise Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) eine sehr große Präalbuminfraktion auf, die bis zu 75% des Gesamtalbumins (Präalbumin + Albumin) ausmacht (Archer & Battison, 1997; Cray & Tatum, 1998; Cray *et al.*, 2007). Ähnliches trifft auch auf Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*) und



Mönchssittiche (*Myiopsitta monachus*) zu (Cray *et al.*, 2007), wohingegen bei andern Psittazidenspezies das Präalbumin nur bis zu 10% des Gesamtalbumins ausmacht (Cray & Tatum, 1998). Bei Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) ist Präalbumin, wenn überhaupt, nur in sehr geringer Menge präsent (Cray *et al.*, 2007). Im Vergleich dazu beträgt die Präalbuminfraktion beim Perlsteiðhuhn (*Eudromia elegans*) 21% des Gesamtalbumins (Black *et al.*, 2013), beim Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) scheint es sie gar nicht zu geben (Archer & Battison, 1997).

Wie bei den meisten Vogelarten sind auch bei den Arten der Psittaziden sowohl die beiden  $\alpha$ -Fraktionen als auch die beiden  $\beta$ -Fraktionen jeweils oft nur schwer voneinander zu unterscheiden, wenn sie im Normalbereich liegen (Cray *et al.*, 1995).

Studien zeigen, dass auch bei Vögeln die Serumproteine nicht nur bei Infektionskrankheiten, sondern auch bei Stress, Fortpflanzung und Mangelernährung verändert sein können (Cray & Tatum, 1998). Kurz vor der Eiablage zeigen weibliche Vögel einen signifikanten Anstieg des Totalproteins, bedingt durch einen östrogeninduzierten monoklonalen Anstieg in der  $\beta$ -Globulinfraktion (Lumeij, 1987; Cray & Tatum, 1998). Eine Malnutrition (Fehlernährung) ist hingegen durch reduzierte Albumin- und  $\gamma$ -Globulinfraktionen gekennzeichnet (Cray & Tatum, 1998).

Auch während der Mauser, einer Zeit mit großen hormonellen und metabolischen Veränderungen, wurden leichte Veränderungen der Plasmaproteine beobachtet, die aber nicht so stark waren, als dass sie zu inkorrekten Interpretationen von Elektrophorese-Ergebnissen führen könnten (Roman *et al.*, 2009b). So wurde einerseits eine Erhöhung der Präalbumin- und der  $\alpha_1$ -Fraktion ermittelt, möglicherweise bedingt durch einen Anstieg der Plasma-Thyroid-Hormone. Gleichzeitig sanken Totalprotein-, Albumin-,  $\alpha_2$ -Globulin-,  $\beta$ -Globulin- und  $\gamma$ -Globulin-Level auf ein Minimum ab. Die Autoren führten als mögliche Ursachen hierfür einerseits die Protein- und Energieverschiebungen zugunsten des Federwachstums und andererseits die Erweiterung des Zirkulationssystems um die Federfollikel herum mit sekundärem Verdünnungseffekt auf die Proteinfractionen an (Roman *et al.*, 2009b). Im Gegensatz zu Säugetieren, bei denen die Jungen über die Plazenta bzw. das Kolostrum mit maternalen Antikörpern versorgt werden, erhalten Vogelküken diese aus dem Eidotter (Rose & Orlans, 1981; Silim

& Venne, 1989; Graczyk & Cranfield, 1995).

Es existieren aber nicht nur speziesspezifische Unterschiede, sondern auch Variationen zwischen in Gefangenschaft gehaltenen und freilebenden Vögeln einer Art, sowie altersabhängige Besonderheiten. So wurden bei wildlebenden Schreikranichen (*Grus americana*) im Vergleich zu gehaltenen Vögeln deutlich höhere  $\gamma$ -Globulinkonzentrationen gemessen, die von den Autoren mit einer vermehrten Antigenexposition und damit stärkeren Immunstimulation begründet wurden (Hausmann *et al.*, 2015).

## **2.5 Anwendungsgebiete in der Diagnostik**

### **2.5.1 Humanmedizin**

In der Humanmedizin spielt die Proteinelektrophorese eine wichtige Rolle in der Diagnostik von multiplen Myelomen (O'Connell *et al.*, 2005). Das Verfahren wird oft für ein erstes Screening beim Auftreten unspezifischer klinischer Veränderungen verwendet, die Ergebnisse sind dadurch allerdings teilweise schwierig zu interpretieren. Veränderungen der Plasma-Protein-Werte treten sowohl bei akuten Entzündungen als auch bei malignen Prozessen, Traumata, Nekrosen, Infarkten, Verbrennungen und chemischen Verletzungen auf (O'Connell *et al.*, 2005). Eine wichtige Rolle für die Diagnostik spielt die  $\gamma$ -Globulinfraktion, da Erhöhungen charakteristisch für einige Erkrankungen sind. Unterschieden wird zwischen monoklonalen und polyklonalen Gammopathien. Die häufigsten Krankheiten, die eine monoklonale Gammopathie auslösen, sind neben dem multiplen Myelom auch das Plasmozytom, das osteosklerotische Myelom bzw. POEMS-Syndrom, lymphoproliferative Erkrankungen wie Makroglobulinämie Waldenström, Schwerkettenkrankheit und chronische lymphatische Leukämie, sowie Amyloidose und chronische oder transiente Prozesse unbestimmter Signifikanz (MGUS) (Alexanian *et al.*, 1999; Hess & Heijnen, 2004). Mögliche Differentialdiagnosen für polyklonale Gammopathien stellen unter anderem virale Infektionen (HIV, Varizellen oder viral bedingte Hepatitis), Tuberkulose und andere fokale oder systemische bakterielle Infektionen einschließlich Endokarditis, Osteomyelitis und Bakteriämie, Bindegewebserkrankungen (systemischer Lupus erythematosus, rheumatoide Arthritis), Lebererkrankungen (Zirrhose, Cholangitis, autoimmune Hepatitis), verschiedene Tumorarten (Nieren-, Eierstocks- oder Magentumoren, Lungen-,

Blut- oder Leberkrebs) und andere entzündliche Erkrankungen ausgehend vom Magendarmtrakt (ulzerative Colitis, Morbus Crohn), der Lunge (Bronchiektasie, zystische Fibrose, chronische Bronchitis) und den endokrinen Systemen (Hashimoto) dar (O'Connell *et al.*, 2005).

### 2.5.2 Veterinärmedizin

Für die Tiermedizin wurden die Einsatzgebiete der Proteinelektrophorese aus der Humanmedizin übernommen (s. 2.5.1). Auch hier eignet sie sich als Hilfsmittel für die Diagnose von verschiedenen Infektionskrankheiten. Für die Kleintiermedizin relevant sind unter anderem die canine Ehrlichiose, canine Parvovirose, Leishmaniose, feline infektiöse Peritonitis (FIP) und die Aleuten-Krankheit bei Frettchen (Breitschwerdt *et al.*, 1987; van den Broek, 1990; Harrus *et al.*, 1996; Kaneko, 1997; Kiral *et al.*, 2004; Miro *et al.*, 2007). Auffällige Veränderungen bei Hunden mit Ehrlichia-canis-Infektion sind auf der einen Seite eine Hypalbuminämie und auf der anderen Seite eine Hypergammaglobulinämie. In unterschiedlichen Untersuchungen wurde allerdings entweder eine monoklonale oder eine polyklonale Gammopathie beschrieben (Breitschwerdt *et al.*, 1987; Harrus *et al.*, 1996). Bei retroviralen Erkrankungen der Katze wurde bei einer Infektion mit dem feline Leukämie Virus (FeLV) ein starker Anstieg der  $\alpha$ 2-Fraktion- und eine geringfügige Verringerung der A/G-Ratio verzeichnet. Im Gegensatz dazu ergab sich beim feline Immundefizienzvirus (FIV) eine Erhöhung von Totalprotein und  $\alpha$ 2-Fraktion und zudem ein sehr starker Anstieg der  $\gamma$ -Globuline, wodurch es zu einer hochgradigen Reduktion des Albumin/Globulin-Quotienten kam. Dadurch konnten sich die beiden Krankheiten, bei ähnlicher klinischer Symptomatik, voneinander unterscheiden lassen (Miro *et al.*, 2007). Bei Hunden mit endokrinen Erkrankungen wurden Abweichungen bei den Serumproteinen mittels Elektrophorese festgestellt. Ein Diabetes mellitus zeichnete sich zum Beispiel durch die signifikante Erhöhung von Albumin und  $\alpha$ 2-Globulinen aus, während die  $\gamma$ -Globulinfraction deutlich verkleinert war. Das Gleiche galt für die Hypothyreose, bei der ebenfalls die  $\gamma$ -Globuline in verminderter Konzentration vorlagen. Bei Hypoadrenokortizismus war hingegen die  $\beta$ 2-Globulinfraction erniedrigt (van den Broek, 1992). **Tabelle 2** gibt einen Überblick über verschiedene Dysproteinämien und ihre möglichen Ursachen.

**Tabelle 2.** *Dysproteinämien bei Säugetieren, ihre Auswirkungen auf das Proteinelektrophorese-Profil und mögliche Ursachen (Albumin/Globulin – Verhältnis (A:G) und Proteinelektrophorese-Profil (SPE)).\**

Dysproteinämien	mögliche Ursachen
<i>A:G normal – SPE normal</i>	
Hyperproteinämie	Dehydratation
Hypoproteinämie	Hyperhydratation akuter Blutverlust externer Plasmaverlust: Extravasation durch Verbrennungen, Abschürfungen, exsudative Läsionen und Dermatopathien, Ektoparasiten, gastrointestinale Erkrankungen, Durchfall interner Plasmaverlust: gastrointestinale Erkrankungen, Endoparasiten
<i>A:G verringert – SPE verändert</i>	
Albumin ↓	selektiver Albuminverlust: Glomerulonephritis, Nephrose, nephrotisches Syndrom, gastrointestinale Erkrankungen, Endoparasiten verringerte Albuminsynthese: chronische Lebererkrankung, Fehlernährung, chronische entzündliche Erkrankung
α1-Globuline↑	akute entzündliche Erkrankung (α1-Antitrypsin, saures α1-Glykoprotein)
α2-Globuline↑	akute entzündliche Erkrankung (α2-Makroglobulin, Ceruloplasmin, Haptoglobin) schwere aktive Hepatitis (α2-Makroglobulin) akute Nephritis (α2-Makroglobulin) nephrotisches Syndrom (α2-Makroglobulin, α2-Lipoprotein)
β-Globuline↑	akute Hepatitis (Transferrin, Hämoexin) nephrotisches Syndrom (β2-Lipoprotein, Transferrin) eitrige Dermatopathien (IgM, C3)
β-γ Brückenbildung	chronische aktive Hepatitis (IgA, IgM)
γ-Globuline↑ (polyklonal, IgG, IgM, IgA)	chronische entzündliche Erkrankung, Infektionskrankheit, Kollagenose chronische Hepatitis Leberabszess eitrige Erkrankungen: feline infektiöse Dermatitis, eitriges Dermatitis, Tuberkulose immunmedierte Erkrankungen: autoimmune hämolytische Anämie, autoimmune Thrombozytopenie, Aleuten Krankheit der Frettchen, equine infektiöse Anämie, systemischer Lupus erythematosus, autoimmune Polyarthrit, autoimmune Glomerulonephritis, autoimmune Dermatitis, Allergien Tumoren des Retikuloendothelialen Systems: Lymphosarkom
γ-Globuline↑ (monoklonal, IgG, IgM, IgA)	Tumoren des Retikuloendothelialen Systems: Lymphosarkom Plasmazelldyskrasie: multiples Myelom, Aleuten-Krankheit der Frettchen Makroglobulinämie canine Ehrlichiose gutartige Erkrankungen
<i>A:G erhöht – SPE verändert</i>	
Albumin↑	nur bei Dehydratation
Globuline↓	fetales Serum Neugeborenes vor Kolostrumaufnahme schwere kombinierte Immundefizienz der Araberfohlen Aglobulinämie

\*(Modifiziert nach Kaneko, Serum proteins and the dysproteinemias, Clinical biochemistry of domestic animals (1997))

### 2.5.3 Vogelmedizin

In den USA wird die Proteinelektrophorese schon seit längerem bei Vogelpatienten in der Routinediagnostik eingesetzt (Lumeij, 1993). Wie oben bereits beschrieben, reicht eine Elektrophorese allein allerdings nicht aus, um den Gesundheitsstatus eines Patienten genau zu evaluieren. Sie sollte immer in Kombination mit einem Blutbild und einer klinisch-chemischen Untersuchung durchgeführt werden, da so unterschiedliche Aspekte einer Immunantwort dargestellt werden (Briscoe *et al.*, 2010). Mit der richtigen Interpretation ist die Proteinelektrophorese auf diese Weise ein sehr geeigneter prognostischer Indikator (Cray & Tatum, 1998).

Eine wichtige Rolle gewann die Proteinelektrophorese als zusätzliches Hilfsmittel in der Aspergillose diagnostik (Lumeij, 1987; Reidarson & McBain, 1995; Ivey, 2000; Cray *et al.*, 2009a; Kummrow *et al.*, 2012; Black *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2014). Auch wenn einige Vögel mit Aspergillose anergisch oder immunsupprimiert sind und somit keine ausreichenden Antikörperlevel bilden, so sind doch in vielen Fällen elektrophoretische Auffälligkeiten feststellbar (Cray & Tatum, 1998). Die häufigste Veränderung stellt der mäßige bis starke Anstieg der  $\beta$ -Globuline (Transferrin,  $\beta$ -Lipoprotein und Complement) dar, außerdem kann es in einigen Fällen zu einer vermehrten Produktion von  $\alpha$ 2-Makroglobulinen kommen (Cray, 1997; Cray & Tatum, 1998; Ivey, 2000). Dies trifft besonders auf Vögel im akuten Stadium der Erkrankung zu, bei einem chronischen Verlauf wurde hingegen ein Anstieg der  $\alpha$ 1-Globuline beobachtet (Cray, 1997). Eine weitere mögliche Veränderung im Zusammenhang mit einer Aspergillose ist die Erniedrigung des Albumin/Globulin-Quotienten (Lumeij, 1993; Ivey, 2000). Bei Falken mit bestätigter Aspergillose wurden außerdem niedrigere Präalbuminwerte gemessen als bei gesunden Kontrolltieren (Kummrow *et al.*, 2012). Im Vergleich zu Antikörper- und Antigen-ELISA-Screeningtests bei Papageien mit Aspergillose zeigte sich die Proteinelektrophorese als die sensitivere Diagnostikmethode (Ivey, 2000).

Ein besonders auffälliges Elektrophoretogramm weisen Tiere mit akuter Chlamydiose auf. Die Veränderungen beinhalten eine deutliche Reduktion von Albuminfraktion und  $\alpha$ 2-Makroglobulinen, einen leichten bis mäßigen Anstieg der  $\beta$ -Globuline, bedingt durch vermehrtes Transferrin und einen mäßigen bis starken Anstieg der  $\gamma$ -Globuline. Die A/G-ratio ist in diesen Fällen stark

vermindert (Lumeij, 1993; Cray & Tatum, 1998). Bei Vögeln mit chronischer Krankheit sind auch hier, wie bei der Aspergillose, keine (oder nur sehr leichte) Abweichungen messbar (Cray & Tatum, 1998). Eventuell kann ein Anstieg beim Transferrin beobachtet werden, Veränderungen bei den Immunglobulinen müssen nicht vorkommen (Cray, 1997).

Während Vögel mit Mykobakteriose Anstiege entweder in der  $\beta$ - oder in der  $\gamma$ -Globulinfraktion aufweisen, ist eine Sarkozystose oft verbunden mit einer mäßigen Erhöhung beider Fraktionen (Cray *et al.*, 1996; Zielezienski-Roberts & Cray, 1997; Cray & Tatum, 1998).

Als auffälligste Anzeichen einer Eidotter-Peritonitis wurden ein leichter bis mäßiger Anstieg der  $\gamma$ -Globuline und daraus folgend eine leicht reduzierte A/G-Ratio ermittelt (Cray *et al.*, 1995).

Lebererkrankungen gehen mit sehr niedrigen Plasmaproteinkonzentrationen in Kombination mit einer erniedrigten A/G-Ratio einher (Lumeij, 1993). Bedingt ist dies bei einer Hepatitis, wie auch bei einer Nephritis, hauptsächlich durch eine verminderte Albumin-Fraktion, zusätzlich kann aber in beiden Fällen auch eine Hyperbetaglobulinämie beobachtet werden. Die Ursache hierfür liegt in einer erhöhten Transferrinkonzentration, welche in der  $\beta$ -Fraktion messbar ist. Chronische Hepatitis zeichnet sich oft durch einen leichten bis mäßigen Anstieg der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline aus. Eine schwere Schädigung der Nieren führt hingegen zu einem deutlichen Anstieg der  $\alpha_2$ -Globuline, da die Konzentration von  $\alpha_2$ -Makroglobulin, einem Protein mit hohem molekularem Gewicht, im Plasma ansteigt, während andere Proteine krankheitsbedingt verloren gehen (Cray & Tatum, 1998).

Eine schwere Hypoproteinämie kann auch als Folge von Proteinverlust bei gastrointestinalen Erkrankungen zustande kommen (Lumeij, 1993). Ein erhöhtes Totalprotein tritt hingegen bei dehydrierten Tieren auf, die A/G-Ratio ist in diesen Fällen aber unverändert (Lumeij, 1993).

Bei Papageien mit parasitären Infektionen wurden Anstiege in der  $\alpha_1$ -Fraktion nachgewiesen, zum Teil auch in Kombination mit einer reduzierten Albuminkonzentration. Auslöser ist hierbei eine erhöhte Konzentration des Proteins  $\alpha_1$ -Antitrypsin (Cray & Tatum, 1998).

Eine Schwermetallvergiftung zeichnet sich aus durch eine leichte Hyperglobulinämie in der  $\beta$ -Fraktion, bedingt durch eine vermehrte Produktion von Transferrin,  $\beta$ -Lipoprotein und Komplement (Cray, 1997).

Im Zusammenhang mit Pododermatitiden bei Flamingos (*Phoenicopterus ruber*) wurden signifikante Erniedrigungen in der Fraktion des Albumins festgestellt, das als negatives akute-Phase-Protein somit ein Marker für diesen Krankheitsprozess darstellen könnte (Delk *et al.*, 2015).

Bei Papageienvögeln existieren einzelne Fallberichte, bei denen Lymphosarkome und gleichzeitig monoklonale Hyperglobulinämien, entweder in der  $\beta$ - oder in der  $\gamma$ -Fraktion, diagnostiziert wurden (Souza *et al.*, 2008; Lennox *et al.*, 2014).

Im Zusammenhang mit einer Bornavirusinfektion bei Papageien existieren bisher keine Beschreibungen über mögliche Veränderungen der Plasmaproteine. Es wurde bislang lediglich ein Fallbericht über einen männlichen Edelpapagei (*Electus roratus polychloros*) publiziert, dessen Partnertier aufgrund einer PDD euthanasiert wurde und typische pathologische Veränderungen aufwies. Bei diesem Papagei, der wie sein verstorbener Partnervogel, klinische Symptome einer neuropathischen Drüsenmagendilatation zeigte, wurde einmalig eine Proteinelektrophorese angefertigt und dabei erhöhte  $\gamma$ -Globulinwerte festgestellt. Die Diagnose PDD konnte allerdings nicht bewiesen werden (Doneley *et al.*, 2007).





### **III. PUBLIKATION**

Die Angaben zu Material und Methoden und die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen sind im nachfolgenden Manuskript zusammengefasst, das zur Publikation akzeptiert wurde. Die Veröffentlichung erfolgte durch *Taylor & Francis* in *Avian Pathology* am 13. Juli 2017, online verfügbar unter:

<http://www.tandfonline.com/10.1080/03079457.2017.1325442>

Die in der Publikation als „supplemental data“ erwähnten Supplementary Tables S1-S28 befinden sich im Anhang der Dissertationsschrift.

**Plasma protein, haematologic and blood chemistry changes in African grey parrots (*Psittacus erithacus*) experimentally infected with bornavirus**

Charlotte Högemann<sup>1</sup>, Rüdiger Richter<sup>2</sup>, Rüdiger Korbel<sup>1</sup>, Monika Rinder<sup>1</sup>

**Avain Pathology 2017 46(5), 556-570**

Received: 31<sup>st</sup> January 2017

Accepted: 16<sup>th</sup> April 2017

Published: 13<sup>th</sup> July 2017

<sup>1</sup>Clinic for Birds, Small Mammals, Reptiles and Ornamental Fish, Center for Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich, Oberschleißheim, Germany

<sup>2</sup>Tierarztpraxis Cappel, Öhringen, Germany

## Abstract

Bornaviruses are considered to be the causative agent of proventricular dilatation disease (PDD) in psittacine birds. In order to detect haematological and blood chemistry changes during the development of PDD and a possible correlation with clinical signs and the virological status, six African grey parrots (*Psittacus erithacus*) were experimentally infected with parrot bornavirus 4 (PaBV-4) by subcutaneous route. All six parrots developed clinical signs of varying extent and successful infection was confirmed in all the birds by seroconversion or detection of RNA of the PaBV-4 infection strain. Based on population-based and intra-individual reference ranges established during 12 months prior to experimental infection, only minor haematological changes were detected in individual birds after infection. Changes in blood chemistry were restricted to aspartate aminotransferase, creatine kinase, total protein, glucose and uric acid. Plasma protein electrophoresis revealed marked changes starting 10 weeks post infection characterized by an increase in the  $\gamma$ -globulin fraction and a gradual decrease to normal values during weeks 22-34. Indications of an acute-phase reaction at the initial stages of infection were not detected. While three birds suffered from clinical signs of PDD, which included weight loss and neurological disorders and died before development of haematological and plasma protein changes, recovery of clinical disease was paralleled in the remaining birds by an increase in  $\gamma$ -globulins and bornavirus-specific antibody titres.

**Keywords:** Parrot bornavirus, African grey parrot, *Psittacus erithacus*, protein electrophoresis, haematology, proventricular dilatation disease, PDD, experimental infection

## Introduction

In 2008 two independent research groups identified a new bornavirus (genus *Bornavirus*, family *Bornaviridae*, order Mononegavirales), in psittacine birds affected with proventricular dilatation disease (PDD) (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008), a disease which is also known as avian ganglioneuritis (Korbel & Rinder, 2012), macaw wasting disease, neuropathic gastric dilatation disease or splanchnic neuropathy. Association of this so-called avian bornavirus with PDD was later confirmed in naturally infected psittacines (Lierz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2009a; Weissenböck *et al.*, 2009a) and the signs of PDD had been induced by experimental infection of cockatiels, Patagonian conures and lovebirds, using tissue homogenates from diseased birds or using purified virus (Gancz *et al.*, 2009; Gray *et al.*, 2010; Mirhosseini *et al.*, 2011; Piepenbring *et al.*, 2012; Gentry *et al.*, 2015; Piepenbring *et al.*, 2016) fulfilling the Koch's postulates. Bornaviruses are now generally accepted as the causal pathogens of PDD.

Based on investigations on the phylogeny and biology of the viruses, the taxonomy of the family *Bornaviridae* and the genus *Bornavirus* was recently revised. Two species occurring in Psittaciform birds were designated, *Psittaciform 1 bornavirus* including parrot bornavirus (PaBV-) 1, 2, 3, 4 and 7 and *Psittaciform 2 bornavirus* including PaBV-5 (Kuhn *et al.*, 2015; Afonso *et al.*, 2016).

PDD was first described in the 1970s and affects primarily psittacine birds (Clark, 1984). The disease was named after the enlargement of the proventriculus associated with infiltration of lymphocytes and plasma cells in ganglia of the gastrointestinal walls. The pathologically affected innervation and thus impaired peristalsis of the gastrointestinal tract are the cause of maldigestion and malabsorption leading to clinical signs of crop stasis, regurgitation, diarrhoea, shedding of undigested seeds in the faeces and finally death because of starvation. Central nervous system (CNS) signs such as tremor, ataxia, opisthotonus or seizure may occur as the only signs or in combination with gastrointestinal signs (Mannl *et al.*, 1987; Bond *et al.*, 1993; Berhane *et al.*, 2001). Ophthalmological lesions have also been detected in affected birds (Korbel & Rinder, 2011).

Subclinical forms have been observed, in which birds infected with bornavirus showed none or only slight signs of disease (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2009; Herzog *et al.*, 2010; Hoppes *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010).

Diagnosis of bornavirus infection in the living bird is mainly based on detection of anti-bornavirus antibodies using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (De Kloet & Dorrestein, 2009; Rinder *et al.*, 2010a), indirect immunofluorescent tests (Herzog *et al.*, 2010) or Western blot (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009), as well as on detection of viral RNA by reverse transcription (RT-) PCR or realtime reverse transcription (rRT-) PCR (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008). Diagnosis of the clinical disease, PDD, still depends on the detection of characteristic lymphoplasmacytic infiltrations in affected organs by histopathology (Lierz, 2016).

Blood tests including blood cell counts and blood chemistry serve the purpose to analyse the patient's physical condition and may provide important information on various diseases (Polo *et al.*, 1998). Protein electrophoresis has been successfully used to gain first insights into relative or absolute changes of blood protein fractions during diverse physiological or pathological conditions. In the past, this method has already been used for the diagnosis of infectious diseases in small mammals (Kaneko, 1997) and was also applied in avian medicine (Quesenberry & Moroff, 1991; Cray *et al.*, 1995; Cray & Tatum, 1998). In birds, protein electrophoresis was shown to be capable not only of disease detection and assessment of courses of illness, but also of improvements of the health status during therapy. Characteristic protein concentration curves have already been established for aspergillosis, acute chlamydiosis and sarcocystosis (Cray & Tatum, 1998).

The pathogenesis of PDD remains unclear, and so far, changes in blood biochemistry or blood cells specific for bornavirus infection or elucidating development of disease have not yet been found (Gancz *et al.*, 2010). However, conclusions were generally based on results obtained from naturally infected birds in various phases of disease. Additionally, in most cases, further infectious or non-infectious diseases were present or could not be excluded.

---

Investigations on bornavirus-induced changes in blood values under standardized conditions, with specified pathogen free birds over a long period and during defined stages of infection are completely lacking so far.

In order to gain first information on the occurrence of possible blood protein changes in psittacine birds during development of disease, plasma protein electrophoresis was performed in addition to blood cell counts and blood chemistry in regular intervals in African grey parrots during the course of an experimental bornavirus infection. Changes were then analysed with regard to a temporal context or coincidence with clinical signs, formation of bornavirus-specific antibodies and shedding of viral RNA. Since it is known that reference values in birds of the same species can vary individually and between different population depending on the living conditions (Scope *et al.*, 2002), intraindividual and population-based reference ranges were established for all the laboratory parameters. They were based on investigations of the parrots during a period of one year before the experimental infection was performed and were used in order to detect minor effects of bornavirus infection.

## Materials and Methods

The experiments were conducted in accordance with the German animal welfare regulations and under permission by the German authorities (reference number 55.2-1-54-2531.3-60-10).

**Experimental birds.** Six Congo African grey parrots (*Psittacus erithacus*), two years old (at the beginning of the investigation period) and numbered P7-P12, were used. They originated from bornavirus-free parents and were hand-raised for the study purpose as a group, separated from other psittaciform birds. In order to avoid natural infection with bornavirus they were housed in an isolated indoor aviary with high biosecurity standards. All birds were free of any clinical signs. Infections with primary pathogenic bacteria or fungi were excluded using standard culturing tests. Viral infections with avian bornavirus, psittacine beak and feather disease virus, avian polyomavirus and psittacine herpesvirus were excluded using PCR assays and serological tests as described before (VanDevanter *et al.*, 1996; Tomaszewski *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2005; Halami *et al.*, 2008; Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008; Rinder *et al.*, 2010a). The parrots were maintained on a pellet-based diet (Harrison's High Potency Coarse; Avifood, Gräfelfing, Germany) enriched with fresh fruits and vegetables, fresh drinking water was provided ad libitum. During the whole experiment the parrots were kept together in their group and all housing conditions, like food or light, remained unchanged.

**Experimental infection.** The infection was performed by subcutaneous inoculation of PaBV-4 (isolate #6758) using an infection dose of  $10^5$  fluorescence forming units per bird. Virus stocks have been produced in CEC-32 quail fibroblast cells and were purified as described before (Rinder *et al.*, 2009a; Rubbenstroth *et al.*, 2012; 2014b).

**Clinical investigation.** The birds underwent surveillance over a period of one year before and one year after infection. Data obtained in the first year were used to determine intra-individual reference ranges and served as controls for each individual bird. General clinical conditions of each individual were controlled daily by inspection and clinical scores ranging from 5 to 0 were determined for each bird by the week. An unaffected general condition without any signs of disease was scored as 5. Unspecific signs such as slight trembling and a fluffed up plumage were scored as 4, more severe trembling, closed eyes and

mild ataxia as 3. When a bird showed moderate ataxia and other signs indicating distinct CNS disorders as well as a severely reduced general condition, it was categorized at a score of 2. A score of 1 was given to birds with high-grade apathy and ataxia. The score of 0 was defined as the humane endpoint of the experiment and was given when massive neurological deficits occurred like failure of the positional reflexes or incapability of sitting on a perch, or when a loss of 30 % of the original body mass was detected. Body weights were recorded once a week.

**Haematology.** Every four weeks, blood samples were obtained from the birds before feeding. They were taken from the jugular vein with heparinized 22-gauge needles using standard techniques (König & Korbel, 2016) and were collected in lithium-heparin tubes. All haematological examinations were conducted directly after collection. For the determination of the packed cell volume (PCV) the blood was centrifuged in a microhematocrit centrifuge using standard capillary tubes. Thin blood smears dyed with Haema Quick-Stain (Diff-Quick, LT-SYS<sup>®</sup>, Eberhard Lehmann, Berlin, Germany) were used for analysing the morphology and number of red blood cells and thrombocytes, the white blood cell count (WBC) and the differentiation between granulocytes and mononuclear cells. The WBC was determined by evaluating 20 fields of vision in a 1000-fold magnification. The leukocytes were counted and the cell counts were deduced from the mean values per one field of vision. Corrections were made for very low or very high PCVs. In case of a PCV lower than 30 % or higher than 55 %, the number of leukocytes was multiplied by this percentage and divided by 45 to obtain a corrected value. Based on the mean leukocyte counts per field of vision, the WBC was estimated as follows: a mean leukocyte number lower than 0.3 corresponded to a WBC of  $0-5 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{l}$ , a mean value of  $0.3- < 1.0$  to a WBC of  $5-15 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{l}$ , and a mean value of  $1.0- < 2.5$  to a WBC of  $15-35 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{l}$ , while a mean value of  $2.5- < 4.0$  corresponded to a WBC of  $35-50 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{l}$  and, finally, a mean value of 4.0 or higher corresponded to a WBC of  $> 50 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{l}$ .



**Blood Chemistry.** Blood chemistry was investigated in parallel to the haematological tests and accomplished with a VetScan VS 2 (ABAXIS, Scil, Griesheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. The following parameters were measured: aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), glucose, uric acid (UA), bile acid (BA), sodium, potassium, calcium, phosphorus and total proteins (TPs).

**Calculation of reference ranges.** Intra-individual and population-based reference ranges were calculated for each parrot and for the group based on measurements of blood samples taken at intervals of four weeks during the year before infection. The 0.025 and the 0.975 fractiles and thus the ranges containing 95 % of the reference distribution were defined (Solberg, 1987). Additionally, mean, median and standard deviation (SD) were determined. For each parrot and parameter the index of individuality ( $IoI = CV(\text{individual})/CV(\text{population})$ ) was calculated using the coefficient of variation ( $CV = SD \times 100/\text{mean}$ ) of all individuals and the group (population). If the  $IoI < 0.6$ , which indicates marked individuality, the intra-individual reference ranges were used for evaluating the measured values, otherwise those of the population (Harris, 1974; Fraser & Harris, 1989; Scope *et al.*, 2006). Eventually, the critical difference ( $CD = 1.96 \times 2SD$ ) was calculated to analyse a post infection (p.i.) change in values with regard to biological significance (Harris, 1974; Scope *et al.*, 2006). Thus, a value deviation larger than the CD was assessed as significant. If a value lay outside the intra-individual or population-based references ranges, but within the CD, this change was regarded as non-significant.

**ELISA.** ELISA for the detection of P40 (N protein)-specific antibodies was carried out in intervals of four weeks, except during the first 46 weeks after infection when it was done at intervals of two weeks. The ELISA was performed with plasma obtained from lithium-heparin blood after centrifugation for 5 min at  $3500 \times g$  as described before using a recombinant N protein as antigen, in addition to anti-grey parrot-immunoglobulin G (IgG) and peroxidase-linked goat anti-rabbit-IgG (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) (Reuter *et al.*, 2010; Rinder *et al.*, 2010a). Absorption higher than the mean value of three negative controls plus threefold SD was considered positive.

For semi-quantification of the ELISA results the absorption values were scaled so that an absorption at the cut-off corresponded to a relative value of 0 and the value obtained from a standardized positive control sample corresponded to a relative value of 1.

**rRT-PCR.** Swab samples from choana and cloaca as well as blood samples with enriched contents of white blood cells were tested for the presence of PaBV-4 RNA. The swabs were obtained from every bird monthly for one year before infection and biweekly over one year p.i. Buffy coat material (blood cells with enriched content of white blood cells) originated from the blood samples used for ELISA and was harvested from heparinized blood samples as the upper cell layers after centrifugation as described above. In three birds that died during the investigation period, brain samples taken during necropsy were also included.

Total RNA purification from choanal and cloacal swabs was performed using QIAamp Viral RNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Germany) and from buffy coat material as well as from brain samples using the RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen). Extraction was carried out according to the manufacturer's protocol. RNA samples were stored at -80°C until further investigation. Random hexamer primers were used to reverse transcribe total RNA into first strand complementary DNA. For the real-time PCR, a primer set (forward 5'-CAGACAGCACGTCGAGTGAGA -3' and reverse 5'-AGTTAGGGCCTCCCTGGGTAT-3') and a probe (6FAM-AGGTCCCCGCGAAGGAAGCGA-TMR) according to Honkavuori *et al.* (2008) were used targeting the amino-terminal region of phosphoprotein (P) gene of PaBV-4. Cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 50 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 30 s, then annealing at 60°C for 30 s and finally extension at 72°C for 30 s. Positive and negative controls were included in each run. Threshold cycle (Ct) values smaller than 32.0 and from 32.0 to 35.9 were considered strongly positive (++) and positive (+), respectively, while Ct values from 36.0 to 39.9 and greater 40.0 were assessed as borderline (o) and negative (-), respectively.

Using RNA obtained from brain samples of parrots P7, P8 and P9, a conventional PCR protocol targeting a fragment of the N gene (Kistler *et al.*, 2008) was applied followed by agarose gel electrophoresis according to standard procedures. Amplified DNA was extracted using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

Direct sequencing was performed by GATC Biotech (Cologne, Germany) and using the PCR primers. Sequence identity was determined by BLAST analyses (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Plasma protein electrophoresis.** Plasma samples of all six parrots (P7-P12) were taken 18, 10 and 2 weeks before infection and 2, 4 and 6 weeks after infection. In week 8 p.i. additional protein electrophoresis of plasma from P7 and P9 was performed. In week 10, 14, 18, 22, 26, 34 and 42 p.i. plasma of parrots P7, P8 and P9 was not available anymore because of death of these birds, and thus only plasma of P10, P11 and P12 was included.

Care was taken that the plasma samples were of high quality and did not show signs of lipemia or haemolysis. Protein electrophoresis was undertaken at IDEXX laboratories (Ludwigsburg, Germany), and for transportation the frozen samples were packed on dry ice. The analyses were conducted in two sample batches using the same technology and consistent fraction delimits. TP was measured by the Biuret method (Beckman Coulter AU 5800). Then, plasma samples were analysed with the Sebia Hydrasys 2, an automatic, multiparametric agarose gel electrophoresis system and according to the instructions provided by the manufacturer. Gels were run for 20 min at 240/270V. The relative concentrations for each protein fraction (prealbumin, albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -globulins) were acquired from densitometric scans. Absolute values (g/dl) for each fraction were then calculated by multiplying the percentages by the TP concentration. The albumin to globulin (A/G)-ratio was calculated by dividing the sum of prealbumin and albumin by the sum of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -globulins.

## Results

**Clinical observations.** Experimental infection resulted in clinical signs in all six birds. The clinical course of the disease varied among the birds. The general condition before and shortly after infection was very good and was scored as 5 in all birds. Parrots P7 and P8 were taken ill as early as 3 weeks p.i. and showed constantly aggravating signs like fluffing, trembling, closed eyes, incoordination, orientation problems and finally emaciation despite good appetite. According to animal welfare regulations, parrot P8 was euthanized 6 weeks p.i. and parrot P7 was euthanized 9 weeks p.i. because of severely reduced general condition, which was scored as 1 during the week before euthanasia in both birds. Parrot P9 developed similar signs, but not until 5 weeks p.i., descended to a lowest score of 2 and died 9 weeks p.i. In the postmortem examination a dilated proventriculus with a thin wall was found in all three birds.

In parrot P10 severe disease signs were detected from week 4 until week 14 p.i. and the general condition worsened constantly and reached a minimum score of 1 in week 9 p.i. During this period, automutilation on both wings also occurred. Afterwards the bird recovered and its health score varied between 3 and 5 until the end of the investigation period. Parrot P11 showed only few and short periods of slight and unspecific signs including reduced activity and fluffing during the whole investigation period. Its clinical score never decreased below a value of 4. In parrot P12, clinical signs were observed from 10 weeks p.i. onwards and its general condition worsened to a score of 2. Signs of disease were detected until week 18 p.i., including depression and ataxia. In addition, feather plucking of the thoracic and abdominal region occurred in this bird. During the further course of the experiment the clinical score of parrot P12 was assessed as a 4, interrupted of a short phase of a clinical score of 3 between 32 and 33 weeks p.i. After 48 weeks p.i. the bird showed a completely undisturbed appearance rated with a clinical score of 5 until the end of the examination period.

**Blood cell and blood chemistry analysis.** The population-based reference ranges for the African grey parrots which were calculated based on measurements during a 12 months period before infection are listed in **Table 1**. The individual values and reference ranges of all parrots before infection are listed in supplementary Tables S1-S11 and the individual values after infection can be found in

supplementary Tables S12-S22.

After experimental infection with PaBV-4, PCV stayed within the intra-individual ranges except for parrots P10 and P11 where mild anaemia was detected between weeks 2 and 14 p.i. indicated by a reduction of PCV to 31% in P10 and to 34% (not significantly reduced) in P11.

**Table 1.** Population-based reference ranges for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD) and coefficient of variation (CV) (PCV, packed cell volume, TP, total protein, AST, aspartate aminotransferase, BA, bile acid, CK, creatine kinase, UA, uric acid, Glu, glucose, Ca, calcium, Phos, phosphorus, Pot, potassium, Sod, sodium).

	mean	median	SD	2.50%	97.50%	CD	CV
PCV (%)	43.2	43.0	3.6	37.0	54.0	14.0	8.3
TP (g/dl)	3.4	3.4	0.3	2.5	4.0	1.3	9.9
AST (U/l)	152.6	145.0	41.2	113.0	272.0	161.4	27.0
BA ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>a</sup>	<35	-	-	-	-	-	-
CK (U/l)	1134.8	988.0	596.2	418.0	2791.0	2337.0	52.5
UA (mg/dl)	2.8	2.7	1.2	0.8	6.0	4.7	43.4
Glu (mg/dl)	220.4	222.0	21.6	186.0	267.0	84.7	9.8
Ca (mg/dl)	7.7	7.8	0.6	6.3	8.8	2.5	8.2
Phos (mg/dl)	3.5	3.6	0.9	1.6	5.6	3.5	25.1
Pot (mmol/l)	3.6	3.4	0.7	2.7	6.1	2.7	19.5
Sod (mmol/l)	151.2	151.0	5.2	143.0	164.0	20.2	3.4

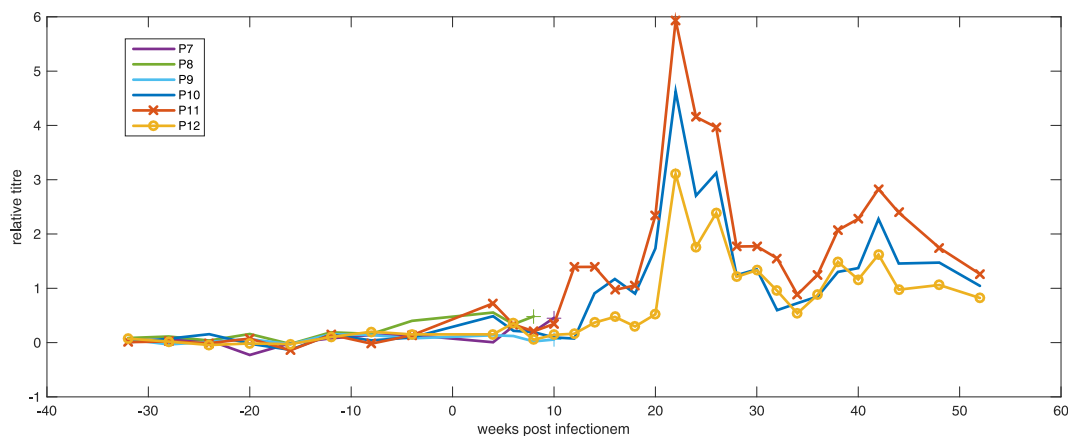
<sup>a</sup>Values for BA <35  $\mu\text{mol/l}$  were not differentiated by Vetscan, therefore no further statistical measures were calculated

Abnormalities in the morphology of erythrocytes or in the appearance and number of thrombocytes were not found during the investigation period. Likewise, the number of the thrombocytes remained stable. Slight to moderate increased numbers of leukocytes were occasionally detected in all parrots, but without differences between time points before and after experimental infection with PaBV.

Blood chemistry analyses revealed no significant changes in BA, calcium, phosphorus, sodium and potassium after experimental infection. Similar to the leukocyte numbers, a high variation of the AST and CK blood values and sometimes very high values were detected in the period before infection already resulting in relatively high reference ranges and large SDs. Nevertheless, the highest values measured p.i. exceeded the population-based reference ranges

significantly. Parrot P8 exhibited an AST value of 475 U/l and a CK value of 6430 U/l 6 weeks p.i and parrot P12 had an AST value up to 385 U/l (50 weeks p.i.) and a CK value of 7116 U/l (18 weeks p.i.). A slight elevation of TP up to 4.9 g/dl occurred in parrot P11 in week 18 p.i. Besides, single deviations from the reference ranges were found in parrot P10 for UA with an elevated value of 10.7 mg/dl 14 weeks p.i. and in parrot P11 for glucose with hyperglycaemic values of 505 mg/dl 22 weeks p.i. and 310 mg/dl 42 weeks p.i.

**Detection of anti-bornavirus antibodies and PaBV-4 RNA.** In **Figure 1**, the course of the relative antibody titres of parrots P7 - P12 starting from 34 weeks before infection is shown. Parrots P7 and P8 exhibited small but constant titre increases until their deaths 9 and 6 weeks after infection, respectively. The relative titre amounted to 0.46 in P7 and 0.48 in P8 in the last measurements. Significant increase in the antibody titre was not detected in parrot P9 until its death 9 weeks after infection; all values after infection were close to the calculated cut-off. The antibody titres of parrots P10 and P12 ascended slightly after 12 weeks p.i., then rose sharply after 18 weeks p.i. and remained at high levels until 26 weeks after infection. Afterwards, the relative titre began to decrease but still stayed on a high level. In parrot P11 an already marked increase in antibody titre was recorded 12 weeks after infection. Thereafter, the antibody titre showed a temporal pattern similar to those of parrots P10 and P12, but always at higher levels throughout the investigation period.



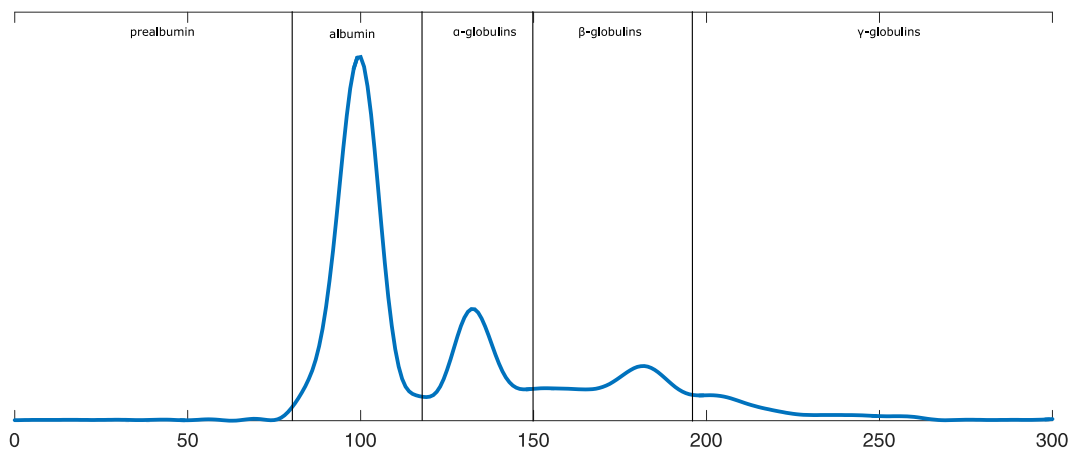
**Figure 1.** Relative antibody titres for parrots P7-P12 from 36 weeks a.i. to 52 weeks p.i. (week 0 = time of experimental infection).

As shown in **Table 2**, viral RNA was not detected in cloacal and pharyngeal swabs and in the buffy coat material of parrots P7, P8 and P9 until their death and in parrot P10 until the end of the investigation period. In parrots P7, P8 and P9, RNA of the bornavirus infection strain was, however, detected in brain samples taken at necropsy, as confirmed by sequencing of the PCR products. In parrot P11 and P12, PaBV-4 RNA was first detected in swabs 12 and 20 weeks p.i., respectively. Afterwards, pharyngeal and cloacal swabs from parrots P11 and P12 remained strongly positive, positive or at least borderline with regard to bornavirus RNA until the end of the investigation period. Analyses of the buffy coat showed only once, 16 weeks p.i., a positive result in parrot P11. Values considered as borderline were measured seven times in buffy coats of parrot P11 and once in parrot P12.



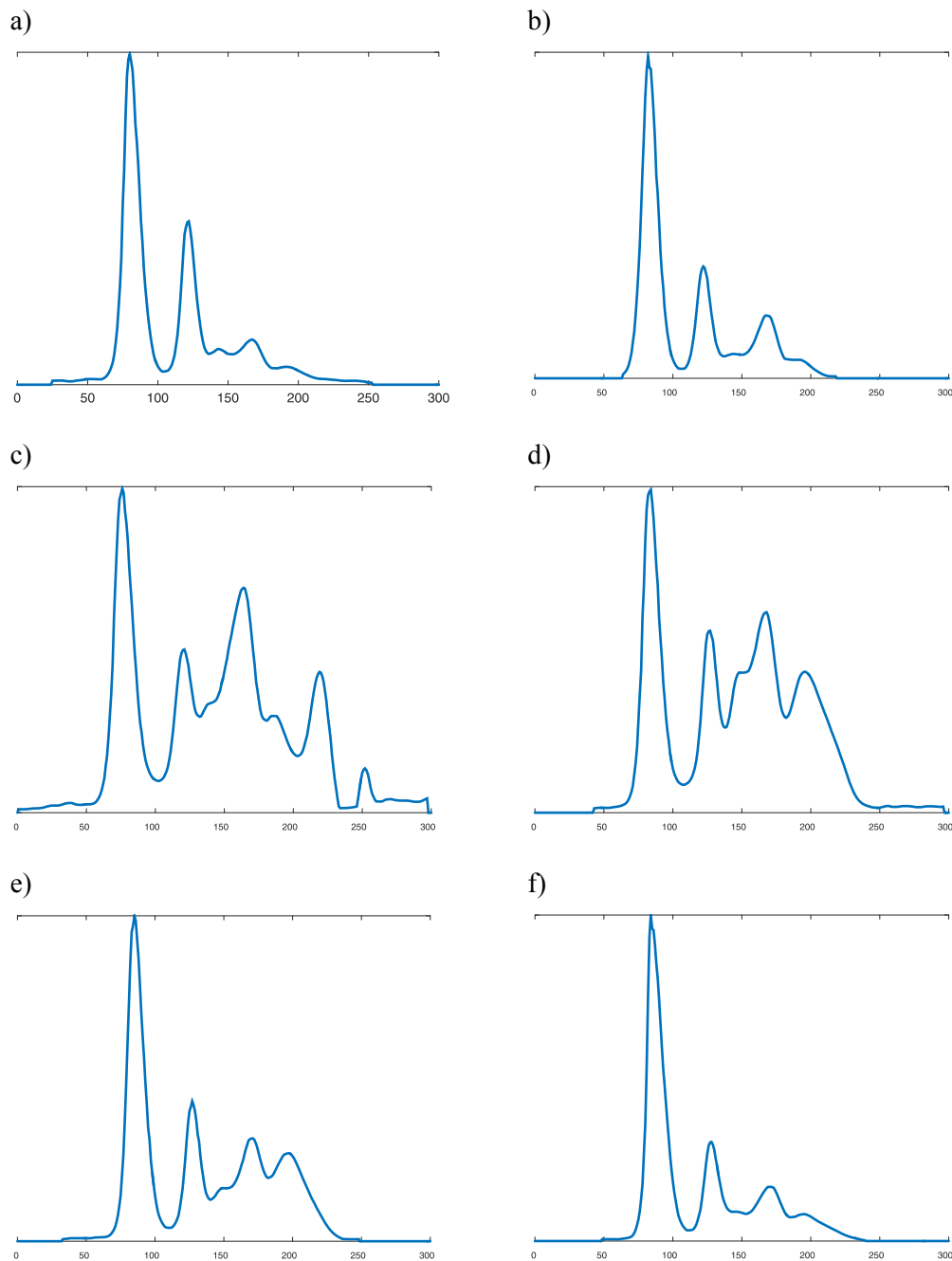


**Plasma protein electrophoresis.** The results of the protein electrophoresis (as shown in supplementary Tables S23-S28) were given as the absolute and relative amounts of the different protein fractions and in addition, as a graphical representation of their quantitative distribution. Plasma protein patterns before experimental infection of parrots, as shown in **Figure 2** for parrot P10, were used as individual reference curves for the analyses of changes during infection. Before infection, there was no detectable prealbumin fraction, while albumin constituted the predominating fraction followed by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -globulins. The distribution of the different protein fractions obtained before infection varied only slightly between the six parrots.



**Figure 2.** Plasma protein electrophoresis of parrot P10, 8 weeks before infection.

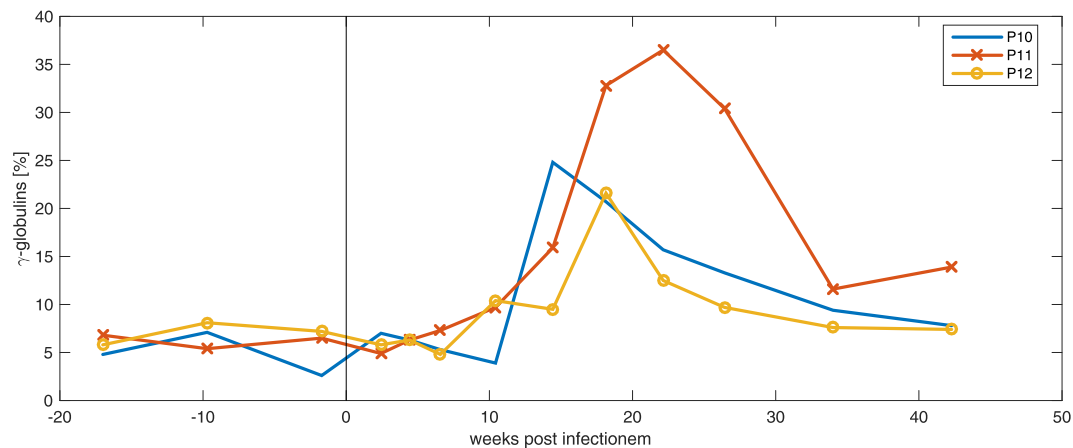
For parrots P7, P8 and P9, which deceased 6 and 9 weeks, respectively, p.i., the results of the plasma protein electrophoresis showed no considerable changes during the time after the experimental infection. For parrots P10, P11 and P12, and from 10 weeks p.i. onwards, absolute and relative values of plasma protein fractions revealed major changes, as shown in **Figure 3** using parrot P10 as an example. Noteworthy is the massive boost of  $\beta$ -globulins 10 weeks p.i, followed by a likewise marked increase in  $\gamma$ -globulins from 14 to 18 weeks p.i. Afterwards, the values decreased and were close to the values a.i. at week 34 p.i. At the same time (10 to 18 weeks p.i.) a hypoalbuminaemia occurred in this bird. Accordingly, the A/G ratio was decreased in the period between 10 and 18 weeks p.i., with a minimum at week 14 p.i. However, there was no significant increase in TP during the examination period.



**Figure 3.** Development of plasma protein values of parrot P10 after infection for (a) 4 weeks p.i., (b) 6 weeks p.i., (c) 10 weeks p.i., (d) 14 weeks p.i., (e) 18 weeks p.i. and (f) 34 weeks p.i.

Parrot P11 showed, like parrot P10, an increase in  $\gamma$ -globulins starting 14 weeks p.i. The A/G-ratio of parrot P11 was decreased in the period between 18 and 26 weeks p.i., simultaneously with lower albumin values. The TP was increased in the sample taken 18 weeks after infection. An increase in  $\beta$ -globulins, however, was not recorded for this bird.

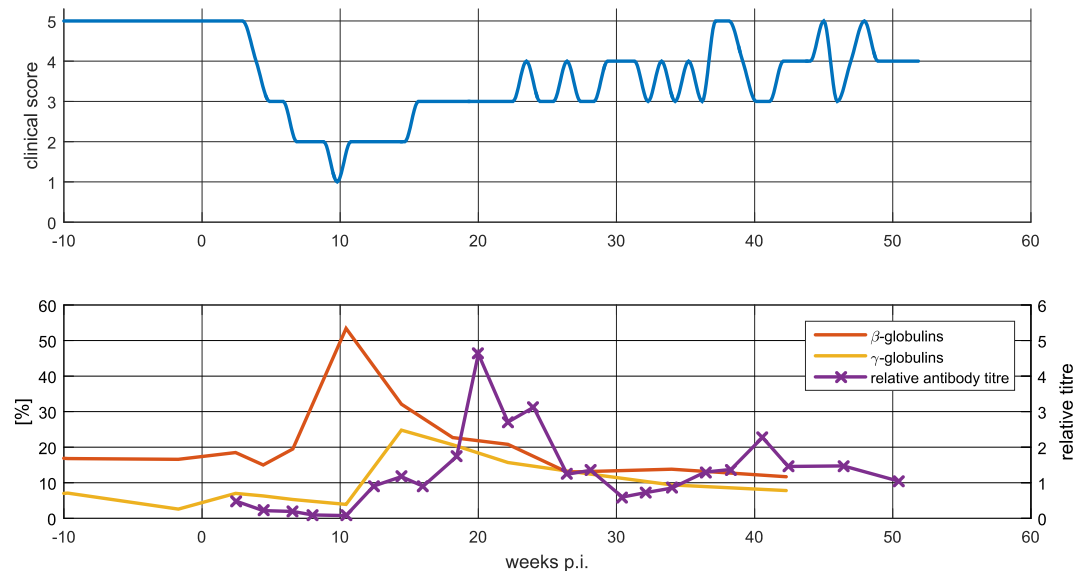
Parrot P12 showed the least alterations of the protein fractions in comparison with parrots P10 and P11. An increase in  $\gamma$ -globulins was detected between 10 and 26 weeks p.i., which turned out small compared to parrots P10 and P11. Neither a significant increase in  $\beta$ -globulins, as for P10, nor an increase in TP, as for P11, could be recorded. The A/G ratio stayed in a constant range over the examination period. In **Figure 4**, the percentage  $\gamma$ -globulin concentrations of parrots P10, P11 and P12 are shown.



**Figure 4.** Development of the relative amounts of plasma  $\gamma$ -globulins in parrots P10, P11 and P12 from 18 weeks a.i. to 42 weeks p.i.

**Temporal coincidence.** When the temporal changes of general condition, antibody titres and plasma protein parameters were compared and displayed in a single chart (shown for parrot P10 in **Figure 5**), it became evident that P7, P8 and P9 died before a significant change of anti-bornavirus antibody titres and of protein electrophoresis pattern could be detected. In P10, the peak of the  $\beta$ -globulin concentration coincided with the lowest general condition score. After week 14 p.i, there was an improvement of its general condition which co-occurred with a marked increase in  $\gamma$ -globulin concentration and anti-bornavirus antibody titres. Similar results were obtained for parrot P12. Nearly simultaneously with a marked increase in antibody titres and a maximum  $\gamma$ -globulin amount detected after week 18 p.i., a progressive improvement of the clinical appearance of this bird occurred. The clinical course was slightly different for parrot P11, compared to the five other parrots. P11 did not develop serious disease signs but, in contrast, reached a high antibody titre already 12 weeks after infection. Viral RNA was not detected in swabs of parrot P7 - P10. In parrots P11 and P12, the amount of RNA,

evaluated in a semi-quantitative way, did not correlate with the clinical, serological or protein parameters mentioned before.



**Figure 5.** Development of general condition in comparison to the course of plasma  $\beta$ -globulins,  $\gamma$ -globulins and relative antibody titres of parrot P10. A clinical score of 5 relates to a good general condition, a clinical score of 1 corresponds to a poor general condition.

## Discussion

In the study presented here, all six African grey parrots were successfully infected with PaBV-4 by subcutaneous route as indicated by the detection of anti-bornavirus antibodies in all six birds and of viral RNA identical to the infection strain in five of six birds. The clinical signs of the disease varied considerably between the six infected birds. Various incubation periods, illness severities and progresses of disease have also been documented for naturally infected psittacines ranging from a subclinical carrier status and nearly asymptomatic courses to a sudden onset of clinical signs followed by death (Phalen, 1986; Rich, 1992; Gregory *et al.*, 1994; De Kloet & Dorrestein, 2009; Gancz *et al.*, 2010; Kistler *et al.*, 2010; Heffels-Redmann *et al.*, 2011), and thus, the clinical course of the experimentally induced disease corresponded rather well to natural infections.

The results consistently obtained from this experiment using laboratory diagnostic tests are therefore regarded as valuable and well transferable to natural conditions. Until now haematological changes associated with experimental bornavirus infections in birds have not been published. Former reports on blood parameters are based on single cases and observations of naturally infected birds and documented changes differ between cases and might be attributed to other associated diseases. Specific reference ranges of the blood values for each parrot and for the group (Scope *et al.*, 2002; 2005, 2006) allowed a very precise and individualized assessment even of minor changes. A reduced PCV as detected in P10 and P11 has also been described in several cases of natural bornavirus infection (Ridgway & Gallerstein, 1983; Joyner *et al.*, 1989; Degernes *et al.*, 1991; Keller *et al.*, 2010). Gastrointestinal malabsorption was quoted as an explanation for the non-regenerative anaemia in birds suffering from PDD, as it is generally noted in starving birds (Suedmeyer, 1992; Gancz *et al.*, 2010).

With regard to WBC, it has to be noted that the birds in this study showed reappearing elevated cell counts not only after infection, but also during the year before infection already. Thus, it seems unlikely that it was caused by the bornavirus infection. Elevated WBCs, often in combination with heterophilia, have occasionally been reported in birds with PDD (Rich, 1992; Suedmeyer, 1992; Bond *et al.*, 1993; Gancz *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2010). Gancz *et al.* (2010) regarded leucocytosis and heterophilia as inconsistent changes, related to

stress or the existence of secondary infections. As most of those cases were naturally infected birds not kept under special hygienic conditions, additional infections with other pathogens cannot be excluded and may have led to altering leucocyte counts. Mycotic or bacterial opportunistic infections were even regarded as common in natural bornavirus infections (Phalen, 1986; Degernes *et al.*, 1991; Lutz & Wilson, 1991; Rich, 1992) and may complicate the interpretation of laboratory findings (Gregory *et al.*, 1994).

Blood chemistry analyses revealed deviations in AST, CK, TP, UA and glucose values. These changes are not necessarily induced by bornavirus infection or PDD. The increase in the enzymes AST and CK observed especially in parrots P8 and P12, partly coincided with the clinical disease period. Mild to moderate plasma elevations of enzymes of muscle origin, like AST, CK and lactate dehydrogenase were mentioned before in reports on bornavirus infections in Psittaciformes (Gancz *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2010). It was expected that elevated plasma CK values could serve as an unspecific diagnostic indicator of splanchnic neuropathy and could therefore indicate an upcoming disease (Jenkins, 1991). However, CK values could also rise because of patient excitement and handling, muscle damage or trauma (Fudge, 2000). The elevation of the TPs in parrot P11 might be due to the increase in immunoglobulins. Hyperglycaemia and an increased UA level as documented singularly for parrots P11 and P10, respectively, have not yet been described in literature about PDD or bornaviruses. Glucose values up to 600mg/dl are most likely related to stress (Fudge, 1997). Slight increases in UA concentration, as documented for P10, have often been observed to occur because of dehydration (Fudge, 1997).

Other changes, which were occasionally and inconsistently seen in other studies on PDD in Psittaciformes and which were interpreted as indicators of a negative metabolic status, for example hypoglycemia (Ridgway & Gallerstein, 1983) and increased lipase levels (Boutette & Taylor, 2004), were not detected in this investigation.

Protein electrophoresis revealed important changes in protein parameters. Similar to many other investigations about protein electrophoresis in birds, plasma was used instead of serum (Cray *et al.*, 1995; Cray & Tatum, 1998; Ivey, 2000; Tatum *et al.*, 2000; García-Montijano *et al.*, 2002; Rosenthal *et al.*, 2005; Cray *et al.*, 2007; 2009a; Briscoe *et al.*, 2010) allowing comparison and a larger usable

volume. It has to be noted that plasma, unlike serum, contains the coagulation enzyme fibrinogen, which usually migrates into the  $\beta$ -fraction and can therefore complicate interpretation. In the present study, three electrophoreses for each parrot at different dates before infection were performed and used as a base for individual changes occurring after infection. It is also important to consider that results of electrophoresis can also differ significantly depending on the type of instrument used for the examination, the composition of the gel, the running time and the buffer (Cray *et al.*, 2011b). In a comparative study with three different electrophoresis systems, the use of Sebia Hydrasys, a preceding model to the one employed in the study presented here, resulted in higher values of the  $\alpha$ -globulin fraction compared to other systems (Cray *et al.*, 2011b). We did consistently ascertain a relatively high amount of proteins of the  $\alpha$ -globulin fraction in all performed electrophoreses as well (20-30% of TP of measurements before infection). These peculiarities are surely attributed to technical reasons and have to be taken into account during analyses and comparisons of the results.

We expected to see changes in protein patterns due to innate or acquired immune reactions very soon after the experimental infection of the African grey parrots. However, changes appeared only in parrots P10, P11 and P12 and not before 10 weeks p.i., thus at a time, when parrots P7, P8 and P9 had already died. Descriptions of the main plasma protein changes are thus based on three African grey parrots, which is a consequence of a limited number of experimental birds because of animal welfare reasons. Nevertheless the high consistency of changes among the birds supports the relevance of the results, and similar plasma protein changes were also observed in naturally infected parrots by one of the authors (R.R., unpublished results).

Consistent detection of elevations of the  $\gamma$ -globulin fraction whose main components are the immunoglobulins did not take place earlier than week 10 or 14 p.i. An early increase in the  $\beta$ -globulin fraction or the  $\alpha$ -globulin fraction reflecting an increase in acute-phase proteins and thus indicating an acute phase of the disease had not been observed. Since the first protein electrophoresis p.i. was performed with blood taken 2 weeks p.i., eventual acute changes before might be missed. However, because there was not the slightest abnormality in the electrophoresis patterns of any of the six parrots during the time of an eventual acute-phase reaction, compared to the curves before infection, this possibility is

regarded as unlikely. In parrot P10, an increased level of  $\beta$ -globulins was detected, but not before 10 weeks p.i. and it is remarkable that the peak of the  $\beta$ -globulins coincided with the worst clinical condition in this bird. It is unknown whether this increase in  $\beta$ -globulins was due to an unusually late increase in acute-phase proteins, or whether immunoglobulins were already generated and immigrated in this fraction. In avian species, serum amyloid A, transferrin, haptoglobin, fibrinogen, ceruloplasmin and alpha 1 acid glycoprotein were identified as putative positive acute phase proteins (Cray *et al.*, 2011a), which have multiple functions in modulating the immune system, protein transport and tissue protection (Cray *et al.*, 2009b). Albumin, which was also described as a negative acute phase protein (Kaneko, 1997; Cray *et al.*, 2011a), did not, in this investigation, reveal any variation during the first weeks after infection, but was reduced after 10 weeks p.i. in parrot P10. Hypoproteinaemia, respectively, hypoalbuminaemia (Ridgway & Gallerstein, 1983; Degernes *et al.*, 1991; Suedmeyer, 1992; Keller *et al.*, 2010), as observed in parrots P10 and P11, have already been described for birds suspected of suffering from PDD before. Hypoalbuminaemia was found a consistent finding in birds with advanced and severe disease (Boutette & Taylor, 2004). Thus, the results of protein electrophoresis did not support the existence of an early immune reaction in the experimentally infected parrots. High-resolution-electrophoresis or immunoelectrophoresis as performed by Cray (1997) might provide further insights into proteins involved in the reactions during bornavirus infection.

When comparing the results of ELISA and protein electrophoresis with actual clinical condition, it was apparent that parrots P10 and P11, like P7 and P8, developed disease signs soon after infection, and also had similar antibody titres during this first phase of disease. But in contrast to P7 and P8 which succumbed to the disease, they showed a recovery which coincided with a marked increase in the  $\gamma$ -globulins and of bornavirus-specific antibodies. Parrot P11 exhibited high antibody titres and a marked increase in the  $\gamma$ -globulin (immunoglobulin) fraction sooner than the other parrots and showed only slight clinical signs during the whole investigation period.

Our observation of the time course of anti-bornavirus antibody development contradicts the theories that antibodies do not protect from disease (Heffels-Redmann *et al.*, 2012) or might even parallel the development of clinical PDD



(Villanueva *et al.*, 2010). Many reports on the detection of anti-bornavirus antibodies in clinically healthy birds (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Hoppes *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010; Heffels-Redmann *et al.*, 2012; Piepenbring *et al.*, 2012) also argue against this theory that they take part in inducing the development of clinical signs.

In experimentally infected cockatiels, the outcome of clinical disease was not influenced by the height of antibody titres determined by immunofluorescence tests. It was therefore concluded that the existence of antibodies does not indicate antiviral immunity (Piepenbring *et al.*, 2012). However, cockatiels, which were carriers of PaBV-4 showed a prolonged survival time after experimental infection with a different strain of PaBV-4 (Payne *et al.*, 2011b) compared with cockatiels of the same flock inoculated with PaBV-2 (Mirhosseini *et al.*, 2011). This was interpreted as a reflection of a lack of complete immunity to superinfection but still as some resistance (Payne *et al.*, 2011b). Differences between the strains or failure, in naturally infected birds, to develop a strong protective immune response were discussed as possible reasons for the lack of complete protection (Payne *et al.*, 2011b). Information on antibody concentrations in the cockatiels before and after experimental bornavirus inoculation however is not available.

A possible involvement of anti-bornavirus antibodies in the pathogenesis of the disease was also discussed in the Mammalian 1 Bornavirus, Borna disease virus (BoDV). In a study conducted on rats, animals inoculated with low doses ( $10^2$ - $10^4$ TCID<sub>50</sub>) of BoDV showed typical clinical disease and severe encephalitis. In contrast, infection with a high dose ( $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub>) only resulted in a mild encephalitic response, the development of high titres of anti-BoDV antibodies and a concurrent protection against virulent challenge (Oldach *et al.*, 1995). It was concluded that a high dose BoDV inoculation triggered an early virus-specific reaction of the immune system, as demonstrated by strong cellular and humoral responses. There was no evidence that antibodies might contribute to neuropathology, although neutralizing antibodies apparently controlled virus tropism and could prevent the spread of virus from peripheral infection sites to the CNS (Hatalski *et al.*, 1998b; Furrer *et al.*, 2001b; Furrer *et al.*, 2001a).

It still has to be clarified to which extent the knowledge on BoDV can be transferred to bornaviruses occurring in Psittaciformes or other birds. It is obvious that there is a large amount of apparently healthy birds being seropositive. These

---

can be infected birds about to develop disease or recovered birds immune to disease (Villanueva *et al.*, 2010). Future work should be directed towards determining whether passive administration of specific antibodies can alter pathogenesis or clinical outcome of bornavirus infections.

## Acknowledgements

The authors thank Peter Staeheli, University of Freiburg, Germany, for sharing the virus strain used for infection.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## ORCID

*Charlotte Högemann*  <http://orcid.org/0000-0002-0062-9824>

*Rüdiger Korb*  <http://orcid.org/0000-0002-1937-7305>

*Monika Rinder*  <http://orcid.org/0000-0003-3269-7407>

## References

- Afonso, C. L., Amarasinghe, G. K., Banyai, K., Bao, Y., Basler, C. F., Bavari, S., Bejerman, N., Blasdel, K. R., Briand, F. X., Briese, T., Bukreyev, A., Calisher, C. H., Chandran, K., Cheng, J., Clawson, A. N., Collins, P. L., Dietzgen, R. G., Dolnik, O., Domier, L. L., Durrwald, R., Dye, J. M., Easton, A. J., Ebihara, H., Farkas, S. L., Freitas-Astua, J., Formenty, P., Fouchier, R. A., Fu, Y., Ghedin, E., Goodin, M. M., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T. H., Jiang, D., Kitajima, E. W., Kobinger, G. P., Kondo, H., Kurath, G., Lamb, R. A., Lenardon, S., Leroy, E. M., Li, C. X., Lin, X. D., Liu, L., Longdon, B., Marton, S., Maisner, A., Muhlberger, E., Netesov, S. V., Nowotny, N., Patterson, J. L., Payne, S. L., Paweska, J. T., Randall, R. E., Rima, B. K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Shi, M., Smither, S. J., Stenglein, M. D., Stone, D. M., Takada, A., Terregino, C., Tesh, R. B., Tian, J. H., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J. S., Vasilakis, N., Verbeek, M., Volchkov, V. E., Wahl-Jensen, V., Walsh, J. A., Walker, P. J., Wang, D., Wang, L. F., Wetzell, T., Whitfield, A. E., Xie, J. T., Yuen, K. Y., Zhang, Y. Z. & Kuhn, J. H. (2016). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of Virology*, 161, 2351-2360.
- Berhane, Y., Smith, D. A., Newman, S., Taylor, M., Nagy, É., Binnington, B. & Hunter, B. (2001). Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*, 30, 563-570.
- Bond, M. W., Downs, D. & Wolf, S. (1993). Screening for psittacine proventricular dilatation syndrome. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 92-97). Nashville, TN.
- Boutette, J. B. & Taylor, M. (2004). Proventricular dilatation disease: A review of research, literature, species differences, diagnostics, prognosis, and treatment. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 175-181). New Orleans, LO.
- Briscoe, J. A., Rosenthal, K. L. & Shofer, F. S. (2010). Selected complete blood cell count and plasma protein electrophoresis parameters in pet psittacine birds evaluated for illness. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 24, 131-137.

- Clark, F. D. (1984). Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. *Avian Diseases*, 28, 813-815.
- Cray, C., Bossart, G. D. & Harris, D. (1995). Plasma protein electrophoresis: Principles and diagnosis of infectious disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 55-59). Philadelphia, PA.
- Cray, C. (1997). Plasma protein electrophoresis: An update. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 209-212). Reno, NV.
- Cray, C. & Tatum, L. M. (1998). Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 12, 4-10.
- Cray, C., Rodriguez, M. & Zaias, J. (2007). Protein electrophoresis of psittacine plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, 36, 64-72.
- Cray, C., Reavill, D., Romagnano, A., Sant, F. V., Champagne, D., Stevenson, R., Rolfe, V., Griffin, C. & Clubb, S. (2009a). Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 23, 125-135.
- Cray, C., Zaias, J. & Altmann, N. H. (2009b). Acute phase response in animals: A review. *Comparative Medicine*, 59, 517-526.
- Cray, C., Dickey, M. & Rodriguez, M. (2011a). Quantitation of acute phase proteins in psittacine species. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 31-32). Seattle, WA.
- Cray, C., King, E., Rodriguez, M., Decker, L. S. & Arheart, K. L. (2011b). Differences in protein fractions of avian plasma among three commercial electrophoresis systems. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 25, 102-110.
- De Kloet, S. R. & Dorrestein, G. M. (2009). Presence of avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws. *Avian Diseases*, 53, 568-573.
- Degernes, L. A., Flammer, K. & Fisher, P. (1991). Proventricular dilatation syndrome in a Green-winged macaw. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 45-49). Chicago, IL.
- Fraser, G. G. & Harris, E. K. (1989). Generation and Application of Data on Biological Variation in Clinical Chemistry. *Critical Reviews in Clinical*

*Laboratory Sciences*, 27, 409-437.

- Fudge, A. M. (1997). Avian Clinical Pathology - Hematology and Chemistry. In R. B. Altmann (Ed.), *Avian Medicine and Surgery* 1st edn (pp. 142-157). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Fudge, A. M. (2000). *Laboratory Medicine - Avian and Exotic Pets*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L. & Planz, O. (2001a). Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: Prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *Journal of Virology*, 75, 943-951.
- Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L. & Planz, O. (2001b). High-dose Borna disease virus infection induces a nucleoprotein-specific cytotoxic T-lymphocyte response and prevention of immunopathology. *Journal of Virology*, 75, 11700-11708.
- Gancz, A. Y., Kistler, A. L., Greninger, A. L., Farnoushi, Y., Mechani, S., Perl, S., Berkowitz, A., Perez, N., Clubb, S., DeRisi, J. L., Ganem, D. & Lublin, A. (2009). Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Virology Journal*, 6, 100.
- Gancz, A. Y., Clubb, S. & Shivaprasad, H. L. (2010). Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13, 471-494.
- García-Montijano, M., García, A., Lemus, J. A., Montesinos, A., Canales, R., Luaces, I. & Pereira, P. (2002). Blood chemistry, protein electrophoresis, and hematologic values of captive Spanish Imperial eagles (*Aquila adalberti*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33, 112-117.
- Gentry, J., Heatley, J. J. & Tizard, I. (2015). Experimental infection of Peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*) with avian bornavirus genotypes II und IV. In *Proceedings of the ExoticsCon* (p. 91). San Antonio, TX.
- Gray, P., Hoppes, S., Suchodolski, P., Mirhosseini, N., Payne, S., Villanueva, I., Shivaprasad, H. L., Honkavuori, K. S., Lipkin, W. I., Briese, T., Reddy, S. M. & Tizard, I. (2010). Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 473-479.

- Gregory, C. R., Latimer, K. S., Niagro, F. D., Branson, W. R., Campagnoil, R. P., Norton, T. M., McManamon, R. & Greenacre, C. B. (1994). A review of proventricular dilatation syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 8, 69-75.
- Halami, M. Y., Nieper, H., Müller, H. & Johne, R. (2008). Detection of a novel circovirus in Mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research*, 132, 208-212.
- Harris, E. K. (1974). Effects of intra- and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. *Clinical Chemistry*, 20, 1535-1542.
- Hatalski, C. G., Hickey, W. F. & Lipkin, W. I. (1998). Humoral immunity in the central nervous system of Lewis rats infected with Borna disease virus. *Journal of Neuroimmunology*, 90, 128-136.
- Heffels-Redmann, U., Enderlein, D., Herzog, S., Herden, C., Piepenbring, A., Neumann, D., Müller, H., Capelli, S., Müller, H., Oberhauser, K., Gerlach, H., Kaleta, E. F. & Lierz, M. (2011). Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*, 40, 419-426.
- Heffels-Redmann, U., Enderlein, D., Herzog, S., Piepenbring, A., Bürkle, M., Neumann, D., Herden, C. & Lierz, M. (2012). Follow-up investigations on different courses of natural avian bornavirus infections in psittacines. *Avian Diseases*, 56, 153-159.
- Herzog, S., Enderlein, D., Heffels-Redmann, U., Piepenbring, A., Neumann, D., Kaleta, E. F., Müller, H., Lierz, M. & Herden, C. (2010). Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian bornavirus infection in psittacine birds. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2282-2284.
- Honkavuori, K. S., Shivaprasad, H. L., Williams, B. L., Quan, P. L., Hornig, M., Street, C., Palacios, G., Hutchison, S. K., Franca, M., Egholm, M., Briese, T. & Lipkin, W. I. (2008). Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1883-1886.
- Hoppes, S., Gray, P. L., Payne, S., Shivaprasad, H. L. & Tizard, I. (2010). The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of*

*North America: Exotic Animal Practice*, 13, 495-508.

- Ivey, E. S. (2000). Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 14, 103-106.
- Jenkins, T. (1991). Creatinine kinase as a diagnostic indicator of splanchnic neuropathy. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 5, 49.
- Joyner, K. L., Kock, N. & Styles, D. (1989). Encephalitis, proventricular and ventricular myositis, and myenteric ganglioneuritis in an Umbrella cockatoo. *Avian Diseases*, 33, 379-381.
- Kaneko, J. J. (1997). Serum proteins and dysproteinemias. In J. J. Kaneko (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 5th edn (pp. 117-138). San Diego: Academic Press.
- Keller, D. L., Honkavuori, K. S., Briese, T., Lipkin, W. I., Muthuswamy, A., Steinberg, H. & Sladky, K. K. (2010). Proventricular dilatation disease associated with avian bornavirus in a Scarlet macaw (*Ara macao*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 961-965.
- Kistler, A., Gancz, A., Clubb, S., Skewes-Cox, P., Fischer, K., Sorber, K., Chiu, C., Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, Y., Greninger, A., Wen, C., Karlene, S., Ganem, D. & DeRisi, J. (2008). Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: Identification of a candidate etiologic agent. *Virology Journal*, 5, 88.
- Kistler, A. L., Smith, J. M., Greninger, A. L., DeRisi, J. L. & Ganem, D. (2010). Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *Journal of Virology*, 84, 2176-2179.
- König, H. E. & Korbel, R. (2016). Medication and blood collection techniques. In H. E. König, R. Korbel & H. G. Liebich (Eds.), *Avian Anatomy - Textbook and Colour Atlas* 2nd edn (pp. 289-303). Sheffield, UK: 5m Publishing.
- Korbel, R. & Rinder, M. (2011). Ocular findings in psittacine birds infected with avian bornavirus (ABV). In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 21). Seattle, WA.
- Korbel, R. & Rinder, M. (2012). Update on psittacine proventricular disease (PDD) and avian Bornavirus infection. In *Proceedings of the Australasian Committee Association of Avian Veterinarians and Unusual Exotic Pet Veterinarians Annual Conference* (pp. 103-105). Melbourne, Australia.



- Kuhn, J. H., Durrwald, R., Bao, Y., Briese, T., Carbone, K., Clawson, A. N., deRisi, J. L., Garten, W., Jahrling, P. B., Kolodziejek, J., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Stenglein, M., Tomonaga, K., Weissenböck, H. & Nowotny, N. (2015). Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Archives of Virology*, 160, 621-632.
- Lierz, M., Hafez, H. M., Honkavuori, K. S., Gruber, A. D., Olias, P., Abdelwhab, E. M., Kohls, A., Lipkin, W. I., Briese, T. & Hauck, R. (2009). Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathology*, 38, 491-496.
- Lierz, M. (2016). Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease. In B. Speer (Ed.), *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery* (pp. 28-46). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Lutz, M. & Wilson, R. (1991). Psittacine proventricular dilatation syndrome in an Umbrella cockatoo. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 198, 1962 - 1964.
- Mannl, A., Gerlach, H. & Leipold, R. (1987). Neuropathic gastric dilatation in psittaciformes. *Avian Diseases*, 31, 214-221.
- Mirhosseini, N., Gray, P. L., Hoppes, S., Tizard, I., Shivaprasad, H. & Payne, S. (2011). Proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) after infection with a genotype 2 avian bornavirus. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 25, 199-204.
- Ogawa, H., Yamaguchi, T. & Fukushi, H. (2005). Duplex shuttle PCR for differential diagnosis of budgerigar fledgling disease and psittacine beak and feather disease. *Microbiology and Immunology*, 49, 227-237.
- Oldach, D., Zink, M. C., Pyper, J. M., Herzog, S., Rott, R., Narayan, O. & Clements, J. E. (1995). Induction of protection against Borna disease by inoculation with high-dose-attenuated Borna disease virus. *Virology*, 206, 426-434.
- Ouyang, N., Storts, R., Tian, Y., Wigle, W., Villanueva, I., Mirhosseini, N., Payne, S., Gray, P. & Tizard, I. (2009). Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*, 38, 393-401.
- Payne, S., Shivaprasad, H. L., Mirhosseini, N., Gray, P., Hoppes, S., Weissenböck, H. & Tizard, I. (2011). Unusual and severe lesions of

- proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian bornavirus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV. *Avian Pathology*, 40, 15-22.
- Phalen, D. N. (1986). An outbreak of psittacine proventricular dilatation syndrome (PPDS) in a private collection of birds and an atypical form of PPDS in a Nanday conure. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 27-34). Miami, FL.
- Piepenbring, A. K., Enderlein, D., Herzog, S., Kaleta, E. F., Heffels-Redmann, U., Ressemeyer, S., Herden, C. & Lierz, M. (2012). Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 234-241.
- Piepenbring, A. K., Enderlein, D., Herzog, S., Al-Ibadi, B., Heffels-Redmann, U., Heckmann, J., Lange-Herbst, H., Herden, C. & Lierz, M. (2016). Parrot Bornavirus (PaBV)-2 isolate causes different disease patterns in cockatiels than PaBV-4. *Avian Pathology*, 45, 156-168.
- Polo, F. J., Peinado, V. I., Viscor, G. & Palomeque, J. (1998). Hematologic and plasma chemistry values in captive psittacine birds. *Avian Diseases*, 42, 523-535.
- Quesenberry, K. & Moroff, S. (1991). Plasma electrophoresis in psittacine birds. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 112-117). Chicago, IL.
- Reuter, A., Ackermann, A., Kothlow, S., Rinder, M., Kaspers, B. & Staeheli, P. (2010). Avian bornaviruses escape recognition by the innate immune system. *Viruses*, 2, 927-938.
- Rich, G. A. (1992). Classic and atypical cases of proventricular dilatation disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 119-125). New Orleans, LA.
- Ridgway, R. A. & Gallerstein, G. A. (1983). Proventricular dilatation in psittacines. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 228-233). San Diego, CA.
- Rinder, M., Ackermann, A., Kempf, H., Kaspers, B., Korbel, R. & Staeheli, P. (2009). Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *Journal of Virology*, 83, 5401-5407.
- Rinder, M., Adrian, K., Staeheli, P., Kaspers, B. & Korbel, R. (2010). Bornavirus infections: Development of serological tests for psittacine birds. In

- Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 17). San Diego, CA.
- Rosenthal, K. L., Johnston, M. S. & Shofer, F. S. (2005). Assessment of the reliability of plasma electrophoresis in birds. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 375-378.
- Rubbenstroth, D., Rinder, M., Kaspers, B. & Staeheli, P. (2012). Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a Salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Veterinary Microbiology*, 161, 36-42.
- Rubbenstroth, D., Schmidt, V., Rinder, M., Legler, M., Corman, V. M. & Staeheli, P. (2014). Discovery of a new avian bornavirus genotype in Estrildid finches (*Estrildidae*) in Germany. *Veterinary Microbiology*, 168, 318-323.
- Scope, A., Schwendenwein, I. & Gabler, C. (2002). Short-term variations of biochemical parameters in racing pigeons (*Columba livia*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 16, 10-15.
- Scope, A., Schwendenwein, I. & Frommlet, F. (2005). Influence of outlying values and variations between sampling days on reference ranges for clinical chemistry in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Record*, 156, 310-314.
- Scope, A., Schwendenwein, I. & Frommlet, F. (2006). Biological variation, individuality and critical differences of eight biochemical blood constituents in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Record*, 159, 839-843.
- Solberg, H. E. (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta*, 170, S13 - S32.
- Suedmeyer, W. K. (1992). Diagnosis and clinical progression of three cases of proventricular dilatation syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 6, 159-163.
- Tatum, L. M., Zaias, J., Mealey, B. K., Cray, C. & Bossart, G. D. (2000). Protein electrophoresis as a diagnostic and prognostic tool in raptor medicine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31, 497-502.
- Tomaszewski, E., Wilson, V. G., Wigle, W. L. & Phalen, D. N. (2001). Detection and heterogeneity of herpesviruses causing Pacheco's disease in parrots.

---

*Journal of Clinical Microbiology*, 39, 533-538.

- VanDevanter, D. R., Warrenner, P., Bennett, L., Schultz, E. R., Coulter, S., Garber, R. L. & Rose, T. M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1666-1671.
- Villanueva, I., Gray, P., Mirhosseini, N., Payne, S., Hoppes, S., Honkavuori, K. S., Briese, T., Turner, D. & Tizard, I. (2010). The diagnosis of proventricular dilatation disease: Use of a Western blot assay to detect antibodies against avian borna virus. *Veterinary Microbiology*, 143, 196-201.
- Weissenböck, H., Bakonyi, T., Sekulin, K., Ehrensperger, F., Doneley, R. J., Dürrwald, R., Hoop, R., Erdélyi, K., Gál, J. & Kolodziejek, J. (2009). Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 1453-1459.

## IV. DISKUSSION

In der hier vorgestellten Studie wurden sechs Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) für eine experimentelle Infektion mit aviären Bornaviren der Art *Psittaciform 1 Bornavirus* verwendet.

Die Fähigkeit eines Virus zum Auslösen einer Krankheit bei einer bestimmten Tierart ist von verschiedenen Faktoren abhängig, welche sowohl das Virus selbst als auch seinen Wirt betreffen. Mithilfe von Zellkulturen ist es durchaus möglich, einzelne Aspekte dieser Interaktion zu analysieren. Die gesamten Reaktionen, die eine Erkrankung in einem Organismus auslöst, sind allerdings zu komplex für eine reine in-vitro Analyse. Hierfür ist es also notwendig, Tierversuche durchzuführen, um dadurch wichtige Informationen zur Inkubationszeit, der Symptomatik, der Erregerausscheidung, der Diagnostik und gegebenenfalls der Therapiemöglichkeiten gewinnen zu können. Da es sich bei den vogelspezifischen Bornaviren um Erreger handelt, die erst vor relativ kurzer Zeit, im Jahr 2008, entdeckt worden waren, und zur Erfüllung der Koch'schen Postulate ist ein Infektionsversuch mit Virusisolaten besonders zielführend.

In der vorliegenden Studie wurden Kongo-Graupapageien als Versuchstiere ausgewählt, weil die neuropathische Drüsenmagendilatation insbesondere bei großen Papageienspezies häufig auftritt und von großer klinischer Relevanz ist. In der Regel zeigt sie einen letalen Ausgang.

Kongo-Graupapageien sind häufig gezüchtete Großpapageien und in Deutschland werden derzeit schätzungsweise 20.000 Vögel gehalten. Dementsprechend gehören Graupapageien nicht nur in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der LMU, sondern in ganz Deutschland, zu den häufigsten Großpapagei-Patienten in der Vogelpraxis.

Bei Kongo-Graupapageien hat die PDD eine große Bedeutung. Einer amerikanischen Studie zufolge, bei der insgesamt 1429 Papageien mit Magen-Darm-Erkrankungen seziert wurden, litten 60-70% der Kongo- und Timneh-Graupapageien an einer PDD. Die Krankheit stellte bei diesen Vogelarten somit die mit Abstand häufigste Magen-Darm-Erkrankung dar (Reavill & Schmidt, 2007). Eine Erweiterung der bisherigen Kenntnisse über die Pathogenese der Krankheit ist also insbesondere bei dieser Tierart von großer Relevanz. Eine

erfolgreiche experimentelle Bornavirusinfektion mit Graupapageien als Versuchstiere wurde bisher nicht publiziert. Die Verwendung dieser Tierart ermöglichte also Untersuchungen im homologen System und stellte damit eine direkte Übertragbarkeit der erzielten Versuchsergebnisse auf klinische Verhältnisse sicher. Aufgrund der großen artlichen Unterschiede innerhalb der Klasse Aves und auch innerhalb der Ordnung der Psittaciformes (Papageienvögel) wäre dies bei Verwendung einer anderen Art nicht sichergestellt.

Für das Experiment wurden Tiere ausgewählt, die mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit frei von relevanten Krankheitserregern und insbesondere frei von aviären Bornaviren waren. Dies wurde durch folgende Maßnahmen erreicht: Die Tiere stammten von Elterntieren, bei denen eine Infektion mit aviären Bornaviren bislang nicht nachgewiesen war und die auch frei von klinischer Erkrankung waren. Die Vögel stammten aus einer Kunstbrut und wurden in der Gruppe von Hand aufgezogen, dabei wurden hohe Biosicherheits-Standards eingehalten, um keine Erreger von außen in den Bestand einzutragen. Mit Erreichen der Futterfestheit wurden die Tiere in die Haltung der Klinik überführt und dort unter quasi SPF-Haltungsbedingungen als Gruppe untergebracht. Außerdem wurde eine standardisierte, adäquate und bedarfsgerechte Fütterung durchgeführt, um ernährungsbedingte Einflüsse zu vermeiden. Mit Hilfe von diagnostischen Tests wurde außerdem sichergestellt, dass alle Vögel auch frei von anderen bekannten Primärerregern waren. Insbesondere wurde eine Freiheit von Circo- und Polyomaviren, Herpesviren, Chlamydien und Parasiten bestätigt. Die hohen Hygienestandards unter denen die Tiere gehalten wurden dienten dazu, auch während des laufenden Versuchs ein Eintrag und eine Infektion mit Viren, primärpathogenen Bakterien, Pilzen oder Parasiten zu verhindern.

Die Gruppe der Papageien bestand aus 2 männlichen (P7 und P9) und 4 weiblichen Tieren. Sie wurden mit PaBV-4, und zwar mit einem in Zellkultur vermehrten und aufgereinigten Virusisolat, das keine anderen Pathogene enthielt, auf subkutanem Weg durch Injektion in die Kniefalte infiziert. Der Erfolg der Infektion wurde durch den Nachweis von Anti-Bornavirus-Antikörpern bei allen Versuchstieren und von Virus-RNA aus Tupfern und Gewebe bei fünf von sechs Vögeln erbracht. Während der Dauer des Tierversuches wurde nur PaBV-4 nach der experimentellen Infektion festgestellt, das genetisch identisch mit dem experimentell injizierten Virus war.

Die hervorgerufenen klinischen Anzeichen und Verläufe der Krankheit unterschieden sich deutlich zwischen den sechs einzelnen Versuchstieren. Auch bei natürlich infizierten Papageien variieren sowohl die Inkubationszeiten als auch Schwere und Verlauf der Krankheit. Die Spanne reicht von einem subklinischen Carrier-Status und nahezu asymptomatischen Verläufen bis hin zu einem plötzlichen Einsetzen klinischer Symptomatik und dem Tod der Vögel (Phalen, 1986; Rich, 1992; Gregory *et al.*, 1994; De Kloet & Dorrestein, 2009; Gancz *et al.*, 2010; Kistler *et al.*, 2010; Heffels-Redmann *et al.*, 2011). Der klinische Verlauf von der in der vorliegenden Studie experimentell induzierten Krankheit ist daher sehr gut vergleichbar mit natürlichen Infektionen: Fünf unserer Versuchstiere erkrankten sehr bald nach der Infektion schwer. Drei Papageien (P7, P8 und P9) starben oder wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen sechs bzw. neun Wochen nach der Infektion euthanasiert. Zwei andere Papageien (P10 und P12), die ebenfalls erkrankten, erholten sich beinahe vollständig wieder. Der sechste Papagei (P11) hingegen zeigte während des gesamten Untersuchungszeitraumes nur leichte Symptome. Insgesamt stand bei allen erkrankten Tieren vor allem das neurologische Krankheitsbild im Vordergrund. Aufgrund des pelletierten Futters konnte das häufige PDD-Merkmal „unverdaute Körner im Kot“ nicht dargestellt werden. Diese Fütterungsweise wurde auch schon von anderen Autoren empfohlen, um den Tieren die Verdauung zu erleichtern (Gregory *et al.*, 2000; Clubb & Meyer, 2006).

In diesem Versuch wurde eine 100%-ige Infektionsrate (6/6 Tieren) erreicht und die große Spannbreite von klinischer Symptomatik und Krankheitsverläufen spiegelt somit sehr gut die Variation wider, die bei natürlich infizierten Tieren beobachtet wird. Dies stützt die Auffassung, dass auch die Ergebnisse der labordiagnostischen Tests, also der Blutuntersuchungen, die bei diesem Experiment gewonnen wurden, auf natürliche Bedingungen übertragbar sind. Zudem wurden ähnliche Veränderungen in der Proteinelektrophorese auch bei natürlich infizierten Papageien beobachtet (R. Richter, persönliche Mitteilung).

Bis jetzt gab es noch keine Veröffentlichung über den Nachweis hämatologischer Veränderungen im Zusammenhang mit einer experimentellen Bornavirusinfektion bei Vögeln oder bei einem größeren Patientengut natürlich infizierter Tiere. Bisherige Berichte über veränderte Blutparameter basieren ausschließlich auf einzelnen Fallbeobachtungen von natürlich infizierten Vögeln, die Aussagen

stimmen nur partiell mit den hier erzielten Ergebnissen überein. Dies liegt sicher darin begründet, dass die Vorgeschichte der Patienten bei den Fallberichten unbekannt ist und das Vorliegen weiterer Erkrankungen teilweise unbekannt, in einigen Fällen jedoch auch nachgewiesen war.

In der vorliegenden Studie wurden zur Beurteilung von Blutwerten individual- und populationsspezifische Referenzwerte verwendet. Da die Graupapageien bereits über einen langen Zeitraum vor der experimentellen Infektion gehalten wurden, war es möglich, für jeden Papagei einzeln und für die Gruppe als Ganzes individuelle Referenzbereiche für einzelne Blutparametern zu etablieren. Dies erlaubte eine sehr präzise und individualisierte Beurteilung selbst von kleineren Veränderungen (Scope *et al.*, 2002; 2005, 2006). Auf diese Weise wurde bei den Papageien P10 und P11 zeitweise ein erniedrigter Hämatokrit festgestellt, wie er auch bei verschiedenen Fällen von natürlicher Bornavirus-Infektion beschrieben wurde (Ridgway & Gallerstein, 1983; Joyner *et al.*, 1989; Degernes *et al.*, 1991). Als eine mögliche Erklärung für eine nichtregenerative Anämie bei Papageien, die an PDD erkrankt sind, wird eine gastrointestinale Malabsorption aufgeführt, wie sie generell bei stark hungernden Vögeln vorkommt (Suedmeyer, 1992; Gancz *et al.*, 2010).

Während des Jahres vor der Infektion wiesen alle sechs Versuchstiere gelegentlich erhöhte Leukozytenzahlen auf. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Bornavirusinfektion und einer ab und zu auftretenden Abweichung der Leukozytenzahlen von den Referenzbereichen kann daher nur schwierig begründet werden. Im wissenschaftlichen Schrifttum wurde über gelegentlich erhöhte Leukozytenzahlen bei an PDD erkrankten Vögeln berichtet, oft in Kombination mit Heterophilie (Rich, 1992; Suedmeyer, 1992; Bond *et al.*, 1993; Gancz *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2010). Allerdings wurde auch hier schon die Meinung vertreten, dass die Leukozytose und Heterophilie als unregelmäßig vorkommende Veränderungen anzusehen sind, bedingt durch Stress oder Sekundärinfektionen (Gancz *et al.*, 2010). Da die meisten bisher beschriebenen Fälle natürlich infizierte Tiere betreffen, die nicht unter speziellen hygienischen Bedingungen gehalten wurden, sind zusätzliche Infektionen mit anderen Keimen denkbar und sogar wahrscheinlich und können zu veränderten Leukozytenzahlen geführt haben. Opportunistische Infektionen mit Pilzen oder Bakterien scheinen bei natürlich mit Bornaviren infizierten Vögeln regelmäßig vorzukommen



(Phalen, 1986; Degernes *et al.*, 1991; Lutz & Wilson, 1991; Rich, 1992) und erschweren die Interpretation von Laborergebnissen (Gregory *et al.*, 1994).

Die Untersuchungen der klinischen Chemie ergaben Abweichungen von den zuvor erstellten Referenzbereichen bei folgenden Parametern: AST, CK, Totalprotein, Harnsäure und Glucose. Mit Ausnahme der Proteinveränderungen sind diese Auffälligkeiten allerdings nicht zwangsläufig durch die Infektion mit Bornaviren oder die daraus entstandene Krankheit bedingt.

Chronologisch gesehen fiel der Anstieg der Enzyme AST und CK zum Teil in den Zeitraum der klinischen Krankheitsphase, besonders beobachtet bei den Papageien P8 und P12. Eine leichte bis mittelstarke Erhöhung der Enzyme mit Muskelursprung, wie LDG, CK und AST, im Zusammenhang mit einer Bornavirusinfektion oder PDD bei Papageien wurde bereits in Fallberichten beschrieben (Gancz *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2010). Es gab sogar die Vermutung, dass die CK als diagnostischer Indikator angesehen werden könne. Wenn gleich nicht spezifisch, könnten erhöhte Plasma-CK-Werte einen Hinweis für die aufkeimende Krankheit darstellen (Jenkins, 1991). Darüber hinaus können erhöhte AST- und CK-Werte aber auch im Zusammenhang mit einem gesteigerten Stresslevel vorkommen, bedingt durch einen aufgeregten Patienten beim Einfangen und Handling. Weitere mögliche Ursachen sind Muskelschädigungen oder Traumata, ggf. auch durch Selbstverstümmelung oder Federrupfen und ein durch die Krankheit verursachter Hungerzustand (Fudge, 2000). Die Erhöhung des Totalproteins bei Papagei P11 lässt sich mit einem Anstieg der Immunglobuline infolge der Infektion erklären. Außerdem wurde von uns, jeweils einmalig, Hyperglykämie bei Papagei P11 und erhöhte Harnsäure-Level bei Papagei P10 beobachtet. Beide Veränderungen sind bisher nicht in der Literatur über PDD oder Bornaviren bei Papageien beschrieben worden. Glukosewerte bis 600 mg/dl sind meistens als eine Folge von Stress anzusehen (Fudge, 1997). Geringgradige Anstiege in der Harnsäure-Konzentration, wie bei P10, werden häufig im Zusammenhang mit Dehydratation beobachtet (Fudge, 1997).

Des Weiteren sind noch einige andere Veränderungen im Blut von PDD-verdächtigen Vögeln beschrieben worden, die aber nicht regelmäßig aufzutreten scheinen und von uns nicht beobachtet wurden. Hierzu gehören beispielsweise Hypoglykämie (Ridgway & Gallerstein, 1983) und erhöhte Lipase-Werte (Boutette & Taylor, 2004), welche auf einen negativen metabolischen Status des

Tieres hinweisen können. In anderen Berichten über PDD-Erkrankungen bei Papageien lagen die Ergebnisse der hämatologischen und blutchemischen Messungen allerdings häufig vollständig innerhalb der Referenzbereiche.

Für eine bessere Differenzierung des Proteinanteils und der Veränderungen im Proteingehalt des Blutes wurden Plasma-Proteinelektrophoresen durchgeführt. Auch wenn bei solchen Elektrophoresen häufig Blutserum verwendet wird, wurde in der vorliegenden Studie Plasma eingesetzt. Die Entscheidung für Blutplasma anstelle von Blutserum basierte auf verschiedenen Gründen: Zum ersten wurde in sehr vielen bisher veröffentlichten Untersuchungen über Proteinelektrophorese gerade bei Vögeln, insbesondere bei Psittaziden, Plasma verwendet (Cray *et al.*, 1995; Cray & Tatum, 1998; Ivey, 2000; Tatum *et al.*, 2000; García-Montijano *et al.*, 2002; Rosenthal *et al.*, 2005; Cray *et al.*, 2007; Cray *et al.*, 2009a; Briscoe *et al.*, 2010), sodass zahlreiche Vergleichsmöglichkeiten zur Verfügung stehen. Außerdem erschien es hilfreich, bei Vogelpatienten, wo es aufgrund des oftmals geringen Körpergewichts nicht möglich ist größere Mengen Blut zu entnehmen, ein einziges Blutröhrchen (Lithium-Heparin) zu verwenden, mit dem auch weitere Untersuchungen durchgeführt werden können. Darüber hinaus ist auch das nutzbare Volumen aus der gleichen Menge Blut für Plasma größer als für Serum. Ein Nachteil von Plasma ist hingegen die Anwesenheit des Koagulationsenzym Fibrinogen, das normalerweise in die  $\beta$ -Globulinfraktion einwandert und die Interpretation erschweren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden für jeden der sechs Versuchspapageien jeweils drei Proteinelektrophoresen zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Infektion durchgeführt, um individuelle Vergleichs- und Bezugswerte zu erhalten und um Interpretationsprobleme zu umgehen. So konnte individuell unterschieden werden, welche Erhöhungen in der  $\beta$ -Fraktion im Vergleich zu den Literaturreferenzwerten wohl auf das Vorhandensein von Fibrinogen zurückzuführen sind und welche erst nach der Infektion auftraten. Durch die Etablierung von individualspezifischen Referenzkurven konnten auch Einflüsse des verwendeten Untersuchungsgeräts, der Zusammensetzung des Gels, der Laufzeit und der verwendete Puffer auf die Ergebnisse (Cray *et al.*, 2011b) egalisiert werden. Bei einem Vergleich von drei verschiedenen gängigen Elektrophorese-Instrumenten stellte sich heraus, dass mit dem Gerät „Sebia Hydrasys“ deutlich höhere Werte in der  $\alpha$ 1-Fraktion gemessen wurden als mit den

anderen beiden Geräten („Beckman Paragon“ und „Helena“) (Cray *et al.*, 2011b). Da es sich bei dem von uns verwendeten Gerät um ein Nachfolgemodell des „Sebia Hydrasys“ handelte und wir ebenfalls vergleichsweise sehr hohe  $\alpha$ -Globulinfractionen bei allen durchgeführten Elektrophoresen erhielten (20-30% des Totalproteins bei den Messungen vor der Infektion), ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit auf technische Ursachen zurückzuführen. Bei der Analyse und dem Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Studien muss dies berücksichtigt werden.

Bei häufigen und regelmäßigen Proteinmessungen, insbesondere kurz nach der experimentellen Infektion, sollten sich, so wurde erwartet, Veränderungen der Proteinwerte durch das angeborene oder erworbene Immunsystem der Graupapageien darstellen. Bemerkenswerterweise erscheinen allerdings die ersten erkennbaren Veränderungen bei den Papageien P10, P11 und P12 nicht vor 10 Wochen p.i., also zu einer Zeit, zu der Papagei P7, P8 und P9 bereits gestorben waren. Erst 10 bzw. 14 Wochen p.i. wurden Erhöhungen in der  $\gamma$ -Globulinfraction entdeckt, also in der Fraktion, die sich hauptsächlich aus Immunglobulinen zusammensetzt. Eine akute Phase der Krankheit kurz nach der Infektion, dargestellt durch einen Anstieg der akute-Phase-Proteine in der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Fraktion, wurde nicht beobachtet. Es ist jedoch anzumerken, dass die erste Proteinelektrophorese p.i. erst 2 Wochen nach der Infektion durchgeführt wurde, sodass eventuelle akute Veränderungen in den ersten 14 Tagen nicht erfasst wurden. Allerdings erscheint dies unwahrscheinlich, da bei den ersten Messungen zwei Wochen p.i. bei keinem der sechs Versuchspapageien Auffälligkeiten und Abweichungen im Vergleich zu den Kurven von vor der Infektion zu entdecken waren. Eine Ausnahme bildet lediglich Papagei P10, bei dem erhöhte  $\beta$ -Globulin-Werte festgestellt wurden, allerdings ebenfalls nicht vor 10 Wochen p.i.. Zeitlich gesehen fällt der höchste Wert der  $\beta$ -Globuline bei diesem Vogel mit der klinisch schlechtesten Phase zusammen. Es kann daher nicht mit Sicherheit differenziert werden, ob diese Erhöhung auf einen relativ späten Anstieg von akute-Phase-Proteinen zurückzuführen ist oder ob bereits Immunglobuline gebildet wurden und diese in die  $\beta$ -Fraktion eingewandert sind. Zu bekannten positiven akute-Phase-Proteinen bei Vögeln gehören unter anderem Serum Amyloid A, Transferrin, Haptoglobin, Fibrinogen, Ceruloplasmin und saures  $\alpha$ 1-Glykoprotein (Cray *et al.*, 2011a), welche vielfältige Funktionen, unter anderem bei der

Modulierung des Immunsystems, bei Proteintransport und Gewebeschutz, innehaben (Cray *et al.*, 2009b). Beim Albumin, das als negatives akute-Phase-Protein beschrieben wurde (Kaneko, 1997; Cray *et al.*, 2011a), waren in diesem Versuch ebenfalls keinerlei Veränderung in den ersten Wochen nach der Infektion messbar. Erst 10 Wochen nach der Infektion konnte bei Papagei P10 eine Hypalbuminämie beobachtet werden, die auch Ausdruck in einer erniedrigten A/G-Ratio fand; das Verhältnis vom Albumin- zum Globulinanteil war also zugunsten der Globuline verschoben. Hypoproteinämie bzw. Hypalbuminämie (Ridgway & Gallerstein, 1983; Degernes *et al.*, 1991; Suedmeyer, 1992; Keller *et al.*, 2010) wurden bereits früher für Vögel, bei denen eine PDD vermutet wurde, beschrieben. Hypalbuminämie wird regelmäßig bei fortgeschrittenen Fällen und schwerer Erkrankung nachgewiesen (Boutette & Taylor, 2004). Zurückzuführen sein könnte der Albuminmangel auf einen erhöhten Verlust durch die Schädigung des Magen-Darm-Traktes oder auch auf eine verminderte Synthese aufgrund von einer mangelnden Proteinaufnahme aus der Nahrung oder die chronische Entzündung (Quesenberry & Moroff, 1991).

Die Ergebnisse der Proteinelektrophorese weisen also nicht auf die Existenz einer frühen Immunreaktion bei den experimentell infizierten Papageien hin. Eine nähere Differenzierung der Globulinfraktionen mittels High-Resolution-Elektrophorese oder der Immunglobuline mittels Immunelektrophorese, wie von Cray (1997) durchgeführt, könnte weitere Erkenntnisse darüber liefern, welche Proteine nach einer Bornavirusinfektion in verschiedenen Phasen einer Immunreaktion involviert sind.

Wenn man die Ergebnisse der Blutuntersuchungen und der Proteinelektrophoresen mit denen von ELISA, rRT-PCR und dem klinischen Status vergleicht, wird Folgendes deutlich: Papagei P7 und P8 wurden sehr bald krank und verstarben kurz darauf, bzw. wurden euthanasiert. Bis zu ihrem Tod zeigten sie keine deutlichen Auffälligkeiten in den Blutuntersuchungen, der Proteinelektrophorese, der rRT-PCR von Choanentupfer, Kloakentupfer und Buffycoat, allerdings einen leicht erhöhten, aber definitiv positiven Antikörpertiter im ELISA. Papagei P9 erkrankte und starb ebenfalls bald nach der Infektion, zeigte aber keine besonderen Auffälligkeiten in einer der Laboruntersuchungen. Es wurde allerdings postmortal Virus-RNA im Gehirn nachgewiesen. Der Tod trat bei diesen Tieren also vor möglichen signifikanten

Veränderungen ein, wie sie für die Papageien P10, P11 und P12 festgestellt wurden. Die Papageien P10 und P12 wiesen sehr ähnliche und parallele Verläufe auf. Sie erkrankten ebenfalls kurz nach der Infektion und hatten während dieser frühen Krankheitsphase ähnliche Antikörpertiter wie die Papageien P7 und P8. Im Gegensatz zu P7 und P8 verbesserte sich ihre klinische Situation jedoch zeitgleich mit einem starken Anstieg der  $\gamma$ -Globuline und der bornaviruspezifischen Antikörper im ELISA. Papagei P11 stellte eine Ausnahme in der Gruppe der Versuchspapageien dar, zeigte er doch als einziger während des kompletten Untersuchungszeitraumes nur leichte klinische Symptome. Zusätzlich wies er aber bereits 10 Wochen p.i. stark positive Antikörpertiter auf. Ein deutlicher Anstieg der  $\gamma$ -Globuline in der Proteinelektrophorese, der auf eine erhöhte Bildung von Immunglobulinen zurückzuführen ist, wurde 14 Wochen p.i. gemessen. Nachweisbare Virusausscheidung, gemessen an den ersten positiven Ergebnissen in der rRT-PCR bei Papagei P11 und P12, traten erst später auf, also zu einem Zeitpunkt, als P12 sich bereits von der schwerwiegendsten klinischen Erkrankung erholte und auch die Maxima der Antikörpertiter und  $\gamma$ -Globulin-Konzentrationen überschritten waren. Während sich die  $\gamma$ -Globuline bei allen drei Papageien (P10, P11 und P12) bis 42 Wochen p.i. komplett normalisiert hatten, sanken die Antikörpertiter im ELISA zwar ebenfalls, blieben aber trotzdem deutlich positiv und somit nachweisbar. Bei der Virusausscheidung, also bei den Ergebnissen aus der rRT-PCR, konnte ein solcher Verlauf nicht festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausscheiden von Virus-RNA und den anderen Parametern (Klinik, Antikörpertiter, Blutzellen und klinischer Chemie einschließlich Plasmaproteine) konnte damit nicht ermittelt werden.

Unsere Beobachtungen über den zeitlichen Verlauf der Antikörperentwicklung in Zusammenhang mit dem Auftreten klinischer Erkrankung stimmen nicht mit der Auffassung überein, dass humorale Antikörper nicht vor Krankheit schützen, und dass Vögel mit einem hohen Antikörpertiter (und hoher Virusmenge in Kropf und Kloake) das größte Risiko einer PDD-Erkrankung besäßen (Villanueva *et al.*, 2010; Heffels-Redmann *et al.*, 2012). Die gerade genannte Auffassung wird allerdings auch nicht von den zahlreichen Berichten über den Nachweis von anti-Bornavirus-Antikörpern bei natürlich infizierten klinisch gesunden Tieren gestützt (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Hoppes *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010; Heffels-Redmann *et al.*, 2012; Piepenbring *et al.*, 2012).

Bei natürlich infizierten Papageien wurden in der Vergangenheit starke Variationen in klinischen Verläufen, Antikörperspiegeln und RNA-Ausscheidung dokumentiert. So wurden in einer Verlaufsstudie 63 Papageienvögel an drei verschiedenen Zeitpunkten in Intervallen von zwei bis sechs Monaten untersucht und dabei jeweils die Parameter Bornavirus-RNA mittels RT-Realtime-PCR, Anti-Bornavirus-Antikörper mittels indirektem Immunfluoreszenztest, pathologische Veränderungen und klinische Krankheitszeichen überprüft. In der Gruppe von den sechs Tieren, die im Laufe der Studie verstarben, wurden lediglich bei fünf Tieren Antikörper nachgewiesen, die in drei Fällen sehr hoch (Titer zwischen 1:10.240 und 1:20.480) und bei den anderen beiden Vögeln deutlich niedriger waren (1:160 und 1:320). Bei 26 klinisch gesunden Tieren wurde bei wenigstens einer Messung ein positiver Antikörpertiter festgestellt. Sechs dieser subklinisch infizierten Tiere zeigten sehr hohe Antikörpertiter (zwischen 1:10.240 und 1:40.960) und zusätzlich hohe Mengen an Bornavirus-RNA in Kropf- und Kloakenabstrichen. Bei 13 der subklinisch infizierten Tieren wurden nur Antikörper nachgewiesen (Heffels-Redmann *et al.*, 2012). In dieser Studie gab es einige Vögel, bei denen eine intermittierende Ausscheidung von Virus-RNA festgestellt wurde und Vögel, bei denen nicht bei jeder Messung Antikörper nachzuweisen waren. Daher empfehlen die Autoren wiederholte Messungen, bevor ein zugekauftes Tier als nicht infiziert erklärt und aus einer Quarantäne in einen Bestand integriert werden kann. Es konnten in dieser Studie keine definitiven Faktoren ermittelt werden, die die unterschiedlichen Infektionsverläufe erklären (Heffels-Redmann *et al.*, 2012).

In einem Infektionsversuch mit Nymphensittichen (Piepenbring *et al.*, 2012) wurden 18 Vögel intracerebral oder intravenös mit Bornaviren infiziert und über 33 Wochen Serokonversion, Anwesenheit von Virus-RNA und von infektiösem Virus, histopathologische Veränderungen und klinische Erkrankungen dokumentiert. Dabei ergab sich, dass Antikörper keinen Einfluss auf den Krankheitsausbruch hatten und dass daher der Nachweis von Antikörpern keine antivirale Immunität impliziert. Fünf Tiere entwickelten zentralnervöse und/oder gastrointestinale Symptome, zwei weitere starben plötzlich ohne vorherige Anzeichen von PDD. Zum Todeszeitpunkt hatten alle sieben Tiere hohe Antikörpertiter. Aber auch die anderen 11 Vögel entwickelten zum Teil sehr hohe Antikörpertiter. Die Diskrepanzen zwischen Infektionsstatus und dem Auftreten

von klinischen Anzeichen wurde durch Wirtsfaktoren, wie Alter, Immunstatus und genetischer Variabilität erklärt (Piepenbring *et al.*, 2012).

Die Auffassung, dass das Vorliegen von Antikörpern eine neue Infektion mit aviären Bornaviren nicht verhindert, wird auch durch zwei Studien gestützt. In beiden Experimenten wurden auf natürliche Weise subklinisch mit PaBV-4 infizierte Nymphensittiche experimentell mit aviären Bornaviren infiziert. In der Arbeit von Payne *et al.* (2011b) wurde vier Tiere mit einem genetisch anderen PaBV-4-Stamm infiziert. Zwischen Tag 92 und 110 nach der Infektion starben die Vögel oder wurden euthanasiert. Die pathologische Untersuchung ergab eine leichte Vergrößerung des Drüsenmagens. In der histologischen Untersuchung wurden schwere und weit verstreute Gewebeläsionen in zahlreichen Organen gefunden. Es wurden zwei Theorien bezüglich dieser ungewöhnlich schweren Veränderungen aufgestellt. Die Erste war, dass sich in den vorliegenden Fällen im Laufe der verlängerten Überlebenszeit stärkere mikroskopische Läsionen entwickeln konnten als üblich, eine Theorie, die bereits von Gancz *et al.* (2009) vertreten wurde. Die zweite Theorie besagte, dass die Entwicklung vermehrter Läsionen eine Folge einer Typ-4-Hypersensitivitätsreaktion war, die sich infolge einer vorherigen Sensibilisierung mit der initialen, natürlichen Bornavirus-Infektion ausbildete. Es wurde gefolgert, dass Vögel, die Bornavirus-Träger sind, nicht völlig immun gegen eine Superinfektion mit einem anderen Stamm des gleichen Genotyps sind, eine verhältnismäßig lange Zeit (über 92 Tage) bis zum Ausbruch der Krankheit und dem Tod der Tiere aber möglicherweise eine gewisse Resistenz widerspiegeln könnte (Payne *et al.*, 2011b).

Mögliche Gründe für den beobachteten fehlenden vollständigen Schutz vor Erkrankung und Infektion könnten in den Unterschieden zwischen den Stämmen liegen, oder im grundsätzlichen Versagen von natürlich infizierten Vögeln, eine schützende Immunantwort gegen aviäre Bornaviren zu entwickeln (Payne *et al.*, 2011b). Es wurde dabei jedoch nicht beschrieben, ob bereits vor der experimentellen Infektion Antikörper gegen die natürlich vorkommenden PaBV-4-Viren vorhanden waren und wie sich diese gegebenenfalls nach der Infektion entwickelten. Möglicherweise wurde die verhältnismäßig lange Überlebenszeit nach der Infektion mit PaBV-4 im Experiment von Payne *et al.* (2011b) durch eine partielle Immunität gegen diesen Genotyp verursacht (Mirhosseini *et al.*, 2011). In einer weiteren Studie, in der zwei adulte Nymphensittiche des gleichen

Bestandes mit Vorkommen einer natürlichen Infektion mit PaBV-4 experimentell mit PaBV-2 infiziert wurden, traten bereits zwischen Tag 36 und Tag 45 p.i. schwere klinische Symptome auf, die beiden Vögel zeigten also nicht die geringsten Anzeichen einer schützenden Immunität (Mirhosseini *et al.*, 2011).

Die Rolle von Antikörpern im Infektionsverlauf ist demnach unklar, und es existieren unterschiedliche Auffassungen. Nach Untersuchung von 117 Seren von Papageienvögeln auf Bornavirus-Antikörper und Vergleich mit klinischen Erscheinungen vermuteten Villanueva *et al.* (2010), dass die Bildung von Antikörpern in positivem Zusammenhang mit der Entwicklung einer klinischen PDD steht. Allerdings wurden in der Studie von Villanueva *et al.* (2010) auch bei 14 klinisch unauffälligen Vögeln nachweisbare Antikörpertiter dokumentiert. So bleibt es unklar, ob seropositive Vögel zwangsläufig eine klinische PDD entwickeln (Villanueva *et al.*, 2010). Auch andere Studien belegen, dass anhand des Vorkommens von Antikörpern nicht zwischen klinisch gesunden und asymptomatischen Vögeln unterschieden werden kann und dass Antikörper auch bei gesunden Vögeln nachweisbar sind (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Hoppes *et al.*, 2010).

Die hier genannten Publikationen sprechen also ebenfalls gegen die Theorie, dass Antikörper für die Entwicklung klinischer Symptome verantwortlich sind.

Ob auf die Pathogenese der PDD bei Papageienvögeln Kenntnisse über die Borna'sche Krankheit übertragbar sind, ist noch unklar. Diese Erkrankung tritt bei Pferd, Schaf und unter Umständen auch noch bei anderen Säugetieren auf und wird durch das Borna Disease Virus verursacht, ein mit den aviären Bornaviren relativ nahe verwandtes Virus aus der Familie der Bornaviridae. Es ist bekannt, dass es infolge von immunologischen Reaktionen zu einer Erkrankung des zentralen Nervensystems mit Enzephalomyelitis kommen kann. BoDV besitzt wie die aviären Bornaviren keine Zytotoxizität. Vermutlich sind aber infiltrierende mononukleäre Immunzellen, die im ZNS von infizierten Tieren vorkommen, an der Pathogenese beteiligt (Stitz *et al.*, 2002). CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommt hierbei eine wesentliche Bedeutung als zelluläre Mediatoren der Erkrankung zu (Hausmann *et al.*, 2004; Engelhardt *et al.*, 2005). Die eigentliche Aufgabe dieser CD8 T-Zellen ist die Verhinderung der Virusausbreitung durch das Abtöten infizierter Zellen. Sind aber bereits zu viele Gehirnzellen infiziert, können sie eine schwere Meningoenzephalitis verursachen (Staeheli *et al.*, 2010).



Im Infektionsversuch mit adulten, immunkompetenten Ratten konnten zwei Krankheitsphasen identifiziert werden. Zunächst kommt es bereits wenige Tage nach Infektion zu einer akuten Erkrankung (hyperaktiv-aggressive Phase), die einige Wochen anhält und anschließend in eine chronisch-apathische Phase übergeht (Narayan *et al.*, 1983). Die akute Phase, in welcher auch der Erkrankungshöhepunkt liegt, zeichnet sich durch ein Ansteigen der neurotoxischen Zytokine IL-1 und TNF $\alpha$  aus, welche in der chronischen Phase wieder absinken. Dafür kommt es nun zu einem Anstieg von IFN $\gamma$ , das durch Zellschutzmechanismen zu einer Symptommilderung führt (Shankar *et al.*, 1992). Auch histologisch unterscheiden sich die beiden Phasen durch einen Rückgang der infiltrierenden Entzündungszellen in der chronischen im Vergleich zur akuten Phase (Hatalski *et al.*, 1998a). Dieses Geschehen spiegelt sich auch bei der Virusverteilung im Körper wider. Während in der akuten Phase bei immunkompetenten Ratten das BoD-Virus nur in neuronalen Geweben vorhanden zu sein scheint, findet es sich in der chronischen Phase auch in vielen nicht-neuronalen Geweben (Shankar *et al.*, 1992). Auffällig ist, dass neonatale und immunsupprimierte Ratten offenbar nicht erkranken (Narayan *et al.*, 1983). Bei immunsupprimierten Tieren ist zudem kein strikter Neurotropismus der Viren zu erkennen (Stitz *et al.*, 1991).

Die humorale Immunantwort und ihre Rolle bei der Pathogenese ist auch für die Borna'sche Krankheit noch nicht vollständig geklärt. Antikörper gegen die Antigene N und P werden während der akuten Phase gebildet, während neutralisierende Antikörper gegen das M- und das G-Protein in der chronischen Phase zu finden sind (Hatalski *et al.*, 1995; Furrer *et al.*, 2001a).

Bei experimentell mit BoDV infizierten Ratten entstand nach Langzeitinfektion eine T-Zell-mediierte immunpathologische Reaktion im Gehirn, die zu neurologischen Ausfällen und auch zum Tode führen konnte (Stitz *et al.*, 1989). Bei Behandlung der Tiere mit dem immunsupprimierenden Medikament Cyclosporin A, und zwar schon vor der Infektion beginnend und durchgehend bis vier Wochen nach der Infektion andauernd, konnte das klinische Bild der Borna'schen Krankheit verhindert werden. Bei kürzerer Behandlung oder bei ihrem Beginn erst nach der Infektion wurde dies nicht erreicht, es kam trotzdem zu Hirnläsionen und dem Ausbruch der Borna'schen Krankheit. Da bei den Ratten die Behandlung mit Cyclosporin A in jedem Fall die Synthese von

virusspezifischen Antikörpern verhinderte, unabhängig davon, ob ein Auftreten von BoD verhindert wurde oder nicht, wurde gefolgert, dass Antikörper in der Pathogenese von BoD nicht involviert sind (Stitz *et al.*, 1989). Es gibt jedoch auch Berichte über das Auftreten neutralisierender Antikörper nach einer BoDV-Infektion (Hatalski *et al.*, 1995; Oldach *et al.*, 1995; Stitz *et al.*, 1998; Furrer *et al.*, 2001a). Bei experimentellen Infektionen von Ratten wurde ein Einfluss der Infektionsdosis auf den Krankheitsverlauf festgestellt. Tiere, die mit einer niedrigen Dosis infiziert wurden ( $10^2$ - $10^4$  TCID<sub>50</sub>), entwickelten die typische Krankheit mit schwerer Enzephalitis. Im Gegensatz dazu resultierte eine Infektion mit hoher Dosis ( $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub>) nur in milder Enzephalitis, der Bildung von hohen Anti-BoDV-Antikörpertitern und in einem Schutz gegen die Infektion (Oldach *et al.*, 1995). Ein immunpathologisch bedingter Ausbruch der Krankheit oder der Schutz vor dieser ist also offenbar abhängig von der eingesetzten Menge an Infektionsvirus. Eine hohe Dosis BoDV ( $10^6$  ffu) ruft eine frühe virusspezifische Reaktion des Immunsystems hervor, wie durch eine starke zelluläre und humorale Antwort demonstriert wird. Die Immunreaktivität, besonders die der zytotoxischen T-Zellen, bestimmt, ob das Virus kontrolliert werden und so die Krankheit verhindert werden kann, oder ob es zu einer persistierenden Infektion kommt. Es wurden keine Hinweise darauf gefunden, dass Antikörper zu neuropathologischen Auffälligkeiten führen, obwohl neutralisierende Antikörper offensichtlich den Tropismus des Virus kontrollieren und die Ausbreitung des Virus von der peripheren Infektionsstelle zum zentralen Nervensystem verhindern können (Hatalski *et al.*, 1998b; Stitz *et al.*, 1998; Furrer *et al.*, 2001b; Furrer *et al.*, 2001a).

Bei mit BoDV infizierten Ratten wurde im Übergang von der akuten (5 Wochen p.i.) zur chronischen (15 Wochen p.i.) Phase der Krankheit ein dramatischer Anstieg neutralisierender Aktivität im Serum beobachtet. Dies wurde, zumindest zum Teil, dadurch bedingt, dass die Antikörper mit dem BoDV-Glykoprotein gp18 reagierten (Hatalski *et al.*, 1995). Ob neutralisierende Antikörper Schutz vor der Borna'schen Krankheit bewirken können, ist noch unklar. Hier kommt es nämlich auch vor, dass größere Mengen Virus im ZNS gefunden werden, obwohl neutralisierende Antikörper im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit vorhanden sind (Hatalski *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ergaben in-vitro Studien, dass möglicherweise eine Modulation der viralen Genexpression durch

---

virusspezifische Antikörper im ZNS stattfinden könnte (Hatalski *et al.*, 1998b). Und auch bei experimentell infizierten immun-inkompetenten Ratten bewirkte eine passive Immunisierung in Form von neutralisierenden Antikörpern eine Verhinderung der Virusausbreitung auf nicht-neuronales Gewebe. Die Rolle der humoralen Immunantwort und ihre Bedeutung für die Pathogenese von BoD bleibt also weiter abzuklären (Hatalski *et al.*, 1998b).

Ob oder bis zu welchem Ausmaß die Erkenntnisse aus der BoDV-Forschung auf die bei Papageien vorkommenden Bornaviren übertragen werden können, muss sich noch zeigen. Die Rolle von T- und B-Zellen in der Pathogenese einer Bornavirusinfektion beim Vogel ist derzeit noch unbekannt. Es ist aber offensichtlich, dass eine große Anzahl an gesund erscheinenden Vögeln seropositiv ist. Dies können Tiere sein, bei denen die Krankheit in der Zukunft noch ausbrechen wird oder genesene Tiere mit Immunität (Villanueva *et al.*, 2010). Weitere Forschung sollte dazu beitragen herauszufinden, ob eine passive Verabreichung von spezifischen Antikörpern die Pathogenese oder das Entstehen von klinischen Symptomen infolge einer Infektion mit Bornaviren beeinflussen kann.



## V. ZUSAMMENFASSUNG

### **Hämatologische, blutchemische und proteinelektrophoretische Veränderungen bei Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) nach experimenteller Infektion mit Parrot Bornavirus 4**

Im Jahr 2008 wurden Bornaviren als ursächliche Erreger der neuropathischen Drüsenmagendilatation (Proventricular Dilatation Disease, PDD) identifiziert, der wohl häufigsten Magen-Darm-Erkrankung bei Papageien mit meist letalem Ausgang. Trotz umfangreicher Forschung in den letzten Jahren ist die Pathogenese der PDD immer noch nicht vollständig geklärt. Standardisierte Untersuchungen über spezifische Veränderungen hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter sowie der Plasmaproteine fehlen noch vollständig.

Um erste Informationen bezüglich des Vorkommens von Blutwert- und Plasmaproteinveränderungen, auch im zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten von klinischer Symptomatik, Serokonversion und Ausscheiden viraler RNA zu erhalten, wurden sechs Kongo-Graupapageien (P7-P12) subkutan mit isolierten und aufgereinigten Bornaviren, und zwar mit Parrot Bornavirus 4 (PaBV-4), infiziert. Bereits ein Jahr vor der experimentellen Infektion wurden die klinisch gesunden Tiere in einer isolierten Innenvoliere unter hohen Biosicherheitsstandards gehalten und andere Infektionskrankheiten mittels gängiger Testverfahren ausgeschlossen. In diesen 12 Monaten wurde bei allen Papageien in vierwöchigen Intervallen ein Blutbild erstellt und eine blutchemische Untersuchung (Vetscan<sup>®</sup>) durchgeführt, um individual- und populationsspezifische Referenzbereiche zu erhalten und um spätere Abweichungen auf ihrer Signifikanz zu prüfen. Zum Gewinnen von Plasmaprotein-Normwerten wurden außerdem für jedes Tier dreimal vor der Infektion Proteinelektrophoresen angefertigt. Während eines zwölfmonatigen Beobachtungszeitraumes post infectionem wurde täglich der Gesundheitszustand der Versuchstiere und einmal wöchentlich das Körpergewicht kontrolliert. Blutbild und Blutchemie wurden weiterhin alle vier Wochen erfasst, Proteinelektrophoresen wurden ebenfalls in etwa vierwöchigen Intervallen durchgeführt. Das Ausscheiden von Virus-RNA wurde im zweiwöchigen Abstand mittels rRT-PCR Untersuchungen von Choanen- und Kloakentupfern überprüft.

ELISA-Untersuchungen zum Nachweis von anti-Bornavirus-Antikörpern wurden zehn Monate lang ebenfalls alle zwei Wochen durchgeführt, danach dann alle vier Wochen.

Drei Vögel (P7-P9) entwickelten bereits wenige Wochen nach der Infektion Krankheitssymptome, wie aufgeplustertes Gefieder, Zittern, Koordinations- und Orientierungsschwierigkeiten und magerten schließlich ab. Sie starben oder wurden aus Tierschutzgründen sechs bzw. neun Wochen p.i. eingeschläfert. Bis zu diesem Zeitpunkt ergaben sich bei keinem der drei Tiere Veränderungen im Blutbild, der Proteinelektrophorese und der rRT-PCR. Bei zwei Papageien wurden PaBV-spezifische Antikörper in niedriger Konzentration (P7 und P8) und bei einem Vogel (P8) erhöhte AST- und CK-Werte gemessen. In der pathologischen Untersuchung wurde bei allen drei Vögeln ein erweiterter Drüsenmagen mit dünner Wand gefunden und die erfolgreiche Infektion durch den Nachweis von RNA des Infektionsvirus im Gehirn bestätigt.

Zwei weitere Papageien (P10 und P12) erkrankten ebenfalls schwer, mit den gleichen Symptomen wie beschrieben für P7-P9, ihr klinischer Zustand verbesserte sich allerdings wieder und zwar nahezu zeitgleich mit einem markanten Anstieg der Antikörpertiter und einer Erhöhung der  $\gamma$ -Globulinfraktion. Der sechste Papagei (P11) zeigte im gesamten Beobachtungszeitraum nur leichte, unspezifische Symptome. Er wies bereits zehn Wochen p.i. einen sehr hohen Antikörpertiter auf, der auch in der Folgezeit über denen der anderen Tiere lag. Konsistente hämatologische Veränderungen wurden nicht festgestellt. Die klinisch-chemischen Untersuchungen ergaben Abweichungen bei den Parametern AST, CK, Totalprotein, Glucose und Harnsäure.

Veränderungen in der Proteinelektrophorese, die in der vorliegenden Studie erstmals ermittelt wurden, umfassten einen deutlichen Anstieg der  $\beta$ -Globulinfraktion bei P10 zehn Wochen p.i., in etwa zeitgleich mit seinem kritischsten klinischen Gesundheitsstatus. In den darauffolgenden Wochen wurden erhöhte  $\gamma$ -Globulinwerte bei P10, P11 und P12 festgestellt, die erst anstiegen und bis zur 34. Woche p.i. wieder abfielen. Die Albuminfraktion und dementsprechend die A/G-Ratio waren im gleichen Zeitraum mitunter vermindert.

Hinweise auf eine akute-Phase-Reaktion in den Anfangsstadien der Infektion, gemessen an erhöhten  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Globulinkonzentrationen, wurden bei keinem Papagei festgestellt.

Spezifische Antikörper gegen aviäre Bornaviren stiegen bei P10, P11 und P12 zunächst stark an mit Höchstwerten zwischen 20 und 24 Wochen p.i., danach kam es zu einem Rückgang, insgesamt blieben die Titer aber auf einem hohen Niveau. Bei den Papageien P11 und P12 konnte außerdem ab 12 Wochen p.i. eine Virusausscheidung mittels rRT-PCR nachgewiesen werden, ein zeitlicher Zusammenhang mit dem Verlauf anderer Messwerte oder mit dem Auftreten klinischer Erscheinungen wurde aber nicht festgestellt.

In dieser Studie wurde im Rahmen der experimentellen Infektion eine große Variationsbreite an klinischen Symptomen bis hin zu einem klinisch nahezu inapparenten Verlauf beobachtet, die die Situation bei natürlichen Infektionen gut widerspiegelte. Erstmals wurden deutliche Veränderungen im Blut-Proteinmuster nachgewiesen. Die Vermutung, dass Antikörper aufgrund immunpathologischer Prozesse an der Krankheitsentstehung beteiligt sind und hohe Antikörperkonzentrationen also mit schweren Krankheitserscheinungen korrelieren, kann mit dieser Arbeit nicht unterstützt werden. Es bleibt im Gegenteil künftig zu untersuchen, ob eine passive Verabreichung spezifischer Antikörper nicht sogar die Pathogenese oder das klinische Erscheinungsbild einer Bornavirusinfektion positiv beeinflussen könnte.





## VI. SUMMARY

### **Haematologic, blood chemistry and protein electrophoretic changes in African grey parrots (*Psittacus erithacus*) experimentally infected with parrot bornavirus 4**

**Charlotte Högemann**

In 2008, bornaviruses were identified as the causal pathogen of proventricular dilatation disease (PDD) which is regarded as the most common gastrointestinal disease in parrots, often with a lethal outcome. Despite extensive research in the last years, the pathogenesis of PDD is still not fully elucidated. Standardized examinations on specific changes of haematologic or blood chemistry parameters and of plasma proteins are completely lacking so far.

In order to obtain information on the occurrence of possible changes in blood values and plasma proteins, also seen in temporal coincidence with the onset of clinical symptomatology, seroconversion and shedding of viral RNA, six African grey parrots (P7-P12) were subcutaneously infected with isolated and purified bornavirus (PaBV-4). Already one year before experimental infection, the animals had been kept in an isolated indoor aviary under high biosecurity standards. Other infectious diseases were excluded by common assay methods. During these 12 months blood count and blood chemistry (Vetscan<sup>®</sup>) analyses were performed in four weekly intervals in all parrots to obtain individual- and population-based reference ranges. Additionally, normal blood protein values were obtained by electrophoresis for each animal by testing three times before infection. During an observation period of 12 months p.i., the health status of the experimental animals was controlled daily and the body weight once a week. Blood cell count and blood chemistry analyses were performed every four weeks, the number of protein electrophoresis examinations varied between 3 and 10 per parrot, depending on the length of survival. Choanal and cloacal swabs were investigated biweekly for viral RNA by rRT-PCR and ELISA examinations for the detection of anti-bornavirus-antibodies were performed biweekly for a duration of 10 months and every four weeks afterwards.

Three birds (P7-P9) developed clinical signs a few weeks after infection already,

like fluffing, trembling, incoordination and orientation problems, and finally emaciation. They died or were euthanized due to animal welfare reasons 6 and 9 weeks p.i., respectively. Until this point of time there were no changes in blood count, protein electrophoresis or rRT-PCR in any of the three animals. Nevertheless, there were slightly increased antibody titres in two parrots (P7 and P8) and elevated AST- and CK-values in one parrot (P8). The post mortem examination revealed a dilated proventriculus with a thinned wall in all three birds, and successful infection was confirmed by the detection of RNA of the infection virus in the brains.

Two other parrots (P10 and P12) were falling ill severely with the same symptoms as described above for P7 – P9, but their clinical condition improved again, contemporaneously with a marked increase of antibody titres and an elevation of the  $\gamma$ -globulin fraction. The sixth parrot (P11) showed only slight, unspecific symptoms, but, in contrast, had a very high antibody titre already 10 weeks p.i., which also overtopped the titres of the other animals during the following observation period. Haematological changes found in parrots P10 – P12 were mainly inconsistent, in P10 and P11 only a reduced packed cell volume was obtained in some measurements. Blood chemistry revealed deviations of the parameters AST, CK, total protein, glucose and uric acid. Blood protein changes included a marked increase of the  $\beta$ -globulin fraction in parrot P10 ten weeks p.i., just about contemporaneously with its worst clinical condition. During the following weeks elevated values of the  $\gamma$ -globulins were determined for P10, P11 and P12, which were first increasing and then decreasing again until the 34<sup>th</sup> week p.i. The albumin fraction and the A/G-ratio were temporarily reduced during this time period. Evidence for an acute-phase reaction during the first stages of infection, as measured by elevated  $\alpha$ - or  $\beta$ -globulin concentrations, was not found in any of the parrots. The ELISA examinations in parrots P10–P12 revealed, like the  $\gamma$ -globulins, a marked increase of the antibody titres at first with highest values between 20 and 24 weeks p.i., afterwards there was a decline, too, but altogether the titers stayed on a high level. In parrots P11 and P12, viral RNA was detected by the rRT-PCR from 12 weeks p.i. on, but a temporal correlation with the other measurements or the clinical status was not evident.

The experimental infection performed in the investigation presented here induced a wide variation of clinical signs including almost inapparent courses as observed

---

in natural infections. Significant changes in blood protein pattern were described for the first time. The presumption that antibodies might take part in the development of clinical disease due to immuno-pathological processes is not supported by our study. In contrast, it is suggested to analyze whether passive administration of specific antibodies possibly might have a positive influence on the pathogenesis or the clinical appearance of a bornavirus infection.



## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Afonso, C. L., Amarasinghe, G. K., Banyai, K., Bao, Y., Basler, C. F., Bavari, S., Bejerman, N., Blasdell, K. R., Briand, F. X., Briese, T., Bukreyev, A., Calisher, C. H., Chandran, K., Cheng, J., Clawson, A. N., Collins, P. L., Dietzgen, R. G., Dolnik, O., Domier, L. L., Durrwald, R., Dye, J. M., Easton, A. J., Ebihara, H., Farkas, S. L., Freitas-Astua, J., Formenty, P., Fouchier, R. A., Fu, Y., Ghedin, E., Goodin, M. M., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T. H., Jiang, D., Kitajima, E. W., Kobinger, G. P., Kondo, H., Kurath, G., Lamb, R. A., Lenardon, S., Leroy, E. M., Li, C. X., Lin, X. D., Liu, L., Longdon, B., Marton, S., Maisner, A., Muhlberger, E., Netesov, S. V., Nowotny, N., Patterson, J. L., Payne, S. L., Paweska, J. T., Randall, R. E., Rima, B. K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Shi, M., Smither, S. J., Stenglein, M. D., Stone, D. M., Takada, A., Terregino, C., Tesh, R. B., Tian, J. H., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J. S., Vasilakis, N., Verbeek, M., Volchkov, V. E., Wahl-Jensen, V., Walsh, J. A., Walker, P. J., Wang, D., Wang, L. F., Wetzel, T., Whitfield, A. E., Xie, J. T., Yuen, K. Y., Zhang, Y. Z. & Kuhn, J. H. (2016). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of Virology*, 161, 2351-2360.

Alexanian, R., Weber, D. & Liu, F. (1999). Differential diagnosis of monoclonal gammopathies. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 123, 108-113.

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

Ambrosius, H. & Hadge, D. (1987). Chicken immunoglobulins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 17, 57-67.

Archer, F. J. & Battison, A. L. (1997). Differences in electrophoresis patterns between plasma albumins of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and the chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Avian Pathology*, 26, 865-870.

- Ashash, E., Malkinson, M., Meir, R., Perl, S. & Weisman, Y. (1996). Causes of losses including a Borna disease paralytic syndrome affecting young ostriches of one breeding organization over a five-year period (1989-1993). *Avian Diseases*, 40, 240-245.
- Berhane, Y., Smith, D. A., Newman, S., Taylor, M., Nagy, É., Binnington, B. & Hunter, B. (2001). Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*, 30, 563-570.
- Bizelli, C. C., Silva, A. S., da Costa, J. D., Vanstreels, R. E., Atzingen, M. V., Santoro, M. L., Fernandes, I., Catao-Dias, J. L. & Faquim-Mauro, E. L. (2015). Isolation and Characterization of IgM and IgY Antibodies from Plasma of Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Avian Diseases*, 59, 79-86.
- Black, P. A., Macek, M., Tieber, A. & Weber, M. (2013). Reference Values for Hematology, Plasma Biochemical Analysis, Plasma Protein Electrophoresis, and Aspergillus Serology in Elegant-crested Tinamou (*Eudromia elegans*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 27, 1-6.
- Bode, L., Ferszt, R. & Czech, G. (1993). Borna disease virus infection and affective disorders in man. *Archives of Virology. Supplementum*, 7, 159-167.
- Bode, L. & Ludwig, H. (2003). Borna disease virus infection, a human mental-health risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 534-545.
- Bond, M. W., Downs, D. & Wolf, S. (1993). Screening for psittacine proventricular dilatation syndrome. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 92-97). Nashville, TN.
- Bourque, L., Laniesse, D., Beaufrere, H., Pastor, A., Ojkic, D. & Smith, D. A. (2015). Identification of avian bornavirus in a Himalayan monal (*Lophophorus impejanus*) with neurological disease. *Avian Pathology*, 44, 323-327.

Boutette, J. B. & Taylor, M. (2004). Proventricular dilatation disease: A review of research, literature, species differences, diagnostics, prognosis, and treatment. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 175-181). New Orleans, LO.

Breitschwerdt, E. B., Woody, B. J., Zerbe, C. A., De Buysscher, E. V. & Barta, O. (1987). Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1, 2-9.

Briscoe, J. A., Rosenthal, K. L. & Shofer, F. S. (2010). Selected complete blood cell count and plasma protein electrophoresis parameters in pet psittacine birds evaluated for illness. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 24, 131-137.

Brüggemann, J. (2012). *Evaluierung der Wachtel als Tiermodell für Infektionen mit aviären Bornaviren und die Neuropathische Drüsenmagendilatation*. (Dissertation), München.

Cerón, J. J., Eckersall, P. D. & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 85-99.

Clark, F. D. (1984). Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. *Avian Diseases*, 28, 813-815.

Clipsham, R. (1989). Trends in Proventricular Dilatation? *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 3, 73.

Clubb, S. L. & Meyer, M. J. (2006). Clinical Management of psittacine birds affected with proventricular dilatation disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 85-90). San Antonio, TX.

Counotte, G. (2010). Electrophoretic techniques: the old and the new. *Veterinary*

---

*Clinical Pathology*, 39, 399-400.

Cray, C., Bossart, G. D. & Harris, D. (1995). Plasma protein electrophoresis: Principles and diagnosis of infectious disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 55-59). Philadelphia, PA.

Cray, C., Greiner, E. & Zielezienski, K. (1996). Serological diagnosis of Sarcocystosis. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 205-208). Tampa, FL.

Cray, C. & Harris, D. (1996). Plasma protein electrophoresis: An update. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 97-100). Tampa, FL.

Cray, C. (1997). Plasma protein electrophoresis: An update. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 209-212). Reno, NV.

Cray, C. & Tatum, L. M. (1998). Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 12, 4-10.

Cray, C., Rodriguez, M. & Zaias, J. (2007). Protein electrophoresis of psittacine plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, 36, 64-72.

Cray, C., Rodriguez, M. & Arheart, K. L. (2008). Use of refractometry for determination of psittacine plasma protein concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, 37, 438-442.

Cray, C., Reavill, D., Romagnano, A., Sant, F. V., Champagne, D., Stevenson, R., Rolfe, V., Griffin, C. & Clubb, S. (2009a). Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 23, 125-135.



Cray, C., Zaias, J. & Altmann, N. H. (2009b). Acute phase response in animals: A review. *Comparative Medicine*, 59, 517-526.

Cray, C., Dickey, M. & Rodriguez, M. (2011a). Quantitation of acute phase proteins in psittacine species. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 31-32). Seattle, WA.

Cray, C., King, E., Rodriguez, M., Decker, L. S. & Arheart, K. L. (2011b). Differences in protein fractions of avian plasma among three commercial electrophoresis systems. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 25, 102-110.

Crivellente, F., Bonato, M. & Cristofori, P. (2008). Analysis of mouse, rat, dog, marmoset, and human serum proteins by capillary electrophoresis: Comparison with agarose gel electrophoresis. *Veterinary Clinical Pathology*, 37, 73-78.

Dahlhausen, B., Aldred, S. & Colaizzi, E. (2002). Resolution of clinical proventricular dilatation disease by cyclooxygenase 2 inhibition. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 9-12). Monterey, CA.

Dahlhausen, R. D. & Orosz, S. E. (2015). Avian Bornaviral Ganglioneuritis in Clinical Practice. In *Proceedings of the ExoticsCon* (pp. 259-271). San Antonio, TX.

De Kloet, A. H., Kerski, A. & De Kloet, S. R. (2011). Diagnosis of Avian bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 421-429.

De Kloet, S. R. & Dorrestein, G. M. (2009). Presence of avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws. *Avian Diseases*, 53, 568-573.

Degernes, L. A., Flammer, K. & Fisher, P. (1991). Proventricular dilatation syndrome in a Green-winged macaw. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 45-49). Chicago, IL.

Degernes, L. A., Love, N. E. & Laughery, M. C. (1996). Review of radiographic changes associated with proventricular dilatation disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 209-211). Tampa, FL.

Degiorgis, M. P., Berg, A. L., Hard Af Segerstad, C., Morner, T., Johansson, M. & Berg, M. (2000). Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3087-3091.

Delk, K. W., Wack, R. F., Burgdorf-Moisuk, A., Kass, P. H. & Cray, C. (2015). Acute phase protein and electrophoresis protein fraction values for captive American flamingos (*Phoenicopterus ruber*) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46, 929-933.

Delnatte, P., Berkvens, C., Kummrow, M., Smith, D. A., Campbell, D., Crawshaw, G., Ojkic, D. & DeLay, J. (2011). New genotype of avian bornavirus in wild geese and trumpeter swans in Canada. *Veterinary Record*, 169, 108.

Delnatte, P., Ojkic, D., Delay, J., Campbell, D., Crawshaw, G. & Smith, D. A. (2013). Pathology and diagnosis of avian bornavirus infection in wild Canada geese (*Branta canadensis*), trumpeter swans (*Cygnus buccinator*) and mute swans (*Cygnus olor*) in Canada: a retrospective study. *Avian Pathology*, 42, 114-128.

Donatti, R. V., Resende, M., Ferreira, F. C., Marques, M. V., Ecco, R., Shivaprasad, H. L., de Resende, J. S. & Martins, N. R. (2014). Fatal proventricular dilatation disease in captive native psittacines in Brazil. *Avian Diseases*, 58, 187-193.

Doneley, R. J. T., Miller, R. I. & Fanning, T. E. (2007). Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. *Australian Veterinary*

*Journal*, 85, 119-123.

Doolen, M. (1994). Crop biopsy - A low risk diagnosis for neuropathic gastric dilatation. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 193-196). Orlando, FL.

Encinas-Nagel, N., Enderlein, D., Piepenbring, A., Herden, C., Heffels-Redmann, U., Felipe, P. A., Arns, C., Hafez, H. M. & Lierz, M. (2014). Avian bornavirus in free-ranging psittacine birds, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 2103-2106.

Engelhardt, K. R., Richter, K., Baur, K., Staeheli, P. & Hausmann, J. (2005). The functional avidity of virus-specific CD8+ T cells is down-modulated in Borna disease virus-induced immunopathology of the central nervous system. *European Journal of Immunology*, 35, 487-497.

Fischer, D., Van Waeyenberghe, L., Cray, C., Gross, M., Usleber, E., Pasmans, F., Martel, A. & Lierz, M. (2014). Comparison of diagnostic tools for the detection of aspergillosis in blood samples of experimentally infected falcons. *Avian Diseases*, 58, 587-598.

Fraser, G. G. & Harris, E. K. (1989). Generation and Application of Data on Biological Variation in Clinical Chemistry. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 27, 409-437.

Fudge, A. M. (1997). Avian Clinical Pathology - Hematology and Chemistry. In R. B. Altmann (Ed.), *Avian Medicine and Surgery* 1st edn (pp. 142-157). Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Fudge, A. M. (2000). *Laboratory Medicine - Avian and Exotic Pets*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Fujino, K., Horie, M., Honda, T., Nakamura, S., Matsumoto, Y., Francischetti, I.

M. & Tomonaga, K. (2012). Evolutionarily conserved interaction between the phosphoproteins and X proteins of bornaviruses from different vertebrate species. *PLoS ONE*, 7, e51161.

Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L. & Planz, O. (2001a). Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: Prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *Journal of Virology*, 75, 943-951.

Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L. & Planz, O. (2001b). High-dose Borna disease virus infection induces a nucleoprotein-specific cytotoxic T-lymphocyte response and prevention of immunopathology. *Journal of Virology*, 75, 11700-11708.

Gancz, A. Y., Kistler, A. L., Greninger, A. L., Farnoushi, Y., Mechani, S., Perl, S., Berkowitz, A., Perez, N., Clubb, S., DeRisi, J. L., Ganem, D. & Lublin, A. (2009). Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Virology Journal*, 6, 100.

Gancz, A. Y., Clubb, S. & Shivaprasad, H. L. (2010). Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13, 471-494.

Gancz, A. Y., Elbaz, D., Farnoushi, Y. & Lublin, A. (2012). Clinical recovery from proventricular dilatation disease following treatment with Cyclosporine-A in an African grey parrot (*Psittacus erithacus*). In *Proceedings of the 17. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten* (pp. 130-133). München.

García-Montijano, M., García, A., Lemus, J. A., Montesinos, A., Canales, R., Luaces, I. & Pereira, P. (2002). Blood chemistry, protein electrophoresis, and hematologic values of captive Spanish Imperial eagles (*Aquila adalberti*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33, 112-117.

Gaskin, J. M., Homer, B. L. & Eskelund, K. H. (1991). Preliminary Findings In

Avian Viral Serositis: A Newly Recognized Syndrome of Psittacine Birds. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 5, 27-34.

Gentry, J., Heatley, J. J. & Tizard, I. (2015). Experimental infection of Peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*) with avian bornavirus genotypes II und IV. In *Proceedings of the ExoticsCon* (p. 91). San Antonio, TX.

Gerlach, H. (1986). Update of the macaw wasting syndrome. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 21-25). Miami, FL.

Gimenez, M., Saco, Y., Pato, R., Busquets, A., Martorell, J. M. & Bassols, A. (2010). Plasma protein electrophoresis of *Trachemys scripta* and *Iguana iguana*. *Veterinary Clinical Pathology*, 39, 227-235.

Gough, R., Drury, S., Harcourt-Brown, N. & Higgins, R. (1996). Virus-like particles associated with macaw wasting disease. *Veterinary Record*, 139, 24.

Gough, R., Drury, S., Culver, F., Britton, P. & Cavanagh, D. (2006). Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazon viridigenalis* Cassin). *Avian Pathology*, 35, 122 - 126.

Graczyk, T. K. & Cranfield, M. R. (1995). Maternal transfer of anti-*Aspergillus* spp. immunoglobulins in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 31, 545-549.

Graham, D. L. (1991). "Wasting/Proventricular dilataion disease" A pathologist`s view. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 43-44). Chicago, IL.

Gray, P., Villanueva, M. S., Mirhosseini, N., Hoppes, S., Payne, S. & Tizard, I. (2009). Experimental Infection of birds with avian bornavirus. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 7).

Milwaukee, WI.

Gray, P., Hoppes, S., Suchodolski, P., Mirhosseini, N., Payne, S., Villanueva, I., Shivaprasad, H. L., Honkavuori, K. S., Lipkin, W. I., Briese, T., Reddy, S. M. & Tizard, I. (2010). Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 473-479.

Gregory, C. R., Latimer, K. S., Niagro, F. D., Branson, W. R., Campagnoli, R. P., Norton, T. M., McManamon, R. & Greenacre, C. B. (1994). A review of proventricular dilatation syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 8, 69-75.

Gregory, C. R., Latimer, K. S., Campagnoli, R. P. & Ritchie, B. W. (1996a). Histologic evaluation of the crop for diagnosis of proventricular dilatation syndrome in psittacine birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 76-80.

Gregory, C. R., Latimer, K. S., Niagro, F. D., Campagnoli, R. P., Steffens, W. L. & Ritchie, B. W. (1996b). Detection of eastern equine encephalomyelitis virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using DNA in situ hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 151-155.

Gregory, C. R., Ritchie, B. W., Latimer, K. S., Steffens, W. L., Campagnoli, R. P., Pesti, D. A. & Lukert, P. D. (1997). Proventricular dilatation disease: A viral epornitic In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*. Reno, NV.

Gregory, C. R., Ritchie, B. W., Latimer, K. S., Steffens, W. L., Pesti, D., Campagnoli, R. P. & Lukert, P. D. (2000). Progress in understanding proventricular dilatation disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 269-275). Weatherford, TX.

Grund, C., Grimm, F. & Kösters, J. (1999). Serological studies on a persistent aPMV-1 infection associated with PDD. In *Proceedings of the Annual Conference*

*of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 19-23). New Orleans, LA.

Grund, C., Werner, O., Gelderblom, H. R., Grimm, F. & Kusters, J. (2002). Avian paramyxovirus serotype 1 isolates from the spinal cord of parrots display a very low virulence. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 49, 445-451.

Grund, C., Mohn, U. & Korbel, R. (2005). Relevance of low virulent avian Paramyxovirus serotype 1 for psittacine birds. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 283-286). Monterey, CA.

Guo, J., Covalada, L., Heatley, J. J., Baroch, J. A., Tizard, I. & Payne, S. L. (2012). Widespread avian bornavirus infection in mute swans in the Northeast United States. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 3, 49-52.

Guo, J. & Tizard, I. (2015). The genome sequence of parrot bornavirus 5. *Virus Genes*, 51, 430-433.

Hadley, T. L., Head, L. L., Rotstein, D. S., Cross, C., Gompf, R. E. & Greenacre, C. (2005). Atypical presentation of proventricular dilatation disease in a yellow-headed Amazon (*Amazona ochrocephala oratrix*) parrot. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 353-355). Monterey, CA.

Halami, M. Y., Nieper, H., Müller, H. & Johne, R. (2008). Detection of a novel circovirus in Mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research*, 132, 208-212.

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

Hameed, S. S., Tizard, I. & Payne, S. (2016). The development of an effective vaccine against Proventricular dilatation disease. In *Proceedings of the ExoticsCon* (pp. 41-42). Portland OR, USA.

Harris, E. K. (1974). Effects of intra- and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. *Clinical Chemistry*, 20, 1535-1542.

Harrus, S., Waner, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H. & Bark, H. (1996). Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 66, 241-249.

Hatalski, C. G., Kliche, S., Stitz, L. & Lipkin, W. I. (1995). Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *Journal of Virology*, 69, 741-747.

Hatalski, C. G., Hickey, W. F. & Lipkin, W. I. (1998a). Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *Journal of Neuroimmunology*, 90, 137-142.

Hatalski, C. G., Hickey, W. F. & Lipkin, W. I. (1998b). Humoral immunity in the central nervous system of Lewis rats infected with Borna disease virus. *Journal of Neuroimmunology*, 90, 128-136.

Hausmann, J., Sauder, C., Wasmer, M., Lu, B. & Staeheli, P. (2004). Neurological disorder after Borna disease virus infection in the absence of either interferon-gamma, Fas, inducible NO synthase, or chemokine receptor CXCR3. *Viral Immunology*, 17, 79-85.

Hausmann, J. C., Cray, C. & Hartup, B. K. (2015). Comparison of Serum Protein Electrophoresis Values in Wild and Captive Whooping Cranes (*Grus americana*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 29, 192-199.

Heckmann, J., Enderlein, D., Piepenbring, A. K., Herzog, S., Heffels-Redmann, U., Malberg, S., Herden, C. & Lierz, M. (2017). Investigation of Different Infection Routes of Parrot Bornavirus in Cockatiels. *Avian Diseases*, 61, 90-95.



Heffels-Redmann, U., Enderlein, D., Herzog, S., Herden, C., Piepenbring, A., Neumann, D., Müller, H., Capelli, S., Müller, H., Oberhauser, K., Gerlach, H., Kaleta, E. F. & Lierz, M. (2011). Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*, 40, 419-426.

Heffels-Redmann, U., Enderlein, D., Herzog, S., Piepenbring, A., Bürkle, M., Neumann, D., Herden, C. & Lierz, M. (2012). Follow-up investigations on different courses of natural avian bornavirus infections in psittacines. *Avian Diseases*, 56, 153-159.

Herzog, S., Enderlein, D., Heffels-Redmann, U., Piepenbring, A., Neumann, D., Kaleta, E. F., Müller, H., Lierz, M. & Herden, C. (2010). Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian bornavirus infection in psittacine birds. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2282-2284.

Hess & Heijnen. (2004). Monoklonale Gammopathien–vom MGUS zum Myelom. *Therapeutische Umschau*, 61, 161-167.

Hoffmann, B., Tappe, D., Hoper, D., Herden, C., Boldt, A., Mawrin, C., Niederstrasser, O., Müller, T., Jenckel, M., van der Grinten, E., Lutter, C., Abendroth, B., Teifke, J. P., Cadar, D., Schmidt-Chanasit, J., Ulrich, R. G. & Beer, M. (2015). A Variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *New England Journal of Medicine*, 373, 154-162.

Honkavuori, K. S., Shivaprasad, H. L., Williams, B. L., Quan, P. L., Hornig, M., Street, C., Palacios, G., Hutchison, S. K., Franca, M., Egholm, M., Briese, T. & Lipkin, W. I. (2008). Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1883-1886.

Hoppes, S., Gray, P. L., Payne, S., Shivaprasad, H. L. & Tizard, I. (2010). The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13, 495-508.

Horie, M., Ueda, K., Ueda, A., Honda, T. & Tomonaga, K. (2012). Detection of Avian bornavirus 5 RNA in *Eclectus roratus* with feather picking disorder. *Microbiology and Immunology*, 56, 346-349.

Hughes, P. E. (1984). The pathology of myetric ganglioneuritis; psittacine encephalomyelitis; proventricular dilatation disease of psittacines and macaw wasting syndrome. In *Proceedings of the 33rd Western Poultry Diseases Conference* (pp. 85-87).

Ivey, E. S. (2000). Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 14, 103-106.

Jacobsen, B., Algermissen, D., Schaudien, D., Venner, M., Herzog, S., Wentz, E., Hewicker-Trautwein, M., Baumgartner, W. & Herden, C. (2010). Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *Journal of Comparative Pathology*, 143, 203-208.

Jenkins, T. (1991). Creatinine kinase as a diagnostic indicator of splanchnic neuropathy. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 5, 49.

Jeppsson, J. O., Laurell, C. B. & Franzen, B. (1979). Agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 25, 629-638.

Joyner, K. L., Kock, N. & Styles, D. (1989). Encephalitis, proventricular and ventricular myositis, and myenteric ganglioneuritis in an Umbrella cockatoo. *Avian Diseases*, 33, 379-381.

Kaneko, J. J. (1997). Serum proteins and dysproteinemias. In J. J. Kaneko (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 5th edn (pp. 117-138). San Diego: Academic Press.

Keller, D. L., Honkavuori, K. S., Briese, T., Lipkin, W. I., Muthuswamy, A.,

Steinberg, H. & Sladky, K. K. (2010). Proventricular dilatation disease associated with avian bornavirus in a Scarlet macaw (*Ara macao*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 961-965.

Kerski, A., de Kloet, A. H. & de Kloet, S. R. (2012). Vertical transmission of avian bornavirus in Psittaciformes: avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in eggs, embryos, and hatchlings obtained from infected sun conures (*Aratinga solstitialis*). *Avian Diseases*, 56, 471-478.

Kıral, F., Seyrek, K., Pasa, S., Ertabaklar, H. & Ünsal, C. (2004). Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Revue de médecine vétérinaire*, 155, 226-229.

Kistler, A., Gancz, A., Clubb, S., Skewes-Cox, P., Fischer, K., Sorber, K., Chiu, C., Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, Y., Greninger, A., Wen, C., Karlene, S., Ganem, D. & DeRisi, J. (2008). Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: Identification of a candidate etiologic agent. *Virology Journal*, 5, 88.

Kistler, A. L., Smith, J. M., Greninger, A. L., DeRisi, J. L. & Ganem, D. (2010). Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *Journal of Virology*, 84, 2176-2179.

König, H. E. & Korbelt, R. (2016). Medication and blood collection techniques. In H. E. König, R. Korbelt & H. G. Liebich (Eds.), *Avian Anatomy - Textbook and Colour Atlas* 2nd edn (pp. 289-303). Sheffield, UK: 5m Publishing.

Korbelt, R., Kronthaler, F., Hufen, H. & Rinder, M. (2011). Experimental infection of African grey parrots with avian bornavirus. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 295). Seattle, WA.

Korbelt, R. & Rinder, M. (2011). Ocular findings in psittacine birds infected with avian bornavirus (ABV). In *Proceedings of the Annual Conference of the*

*Association of Avian Veterinarians* (p. 21). Seattle, WA.

Korbel, R. & Rinder, M. (2012). Update on psittacine proventricular disease (PDD) and avian Bornavirus infection. In *Proceedings of the Australasian Committee Association of Avian Veterinarians and Unusual Exotic Pet Veterinarians Annual Conference* (pp. 103-105). Melbourne, Australia.

Kranz, J. B., Escandon, P. & Musser, J. M. B. (2015). Environmental stability of avian bornavirus: pH and drying. In *Proceedings of the ExoticsCon* (p. 89). San Antonio, TX.

Krol, L., Allender, M., Cray, C. & George, R. (2014). Plasma proteins and selected acute-phase proteins in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45, 782-786.

Kuhn, J. H., Durrwald, R., Bao, Y., Briese, T., Carbone, K., Clawson, A. N., deRisi, J. L., Garten, W., Jahrling, P. B., Kolodziejek, J., Rubbenstroth, D., Schwemmle, M., Stenglein, M., Tomonaga, K., Weissenbock, H. & Nowotny, N. (2015). Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Archives of Virology*, 160, 621-632.

Kummrow, M., Silvanose, C., Di Somma, A., Bailey, T. A. & Vorbrüggen, S. (2012). Serum Protein Electrophoresis by Using High-resolution Agarose Gel in Clinically Healthy and *Aspergillus* Species-infected Falcons. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 26, 213-220.

Last, R. D., Weissenbock, H., Nedorost, N. & Shivaprasad, H. L. (2012). Avian bornavirus genotype 4 recovered from naturally infected psittacine birds with proventricular dilatation disease in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 83, 938.

Laurell, C. B. (1973). Electrophoresis, Specific Protein Assays, or Both in Measurement of Plasma Proteins? *Clinical Chemistry*, 19, 99-102.

Lennox, A., Clubb, S., Romagnano, A., Altman, N. H. & Cray, C. (2014). Monoclonal hyperglobulinemia in lymphosarcoma in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and a blue and gold macaw (*Ara ararauna*). *Avian Diseases*, 58, 326-329.

Lierz, M., Hafez, H. M., Honkavuori, K. S., Gruber, A. D., Olias, P., Abdelwhab, E. M., Kohls, A., Lipkin, W. I., Briese, T. & Hauck, R. (2009). Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathology*, 38, 491-496.

Lierz, M., Piepenbring, A., Herden, C., Oberhauser, K., Heffels-Redmann, U. & Enderlein, D. (2011). Vertical transmission of avian bornavirus in psittacines. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 2390-2391.

Lierz, M. (2016). Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease. In B. Speer (Ed.), *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery* (pp. 28-46). St. Louis, Missouri: Elsevier.

Löffler, B. A. (2011). *Aviäre Bornaviren bei Papageien: Untersuchungen zur Antigen-Verteilung im Gewebe*. (Dissertation), München.

Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, I., Perl, S. & Bendheim, U. (2006). An outbreak of proventricular dilatation disease in psittacine breeding farm in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61, 16 - 19.

Lumeij, J. T. (1987). The diagnostic value of plasma proteins and non-protein nitrogen substances in birds. *Veterinary Quarterly*, 9, 262-268.

Lumeij, J. T. (1993). Avian plasma chemistry in health and disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 20-26). Nashville, TN.

Lutz, H., Addie, D. D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T.,

Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M. C., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U. & Mostl, K. (2015). Borna disease virus infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17, 614-616.

Lutz, M. & Wilson, R. (1991). Psittacine proventricular dilatation syndrome in an Umbrella cockatoo. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 198, 1962 - 1964.

Mannl, A., Gerlach, H. & Leipold, R. (1987). Neuropathic gastric dilatation in psittaciformes. *Avian Diseases*, 31, 214-221.

Marton, S., Banyai, K., Gal, J., Ihasz, K., Kugler, R., Lengyel, G., Jakab, F., Bakonyi, T. & Farkas, S. L. (2015). Coding-complete sequencing classifies parrot bornavirus 5 into a novel virus species. *Archives of Virology*, 160, 2763-2768.

Mirhosseini, N., Gray, P. L., Hoppes, S., Tizard, I., Shivaprasad, H. & Payne, S. (2011). Proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) after infection with a genotype 2 avian bornavirus. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 25, 199-204.

Miro, G., Domenech, A., Escolar, E., Collado, V. M., Tejerizo, G., De Las Heras, A. & Gomez-Lucia, E. (2007). Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FeLV) infections. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 54, 203-209.

Monaco, E., Hoppes, S., Guo, J. & Tizard, I. (2012). The detection of avian bornavirus within psittacine eggs. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 26, 144-148.

Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *Veterinary Journal*, 168, 28-40.

Musilova, A., Knotkova, Z., Pinterova, K. & Knotek, Z. (2015). Variations of plasma protein electrophoresis in healthy captive Green Iguanas (*Iguana iguana*). *Veterinary Clinical Pathology*, 44, 243-248.

Musser, J. M., Heatley, J. J., Koinis, A. V., Suchodolski, P. F., Guo, J., Escandon, P. & Tizard, I. R. (2015). Ribavirin Inhibits Parrot Bornavirus 4 Replication in Cell Culture. *PLoS ONE*, 10, e0134080.

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

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

Nedorost, N., Maderner, C. A., Kolodziejek, J., Lussy, H., Nowotny, N. & Weissenböck, H. (2012). Identification of mixed infections with different genotypes of avian bornaviruses in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Diseases*, 56, 414-417.

O'Connell, T. X., Horita, T. J. & Kasravi, B. (2005). Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *American family physician*, 71, 105-112.

Ogawa, H., Yamaguchi, T. & Fukushi, H. (2005). Duplex shuttle PCR for differential diagnosis of budgerigar fledgling disease and psittacine beak and feather disease. *Microbiology and Immunology*, 49, 227-237.

Ogawa, H., Sanada, Y., Sanada, N., Kudo, M., Tuchiya, K., Kodama, T. & Uetsuka, K. (2011). Proventricular dilatation disease associated with avian bornavirus infection in a Citron-crested Cockatoo that was born and hand-reared in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 73, 837-840.

Olbert, M., Romer-Oberdorfer, A., Herden, C., Malberg, S., Runge, S., Staeheli, P. & Rubbenstroth, D. (2016). Viral vector vaccines expressing nucleoprotein and phosphoprotein genes of avian bornaviruses ameliorate homologous challenge infections in cockatiels and common canaries. *Scientific Reports*, 6, 36840.

Oldach, D., Zink, M. C., Pyper, J. M., Herzog, S., Rott, R., Narayan, O. & Clements, J. E. (1995). Induction of protection against Borna disease by inoculation with high-dose-attenuated Borna disease virus. *Virology*, 206, 426-434.

Oppenheimer, J. H., Surks, M. I., Smith, J. C. & Squef, R. (1965). Isolation and characterization of human thyroxine-binding prealbumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 173-180.

Orosz, S. E. (2015). Anatomy and physiology of the avian GI tract. In *Proceedings of the LafeberVet Webinar*.

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

Payne, S., Covalada, L., Jianhua, G., Swafford, S., Baroch, J., Ferro, P. J., Lupiani, B., Heatley, J. & Tizard, I. (2011a). Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (*Branta canadensis*). *Journal of Virology*, 85, 12053-12056.

Payne, S., Shivaprasad, H. L., Mirhosseini, N., Gray, P., Hoppes, S., Weissenböck, H. & Tizard, I. (2011b). Unusual and severe lesions of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian bornavirus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV. *Avian Pathology*, 40, 15-22.

Perpinan, D., Fernandez-Bellon, H., Lopez, C. & Ramis, A. (2007).



Lymphoplasmacytic myenteric, subepicardial, and pulmonary ganglioneuritis in four nonsittacine birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 21, 210 - 214.

Pesaro, S., Ceccherelli, R. & Rossi, G. (2012). Correlation between antiganglioside-antibody levels and PDD status in psittacine species. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 77). Louisville, KY.

Phalen, D. N. (1986). An outbreak of psittacine proventricular dilatation syndrome (PPDS) in a private collection of birds and an atypical form of PPDS in a Nanday conure. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 27-34). Miami, FL.

Philadelpho, N. A., Rubbenstroth, D., Guimaraes, M. B. & Piantino Ferreira, A. J. (2014). Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. *Veterinary Microbiology*, 174, 584-590.

Piepenbring, A. K., Enderlein, D., Herzog, S., Kaleta, E. F., Heffels-Redmann, U., Ressmeyer, S., Herden, C. & Lierz, M. (2012). Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 234-241.

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

Polo, F. J., Peinado, V. I., Viscor, G. & Palomeque, J. (1998). Hematologic and plasma chemistry values in captive psittacine birds. *Avian Diseases*, 42, 523-535.

Quesenberry, K. & Moroff, S. (1991). Plasma electrophoresis in psittacine birds. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 112-117). Chicago, IL.

Raghav, R., Taylor, M., DeLay, J., Ojkic, D., Pearl, D. L., Kistler, A. L., DeRisi, J. L., Ganem, D. & Smith, D. A. (2010). Avian bornavirus is present in many tissues of psittacine birds with histopathologic evidence of proventricular dilatation disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 495-508.

Reavill, D. & Schmidt, R. (2007). Lesions of the proventriculus/ventriculus of pet birds. 1640 cases. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 89-93). Providence, RI.

Reiderson, T. H. & McBain, J. (1995). Serum protein electrophoresis and aspergillus antibody titers as an aid to diagnosis of Aspergillosis in penguins. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 61-64). Philadelphia, PA.

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

Reuter, A., Horie, M., Hoper, D., Ohnemus, A., Narr, A., Rinder, M., Beer, M., Staeheli, P. & Rubbenstroth, D. (2016). Synergistic antiviral activity of ribavirin and interferon-alpha against parrot bornaviruses in avian cells. *The Journal of General Virology*, 97, 2096-2103.

Rich, G. A. (1992). Classic and atypical cases of proventricular dilatation disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 119-125). New Orleans, LA.

Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K. & Herzog, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 343-352.

Ridgway, R. A. & Gallerstein, G. A. (1983). Proventricular dilatation in psittacines. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 228-233). San Diego, CA.

Rinder, M., Ackermann, A., Kempf, H., Kaspers, B., Korbel, R. & Staeheli, P. (2009a). Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *Journal of Virology*, 83, 5401-5407.

Rinder, M., Kaspers, B., Staeheli, P. & Korbel, R. (2009b). Die „neuropathische Magendilatation der Papageienvögel“ und aviäre Borna-Viren – aktuelle Entwicklungen. *Veterinär Spiegel*, 19, 188-191.

Rinder, M., Adrian, K., Staeheli, P., Kaspers, B. & Korbel, R. (2010a). Bornavirus infections: Development of serological tests for psittacine birds. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 17). San Diego, CA.

Rinder, M., Kaspers, B., Stäheli, P. & Korbel, R. (2010b). Diagnostik von aviären Bornaviren. In *Proceedings of the 16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten* (pp. 34-36). München.

Rinder, M., Kronthaler, F., Hufen, H., Kaspers, B., Staeheli, P. & Korbel, R. (2013). Experimental Infection of African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) with avian bornavirus by subcutaneous application of purified virus. In *Proceedings of the 1. International Conference on Avian, Herpetological & Exotic Mammal Medicine* (pp. 353-354). Wiesbaden, Germany.

Roman, Y., Bomsel-Demontoy, M. C., Levrier, J., Chaste-Duvernoy, D. & Jalme, M. S. (2009a). Effect of hemolysis on plasma protein levels and plasma electrophoresis in birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 73-80.

Roman, Y., Bomsel-Demontoy, M. C., Levrier, J., Ordonneau, D., Chaste-Duvernoy, D. & Jalme, M. S. (2009b). Influence of molt on plasma protein electrophoretic patterns in bar-headed geese (*Anser indicus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 661-671.

Rose, M. E. & Orlans, E. (1981). Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Developmental and Comparative Immunology*, 5, 15-20.

Rosenthal, K. L., Johnston, M. S. & Shofer, F. S. (2005). Assessment of the reliability of plasma electrophoresis in birds. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 375-378.

Rossi, G., Crosta, L. & Pesaro, S. (2008). Parrot proventricular dilation disease. *Veterinary Record*, 163, 310.

Rossi, G., Crosta, L., Ceccherelli, R. & Pesaro, S. (2012). PDD: Our point of view after 7 years of research. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 79-80). Louisville, KY.

Rott, R., Herzog, S., Richt, J. & Stitz, L. (1988). Immune-mediated pathogenesis of borna disease. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene*, 270, 295-301.

Rubbenstroth, D., Rinder, M., Kaspers, B. & Staeheli, P. (2012). Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a Salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Veterinary Microbiology*, 161, 36-42.

Rubbenstroth, D., Rinder, M., Stein, M., Höper, D., Kaspers, B., Brosinski, K., Horie, M., Schmidt, V., Legler, M., Korbelt, R. & Staeheli, P. (2013). Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Veterinary Microbiology*, 287-295.

Rubbenstroth, D., Brosinski, K., Rinder, M., Olbert, M., Kaspers, B., Korbelt, R. & Staeheli, P. (2014a). No contact transmission of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and domestic canaries (*Serinus canaria forma domestica*). *Veterinary Microbiology*, 172, 146-156.

Rubbenstroth, D., Schmidt, V., Rinder, M., Legler, M., Corman, V. M. & Staeheli, P. (2014b). Discovery of a new avian bornavirus genotype in Estrildid finches (*Estrildidae*) in Germany. *Veterinary Microbiology*, 168, 318-323.

Rubbenstroth, D., Schmidt, V., Rinder, M., Legler, M., Twietmeyer, S., Schwemmer, P. & Corman, V. M. (2016). Phylogenetic Analysis Supports Horizontal Transmission as a Driving Force of the Spread of Avian Bornaviruses. *PLoS ONE*, 11, e0160936.

Runge, S., Olbert, M., Herden, C., Malberg, S., Romer-Oberdorfer, A., Staeheli, P. & Rubbenstroth, D. (2017). Viral vector vaccines protect cockatiels from inflammatory lesions after heterologous parrot bornavirus 2 challenge infection. *Vaccine*, 35, 557-563.

Sassa, Y., Horie, M., Fujino, K., Nishiura, N., Okazaki, S., Furuya, T., Nagai, M., Omatsu, T., Kojima, A., Mizugami, M., Ueda, K., Iki, H., Ebisawa, K., Tomonaga, K. & Mizutani, T. (2013). Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan. *Virus Genes*, 47, 173-177.

Sassa, Y., Bui, V. N., Saitoh, K., Watanabe, Y., Koyama, S., Endoh, D., Horie, M., Tomonaga, K., Furuya, T., Nagai, M., Omatsu, T., Imai, K., Ogawa, H. & Mizutani, T. (2015). Parrot bornavirus-2 and -4 RNA detected in wild bird samples in Japan are phylogenetically adjacent to those found in pet birds in Japan. *Virus Genes*, 51, 234-243.

Schlottau, K., Hoffmann, B., Homeier-Bachmann, T., Fast, C., Ulrich, R. G., Beer, M. & Hoffmann, D. (2017a). Multiple detection of zoonotic variegated squirrel bornavirus 1 RNA in different squirrel species suggests a possible unknown origin for the virus. *Archives of Virology*.

Schlottau, K., Jenckel, M., van den Brand, J., Fast, C., Herden, C., Hoper, D., Homeier-Bachmann, T., Thielebein, J., Mensing, N., Diender, B., Hoffmann, D., Ulrich, R. G., Mettenleiter, T. C., Koopmans, M., Tappe, D., Schmidt-Chanasit, J., Reusken, C. B., Beer, M. & Hoffmann, B. (2017b). Variegated Squirrel Bornavirus 1 in Squirrels, Germany and the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 23, 477-481.

Scope, A., Schwendenwein, I. & Gabler, C. (2002). Short-term variations of

biochemical parameters in racing pigeons (*Columba livia*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 16, 10-15.

Scope, A., Schwendenwein, I. & Frommlet, F. (2005). Influence of outlying values and variations between sampling days on reference ranges for clinical chemistry in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Record*, 156, 310-314.

Scope, A., Schwendenwein, I. & Frommlet, F. (2006). Biological variation, individuality and critical differences of eight biochemical blood constituents in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Record*, 159, 839-843.

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

Shivaprasad, H. L., Barr, B. C., Woods, L. W., Daft, B. M., Moore, J. D., Kinde, H. L., A. M. & R., D. (1995). Spectrum of lesions (pathology) of proventricular dilatation syndrome. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 505-506). Philadelphia, PA.

Shivaprasad, H. L. (2005). Proventricular dilatation disease in a Peregrine falcon (*Falco peregrinus*). In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 107-108). Monterey, CA.

Silim, A. & Venne, D. (1989). Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired field samples. *Avian Diseases*, 33, 643-648.

Solberg, H. E. (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta*, 170, S13 - S32.

Souza, M. J., Newman, S. J., Greenacre, C. B., Avenell, J. S., Wall, J. S., Phillips, J. C., Fry, M. M., Donnell, R. L. & Daniel, G. B. (2008). Diffuse intestinal T-cell lymphosarcoma in a yellow-naped Amazon parrot (*Amazona ochrocephala auropalliata*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 656-660.

Speer, B. (1990). Proventricular Dilatation as a Pediatric Disease. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 4, 15.

Sprankel, H., Richarz, K., Ludwig, H. & Rott, R. (1978). Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Medical Microbiology and Immunology*, 165, 1-18.

Staheli, P., Rinder, M. & Kaspers, B. (2010). Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *Journal of Virology*, 84, 6269-6275.

Steinmetz, A., Pees, M., Schmidt, V., Weber, M., Krautwald-Junghanns, M. E. & Oechtering, G. (2008). Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). *Journal of Small Animal Practice*, 49, 660-662.

Stitz, L., Soeder, D., Deschl, U., Frese, K. & Rott, R. (1989). Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *Journal of Immunology*, 143, 4250-4256.

Stitz, L., Schilken, D. & Frese, K. (1991). Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats. *Journal of Virology*, 65, 457-460.

Stitz, L., Dietzschold, B. & Carbone, K. M. (1995). Immunopathogenesis of Borna disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 190, 75-92.

Stitz, L., Noske, K., Planz, O., Furrer, E., Lipkin, W. I. & Bilzer, T. (1998). A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus

tropism outside the central nervous system. *Journal of Virology*, 72, 8884-8892.

Stitz, L., Bilzer, T. & Planz, O. (2002). The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Frontiers in Bioscience*, 7, d541-555.

Suedmeyer, W. K. (1992). Diagnosis and clinical progression of three cases of proventricular dilatation syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 6, 159-163.

Sullivan, N. D., Mackie, J. T., Miller, R. I. & Giles, A. (1997). First case of psittacine proventricular dilatation syndrome (macaw wasting disease) in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 75, 674-674.

Tatum, L. M., Zaias, J., Mealey, B. K., Cray, C. & Bossart, G. D. (2000). Protein electrophoresis as a diagnostic and prognostic tool in raptor medicine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31, 497-502.

Taylor, M., Gregory, C., Schmidt, R. & Clubb, S. L. (1997). Proventricular Dilatation Disease, round table discussion. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 11, 201-203.

Tizard, I., Guo, J., Turner, D., Payne, S. & Heatley, J. (2013). Studies on the ABV carrier state in healthy cockatiels. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 5). Jacksonville, FL.

Tizard, I., Shivaprasad, H. L., Guo, J., Hameed, S., Ball, J. & Payne, S. (2016). The pathogenesis of proventricular dilatation disease. *Animal Health Research Reviews*, 17, 110-126.

Tokunaga, T., Yamamoto, Y., Sakai, M., Tomonaga, K. & Honda, T. (2017). Antiviral activity of favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses. *Antiviral Research*, 143, 237-245.



Tomaszewski, E., Wilson, V. G., Wigle, W. L. & Phalen, D. N. (2001). Detection and heterogeneity of herpesviruses causing Pacheco's disease in parrots. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 533-538.

van den Broek, A. H. (1992). Serum protein values in canine diabetes mellitus, hypothyroidism and hypoadrenocorticism. *The British Veterinary Journal*, 148, 259-262.

van den Broek, A. H. M. (1990). Serum protein electrophoresis in canine parvovirus enteritis. *The British Veterinary Journal*, 146, 255-259.

VanDevanter, D. R., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, E. R., Coulter, S., Garber, R. L. & Rose, T. M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1666-1671.

Vice, C. A. C. (1992). Myocarditis as a Component of Psittacine Proventricular Dilatation Syndrome in a Patagonian Conure. *Avian Diseases*, 36, 1117-1119.

Villanueva, I., Gray, P., Mirhosseini, N., Payne, S., Hoppes, S., Honkavuori, K. S., Briese, T., Turner, D. & Tizard, I. (2010). The diagnosis of proventricular dilatation disease: Use of a Western blot assay to detect antibodies against avian borna virus. *Veterinary Microbiology*, 143, 196-201.

Weissenböck, H., Bakonyi, T., Sekulin, K., Ehrensperger, F., Doneley, R. J., Dürrwald, R., Hoop, R., Erdélyi, K., Gál, J. & Kolodziejek, J. (2009a). Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 1453-1459.

Weissenböck, H., Sekulin, K., Bakonyi, T., Högler, S. & Nowotny, N. (2009b). Novel Avian Bornavirus in a Nonpsittacine Species (Canary; *Serinus canaria*) with Enteric Ganglioneuritis and Encephalitis. *Journal of Virology*, 83, 11367-11371.

Weissenböck, H., Fragner, K., Nedorost, N., Mostegl, M. M., Sekulin, K., Maderner, A., Bakonyi, T. & Nowotny, N. (2010). Localization of avian bornavirus RNA by in situ hybridization in tissues of psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Veterinary Microbiology*, 145, 9-16.

Woerpel, R. W. & Roskopf, W. J. (1984). Proventricular dilatation and wasting syndrome: Myenteric Ganglioneuritis and encephalomyelitis of psittacines: An update. In *Proceedings of the Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 25-28). Toronto.

Wünschmann, A., Honkavuori, K., Briese, T., Lipkin, W. I., Shivers, J. & Armien, A. G. (2011). Antigen tissue distribution of Avian bornavirus (ABV) in psittacine birds with natural spontaneous proventricular dilatation disease and ABV genotype 1 infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 716-726.

Xie, H., Huff, G. R., Huff, W. E., Balog, J. M., Holt, P. & Rath, N. C. (2002). Identification of Ovotransferrin as an Acute Phase Protein in Chickens. *Poultry Science*, 81, 112-120.

Zielezienski-Roberts, K. & Cray, C. (1997). Sarcocystis - further studies in serological diagnosis. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 213-217). Reno, NV.

Zimmermann, V., Rinder, M., Kaspers, B., Staeheli, P. & Rubbenstroth, D. (2014). Impact of antigenic diversity on laboratory diagnosis of Avian bornavirus infections in birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26, 769-777.

## VIII. ANHANG

Die hier unter **A** bis **C** aufgeführten Tabellen sind als „supplemental data“ der Publikation auch online verfügbar

(<http://www.tandfonline.com/doi/suppl/10.1080/03079457.2017.1325442>).

## A. Individual values and reference ranges Parrot P7-P12

**Table S1** Individual values and reference ranges for packed cell volume (PCV) in % for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

PCV	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	2.5%- Quantile	97.5%- Quantile	CD	CV	Iol
P7	41	42	43	39	43	39	44	39	43	42	44	45	37	41.6	42.0	2.4	37.0	45.0	9.5	5.8	0.7
P8	54	56	47	42	46	44	48	46	47	50	50	45	43	47.5	47.0	4.1	42.0	56.0	16.1	8.6	1.0
P9	45	47	45	40	42	41	45	43	44	47	43	44	42	43.7	44.0	2.1	40.0	47.0	8.4	4.9	0.6
P10	43	45	42	37	39	41	43	40	39	43	39	40	39	40.8	40.0	2.3	37.0	45.0	8.9	5.6	0.7
P11	51	45	44	38	43	42	45	42	41	47	47	44	39	43.7	44.0	3.5	38.0	51.0	13.7	8.0	1.0
P12	46	42	43	39	44	38	45	42	41	40	41	44	40	41.9	42.0	2.4	38.0	46.0	9.4	5.7	0.7

**Table S2** Individual values and reference ranges for total proteins (TP) in g/dl for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

TP	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	2.5%- Quantile	97.5%- Quantile	CD	CV	Iol
P7	3.5	3.6	3.7	3.1	3.1	3.1	3.2	3.4	3.4	2.9	3.3	3.3	3.1	3.3	3.3	0.2	2.9	3.6	0.9	7.0	0.7
P8	3.7	4	4.1	3.1	3.2	3.6	3.5	3.9	3.5	3.6	3.6	3.5	3.5	3.6	3.6	0.3	3.1	4.1	1.1	7.9	0.8
P9	3.6	3.9	3.9	3.4	3.2	3.3	3.5	3.9	3.6	3.3	3.7	3.6	3.7	3.6	3.6	0.2	3.2	3.9	0.9	6.6	0.7
P10	3.5	3.5	3.6	2.8	2.9	3.2	3.2	3.6	3.1	2.9	3.2	3	3.4	3.2	3.2	0.3	2.8	3.6	1.1	8.6	0.9
P11	3.6	3.7	4	2.9	3.2	3.2	3.3	3.4	3.1	2.9	3.4	3.7	3.1	3.3	3.3	0.3	2.9	4.0	1.3	9.9	1.0
P12	3.5	-	3.7	2.9	3.3	2.5	3.2	3.5	3.2	2.5	3.2	3.3	2.9	3.1	3.2	0.4	2.5	3.7	1.5	12.0	1.2

**Table S3** Individual values and reference ranges for aspartate aminotransferase (AST) in U/l for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

AST	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	2.5%- Quantile	97.5%- Quantile	CD	CV	Iol
P7	204	193	156	145	153	122	183	127	176	149	146	140	120	154.9	149.0	26.8	120.0	204.0	105.0	17.3	0.6
P8	156	164	168	147	169	116	136	114	152	124	143	138	131	142.9	143.0	18.6	114.0	169.0	73.0	13.0	0.5
P9	182	147	176	136	130	126	192	120	168	117	124	110	120	142.2	130.0	27.9	110.0	192.0	109.3	19.6	0.7
P10	373	168	187	129	123	118	145	110	114	113	118	108	115	147.8	118.0	71.8	108.0	373.0	281.4	48.6	1.8
P11	182	200	238	159	140	154	184	133	272	135	141	138	128	169.5	154.0	44.5	128.0	272.0	174.4	26.2	1.0
P12	168	-	173	182	130	141	250	113	167	122	160	149	149	158.7	154.5	35.7	113.0	250.0	139.9	22.5	0.8

**Table S4** Individual values and reference ranges for bile acid (BA) in  $\mu\text{mol/l}$  for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

BA <sup>a</sup>	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	2.5%- Quantile	97.5%- Quantile	CD	CV	Iol
P7	37	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35
P8	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35
P9	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35
P10	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35
P11	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35
P12	43	-	45	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35

<sup>a</sup>Values for BA <35  $\mu\text{mol/l}$  were not differentiated by Vetscan, therefore no further statistical measures were calculated

**Table S5** Individual values and reference ranges for creatine kinase (CK) in U/l for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

CK	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	2.5%- Quantile	97.5%- Quantile	CD	CV	Iol
P7	1708	1466	1106	935	1054	988	1894	956	1379	1216	845	1215	651	1185.6	1106.0	350.3	651.0	1894.0	1373.2	29.5	0.6
P8	1004	696	1200	1520	1669	367	885	418	762	492	790	607	850	866.2	790.0	398.5	367.0	1669.0	1562.2	46.0	0.9
P9	1780	1089	1910	999	920	1653	2366	747	1205	794	779	608	581	1187.0	999.0	563.9	581.0	2366.0	2210.3	47.5	0.9
P10	430	1404	3069	696	1274	836	985	430	455	656	624	526	502	914.4	656.0	720.1	430.0	3069.0	2822.8	78.8	1.5
P11	1993	1075	1962	667	475	1718	1331	791	2791	626	614	624	522	1168.4	791.0	734.3	475.0	2791.0	2878.4	62.8	1.2
P12	1587	-	2224	2359	598	1648	1190	608	1808	1328	1564	2172	1115	1516.8	1575.5	581.7	598.0	2359.0	2280.2	38.4	0.7

**Table S6** Individual values and reference ranges for uric acid (UA) in mg/dl for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

UA	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	2.5%- Quantile	97.5%- Quantile	CD	CV	Iol
P7	1.9	1.2	2.2	4.2	0.8	1.9	1.3	2.1	2.7	2.7	3.8	1.5	5.4	2.4	2.1	1.3	0.8	5.4	5.2	54.3	1.3
P8	3.7	4.6	3.1	4	1.2	3.9	2.6	5.4	3.4	6.3	1.8	3	2.4	3.5	3.4	1.4	1.2	6.3	5.5	40.3	0.9
P9	0.8	2.9	2.3	2.8	2.5	2.3	3.8	4.2	3.2	6	4.2	1.8	1.5	2.9	2.8	1.4	0.8	6.0	5.3	46.3	1.1
P10	2.7	3.9	2.7	3.1	1.5	2.8	3	3.2	3	2.8	1.4	1.1	1.5	2.5	2.8	0.9	1.1	3.9	3.3	33.9	0.8
P11	5.3	3.1	3.3	3.2	2	3.7	3.2	3.9	3.4	3.3	2.2	1.6	2.3	3.1	3.2	1.0	1.6	5.3	3.7	30.6	0.7
P12	1.7	-	3.6	3.3	2.4	0.6	2.1	2.3	2.1	1.1	2.4	1.9	1.8	2.1	2.1	0.8	0.6	3.6	3.2	39.0	0.9

**Table S7** Individual values and reference ranges for glucose (Glu) in mg/dl for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

Glu																	2.5%-		97.5%-			
	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	Quantile	Quantile	CD	CV	Iol	
P7	201	221	206	186	214	214	211	224	222	225	194	195	186	207.6	211.0	14.1	186.0	225.0	55.1	6.8	0.7	
P8	248	275	245	218	251	256	244	256	245	246	231	222	227	243.4	245.0	15.6	218.0	275.0	61.3	6.4	0.7	
P9	226	212	215	204	205	219	219	216	229	222	186	219	196	212.9	216.0	12.2	186.0	229.0	47.9	5.7	0.6	
P10	193	237	228	203	185	240	247	232	222	227	235	188	218	219.6	227.0	20.8	188.0	247.0	81.4	9.5	1.0	
P11	239	213	224	206	187	221	223	197	234	205	193	175	199	208.9	206.0	18.9	187.0	239.0	74.0	9.0	0.9	
P12	267	-	259	222	223	185	241	244	225	200	249	237	216	230.7	231.0	23.7	185.0	267.0	93.0	10.3	1.0	

**Table S8** Individual values and reference ranges for calcium (Ca) in mg/dl for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

Ca																	2.5%-		97.5%-			
	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	Quantile	Quantile	CD	CV	Iol	
P7	8	7.4	7.5	7	7	7.3	8.2	7.8	8.3	7.7	8.1	8.6	7.4	7.7	7.7	0.5	7.0	8.6	2.0	6.5	0.8	
P8	7.7	7.7	7.9	6.3	7.9	7.1	7.9	8.1	8.8	7.9	8.5	8.3	7.3	7.8	7.9	0.6	6.3	8.8	2.5	8.2	1.0	
P9	7.9	7.6	7.8	7	7	7	8.6	8.3	8.7	8.1	8.8	8	7.7	7.9	7.9	0.6	7.0	8.7	2.5	8.0	1.0	
P10	8.3	7.6	7.9	6.3	6.7	7.8	8.1	8	8.1	7.6	7.8	7.5	7.2	7.6	7.8	0.6	6.3	8.3	2.3	7.6	0.9	
P11	8	7.8	8.3	6.4	7.2	7.7	8.2	7.8	8.6	7.8	8.8	7.9	6.8	7.8	7.8	0.7	6.4	8.8	2.6	8.6	1.1	
P12	8.4	-	8	6.6	7.1	5.7	7.8	8.2	8.3	8	8.2	8.4	7.1	7.7	8.0	0.8	5.7	8.4	3.3	11.1	1.4	

**Table S9** Individual values and reference ranges for phosphorus (Phos) in mg/dl for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

Phos																	2.5%-		97.5%-			
	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	Quantile	Quantile	CD	CV	Iol	
P7	3.4	3.8	3.4	2.9	3.7	4.3	3.5	3.6	3.5	3.8	2.5	4.2	2.7	3.5	3.5	0.5	2.5	4.3	2.1	15.2	0.6	
P8	2.2	2.7	2.6	2.3	5.4	2.7	3.7	1.8	2.9	2.4	1.3	2.4	1.6	2.6	2.4	1.0	1.3	5.4	4.1	39.5	1.6	
P9	4	4.9	3.3	3.7	4	3.8	5.6	3.4	3.7	6	3	4.3	3.6	4.1	3.8	0.9	3.0	6.0	3.5	21.8	0.9	
P10	4.7	4.1	3	3	3.3	4.1	3.7	3.1	3	3.6	2.5	4.2	2.9	3.5	3.3	0.6	2.9	4.7	2.5	18.6	0.7	
P11	3.6	4.9	3.9	3.4	3.7	4.5	3.8	4.1	5.3	4.1	2.9	4.4	3.4	4.0	3.9	0.7	2.9	5.3	2.6	16.4	0.7	
P12	3.7	-	3.9	3.7	2.2	4	4.6	3.4	3.8	3.1	2.3	4.4	3.8	3.6	3.8	0.7	2.2	4.6	2.9	20.5	0.8	

**Table S10** Individual values and reference ranges for potassium (Pot) in mmol/l for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

Pot																	2.5%-		97.5%-			
	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	Quantile	Quantile	CD	CV	Iol	
P7	3.9	2.9	3.3	3.4	2.8	2.9	2.8	3	2.7	3.3	2.8	3.3	3.3	3.1	3.0	0.3	2.7	3.9	1.3	11.0	0.6	
P8	3.8	3.3	3.7	6.1	2.6	2.9	3.4	3.4	3.7	3.6	3.8	3.5	3.6	3.6	3.6	0.8	2.6	6.1	3.2	22.4	1.2	
P9	3.6	3.2	3.3	3.8	3.6	4.4	3.1	2.8	3.3	4	3.2	3	3.2	3.4	3.3	0.4	2.8	4.0	1.7	12.9	0.7	
P10	3.7	3.6	3.7	4.8	3.7	3.3	3.2	3	5.8	3.4	3.1	3.6	3.6	3.7	3.6	0.8	3.0	5.8	3.0	20.5	1.1	
P11	3.5	4	3.6	4.3	3.7	3.1	3	4.1	4.5	4.1	3	3	3.7	3.7	3.7	0.5	3.0	4.5	2.0	14.3	0.7	
P12	3.2	-	3.8	4.4	3.8	6.4	3.6	3.2	4.2	4.7	3.1	3.3	3.2	3.9	3.7	0.9	3.1	6.4	3.7	24.2	1.2	

**Table S11** Individual values and reference ranges for sodium (Sod) in mmol/l for parrots P7-P12, mean value, median, standard deviation (SD), 2.5% and 97.5% quantile, critical difference (CD), coefficient of variation (CV) and index of individuality (Iol) 50 to 2 weeks before infection.

Sod																	2.5%-		97.5%-			
	-50	-46	-42	-38	-34	-30	-26	-22	-18	-14	-10	-6	-2	mean	median	SD	Quantile	Quantile	CD	CV	Iol	
P7	145	145	144	151	150	147	146	143	147	151	150	153	155	148.2	147.0	3.7	143.0	155.0	14.5	2.5	0.7	
P8	145	148	148	159	146	152	146	146	153	156	151	159	157	151.2	151.0	5.2	145.0	159.0	20.3	3.4	1.0	
P9	144	145	148	151	154	150	148	142	150	156	149	156	151	149.5	150.0	4.3	142.0	156.0	16.8	2.9	0.8	
P10	145	148	148	162	157	149	148	147	152	161	151	155	158	152.4	151.0	5.6	145.0	162.0	22.1	3.7	1.1	
P11	148	151	151	153	160	151	147	151	153	159	148	154	153	152.2	151.0	3.9	147.0	160.0	15.2	2.5	0.7	
P12	147	-	147	157	157	164	143	150	148	164	154	154	158	153.6	154.0	6.8	147.0	164.0	26.5	4.4	1.3	

## B. Individual values after infection Parrot P7-P12

**Table S12** Individual values for packed cell volume (PCV) in % for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.

PCV	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	40	40											
P8	40	44											
P9	36	44											
P10	36	39	31	33	47	46	48	46	49	47	45	46	47
P11	34	43	45	49	50	45	48	50	47	46	45	47	45
P12	40	40	47	40	37	43	46	47	47	44	44	45	42

**Table S13** Individual values for total proteins (TP) in g/dl for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.

TP	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	2.9	3.1											
P8	2.9	3.6											
P9	3.1	3.8											
P10	3.1	2.9	3.5	3.6	4.2	3.9	3.9	3.7	4.3	3.8	3.6	3.9	4.0
P11	3.1	3.5	3.8	4.0	4.9	4.3	4.5	3.9	3.8	3.4	3.5	3.7	3.7
P12	3.2	3.1	3.7	3.0	3.2	2.9	3.3	3.6	3.5	2.8	3.0	3.0	2.9

**Table S14** Individual values for aspartate aminotransferase (AST) in U/l for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.

AST	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	142	144											
P8	112	475											
P9	98	125											
P10	98	175	110	198	140	136	117	125	107	136	122	139	129
P11	154	176	210	194	225	171	148	148	121	172	139	162	164
P12	127	126	145	149	284	185	166	194	123	198	107	176	385

**Table S15** Individual values for bile acid (BA) in  $\mu\text{mol/l}$  for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.

BA <sup>a</sup>	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	<35	<35											
P8	35	71											
P9	<35	<35											
P10	35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35
P11	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35
P12	35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35	<35

<sup>a</sup>Values for BA <35  $\mu\text{mol/l}$  were not differentiated by Vetscan

**Table S16** Individual values for creatine kinase (CK) in U/l for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.

CK	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	1135	2006											
P8	826	6430											
P9	600	822											
P10	600	825	1521	1419	1286	484	531	567	532	550	511	564	523
P11	570	1395	2481	1061	2597	1949	914	837	534	915	596	944	750
P12	640	1035	812	1311	7116	807	543	638	740	1306	1104	1806	1838

**Table S17** Individual values for uric acid (UA) in mg/dl for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.

UA	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	0.9	2.6											
P8	5.4	5.3											
P9	3.7	3.2											
P10	3.7	4.4	3.4	10.7	6.0	3.7	3.5	2.0	5.4	5.4	2.7	6.4	5.0
P11	1.9	1.6	1.4	2.6	4.7	3.4	1.2	2.9	2.9	5.0	2.6	6.8	7.0
P12	1.7	0.4	4.0	3.4	0.8	1.0	3.1	2.5	4.5	5.3	2.9	3.4	2.1

**Table S18** *Individual values for glucose (Glu) in mg/dl for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.*

Glu	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	188	191											
P8	214	255											
P9	176	196											
P10	176	217	239	226	219	235	225	222	272	212	261	271	213
P11	212	204	200	225	225	505	294	254	275	239	310	201	227
P12	233	215	272	204	224	206	255	236	277	225	291	244	247

**Table S19** *Individual values for calcium (Ca) in mg/dl for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.*

Ca	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	7.1	6.7											
P8	6.4	8.4											
P9	6.7	7.8											
P10	6.7	8.2	8.1	8.2	8.9	8.9	8.9	9.1	9.3	9.4	8.4	9.3	8.7
P11	7.5	8.2	8.2	8.3	8.2	7.5	8.4	9.0	8.7	8.0	8.3	8.3	8.3
P12	8.1	7.5	8.4	7.0	8.4	7.6	7.9	8.6	9.1	7.3	8.0	7.8	7.4

**Table S20** *Individual values for phosphorus (Phos) in mg/dl for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.*

Phos	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	1.9	3.2											
P8	1.4	4.1											
P9	2.2	4.1											
P10	2.2	3.8	3.7	5.7	3.6	5.1	4.2	2.8	3.1	4.2	4.3	2.8	2.7
P11	2.4	3.8	4.3	3.5	2.9	3.5	3.8	3.5	3.1	2.6	4.5	2.0	1.8
P12	3.8	3.4	4.3	2.8	4.1	3.9	2.9	2.7	6.3	3.2	3.7	3.3	2.4

**Table S21** *Individual values for potassium (Pot) in mmol/l for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.*

Pot	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	3.3	3.3											
P8	5.2	3.0											
P9	4.3	3.5											
P10	4.3	2.5	3.7	3.3	2.7	3.8	3.7	3.1	3.3	3.1	2.6	4.1	3.8
P11	3.5	3.6	5.5	3.1	3.4	6.0	3.4	3.1	2.8	2.9	3.3	4.6	3.1
P12	2.5	3.0	3.2	4.0	3.6	3.4	3.4	3.5	4.7	3.1	2.5	3.5	4.5

**Table S22** *Individual values for sodium (Sod) in mmol/l for parrots P7-P12, 2 to 50 weeks after infection.*

Sod	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
P7	158	154											
P8	163	156											
P9	161	157											
P10	161	156	156	153	159	158	155	147	149	148	149	153	152
P11	161	155	162	150	146	160	149	146	140	149	152	144	148
P12	155	156	154	156	154	152	152	146	157	154	150	147	151

### C. Results protein electrophoresis Parrot P7-P12

**Table S23** Results of protein electrophoresis (as a percentage (%) and absolutely (g/dl)) of parrot P7 in weeks before (a.i.) and after (p.i.) infection.

protein fraction	18wks a.i.	10wks a.i.	2wks a.i.	2wks p.i.	4wks p.i.	6wks p.i.	8wks p.i.
total protein	5.6	5.9	3.5	5.1	5.4	4.7	3.7
A/G-ratio	0.85	1.26	1.06	0.97	0.92	1.03	1.18
prealbumin (%)	1.4	2.1	2.1	0.7	2.4	1.5	1.2
albumin (%)	44.6	53.7	49.4	48.6	45.6	49.2	53
$\alpha$ -globulins (%)	27.2	21.9	29.6	26.2	30	25.2	23.9
$\beta$ -globulins (%)	23.8	20.5	10.2	18	16.3	17.7	14.6
$\gamma$ -globulins (%)	3	1.8	8.7	6.5	5.7	6.4	7.3
prealbumin abs.	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0.1	0
albumin abs.	2.5	3.2	1.7	2.5	2.4	2.3	2
$\alpha$ -globulins abs.	1.5	1.3	1	1.3	1.6	1.2	0.9
$\beta$ -globulins abs.	1.3	1.2	0.4	0.9	0.9	0.8	0.5
$\gamma$ -globulins abs.	0.2	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

**Table S24** Results of protein electrophoresis (as a percentage (%) and absolutely (g/dl)) of parrot P8 in weeks before (a.i.) and after (p.i.) infection.

protein fraction	18wks a.i.	10wks a.i.	2wks a.i.	2wks p.i.	4wks p.i.	6wks p.i.
total protein	5.6	6.2	4.8	4.4	7	6.1
A/G-ratio	1.21	0.91	1.07	0.76	1.41	1.16
prealbumin (%)	1.3	1.4	1.1	1	2.5	1.7
albumin (%)	53.5	46.3	50.5	42.2	56	52.1
$\alpha$ -globulins (%)	23.9	20.1	27.2	22.9	15.6	23.2
$\beta$ -globulins (%)	13.6	28.7	14.4	21.1	19.1	15.7
$\gamma$ -globulins (%)	7.7	3.5	6.8	12.8	6.8	7.3
prealbumin abs.	0.1	0.1	0.1	0	0.2	0.1
albumin abs.	3	2.9	2.4	1.9	3.9	3.2
$\alpha$ -globulins abs.	1.3	1.2	1.3	1	1.1	1.4
$\beta$ -globulins abs.	0.8	1.8	0.7	0.9	1.3	1
$\gamma$ -globulins abs.	0.4	0.2	0.3	0.6	0.5	0.4

**Table S25** Results of protein electrophoresis (as a percentage (%) and absolutely (g/dl)) of parrot P9 in weeks before (a.i.) and after (p.i.) infection.

protein fraction	18wks a.i.	10wks a.i.	2wks a.i.	2wks p.i.	4wks p.i.	6wks p.i.	8wks p.i.
total protein	3.6	4.1	3.2	3.6	3.2	3.5	3.5
A/G-ratio	1.41	1.3	1.06	1.27	1.13	1.24	1.36
prealbumin (%)	0.6	2.2	5.4	2.7	3.2	1.2	0.9
albumin (%)	57.9	54.3	46.1	53.3	49.8	54.1	56.8
$\alpha$ -globulins (%)	23.7	22.5	26.8	27.5	24.3	24.8	26.2
$\beta$ -globulins (%)	12.7	13.2	13.1	11.3	14.6	13.8	10.7
$\gamma$ -globulins (%)	5.1	7.8	8.6	5.2	8.1	6.1	5.4
prealbumin abs.	0	0.1	0.2	0.1	0.1	0	0
albumin abs.	2.1	2.2	1.5	1.9	1.6	1.9	2
$\alpha$ -globulins abs.	0.9	0.9	0.9	1	0.8	0.9	0.9
$\beta$ -globulins abs.	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5	0.4
$\gamma$ -globulins abs.	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2



**Table S26** *Results of protein electrophoresis (as a percentage (%) and absolutely (g/dl)) of parrot P10 in weeks before (a.i.) and after (p.i.) infection.*

protein fraction	18wks	10wks	2wks	2wks	4wks	6wks	10wks	14wks	18wks	22wks	26wks	34wks	42wks
	a.i.	a.i.	a.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.
total protein	-	6.6	3.7	6.6	5.7	7.6	4.5	4.8	6.8	4.4	3.8	8.4	3.4
A/G-ratio	1.02	1.37	1.16	1.02	1.18	1.29	0.4	0.38	0.68	0.87	0.98	1.22	1.4
prealbumin (%)	3.1	1	0.9	1.1	2	0.8	1.5	0.8	1.1	1.2	0.9	1	1.5
albumin (%)	47.3	56.8	52.9	49.4	52.1	55.5	27.3	26.8	39.3	45.4	48.7	54	56.9
$\alpha$ -globulins (%)	26.2	18.3	27	24	24.6	18.9	13.9	15.5	16.2	16.9	24.1	21.8	22.1
$\beta$ -globulins (%)	18.6	16.8	16.6	18.5	15	19.5	53.4	32.1	22.7	20.8	13	13.8	11.7
$\gamma$ -globulins (%)	4.8	7.1	2.6	7	6.3	5.3	3.9	24.8	20.7	15.7	13.3	9.4	7.8
prealbumin abs.	-	0.1	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0.1	0	0.1	0.1
albumin abs.	-	3.7	2	3.3	3	4.2	1.2	1.3	2.7	2	1.9	4.5	1.9
$\alpha$ -globulins abs.	-	1.2	1	1.6	1.4	1.4	0.6	0.8	1.1	0.7	0.9	1.8	0.8
$\beta$ -globulins abs.	-	1.1	0.6	1.2	0.9	1.5	2.4	1.6	1.6	0.9	0.5	1.2	0.4
$\gamma$ -globulins abs.	-	0.5	0.1	0.5	0.4	0.4	0.2	1.2	1.4	0.7	0.5	0.8	0.3

**Table S27** *Results of protein electrophoresis (as a percentage (%) and absolutely (g/dl)) of parrot P11 in weeks before (a.i.) and after (p.i.) infection.*

protein fraction	18wks	10wks	2wks	2wks	4wks	6wks	10wks	14wks	18wks	22wks	26wks	34wks	42wks
	a.i.	a.i.	a.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.
total protein	4.4	6.9	4.2	4.7	6.6	5.4	5.6	6	9.5	4.2	4.3	5.7	3.3
A/G-ratio	1.08	1.38	1.14	1.15	1.15	1.16	1.3	1.05	0.62	0.57	0.66	1.31	1.11
prealbumin (%)	1.4	1.1	2.1	0.7	1.3	2.9	1.2	3.2	1.8	1.3	1.9	1.1	3.1
albumin (%)	50.6	56.9	51.2	52.7	52.1	50.7	55.4	48.1	36.4	35	38	55.6	49.4
$\alpha$ -globulins (%)	25.7	20	28.9	27.8	25.3	23.5	21.2	15.8	12.4	14.1	15.9	18.3	21.9
$\beta$ -globulins (%)	15.5	16.6	11.3	13.9	15	15.6	12.5	17	16.6	13.1	13.8	13.4	11.7
$\gamma$ -globulins (%)	6.8	5.4	6.5	4.9	6.3	7.3	9.7	15.9	32.8	36.5	30.4	11.6	13.9
prealbumin abs.	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
albumin abs.	2.2	4	2.2	2.5	3.4	2.7	3.1	2.9	3.5	1.5	1.6	3.2	1.7
$\alpha$ -globulins abs.	1.1	1.4	1.2	1.3	1.7	1.3	1.2	1	1.2	0.6	0.7	1	0.7
$\beta$ -globulins abs.	0.7	1.2	0.5	0.7	1	0.8	0.7	1	1.6	0.5	0.6	0.8	0.4
$\gamma$ -globulins abs.	0.3	0.4	0.3	0.2	0.4	0.4	0.5	1	3.1	1.5	1.3	0.7	0.5

**Table S28** Results of protein electrophoresis (as a percentage (%) and absolutely (g/dl)) of parrot P12 in weeks before (a.i.) and after (p.i.) infection.

protein fraction	18wks a.i.	10wks a.i.	2wks a.i.	2wks p.i.	4wks p.i.	6wks p.i.	10wks p.i.	14wks p.i.	18wks p.i.	22wks p.i.	26wks p.i.	34wks p.i.	42wks p.i.
total protein	3.5	4.1	2.8	3.5	3.5	3	3.5	3	3.2	3.7	2.9	3.3	2.8
A/G-ratio	0.98	1.05	0.86	0.96	0.93	0.88	0.96	0.96	0.91	0.78	0.91	0.98	1.01
prealbumin (%)	0.6	1.4	0.7	1.6	1.4	0.8	3.9	5.4	1.2	2.1	3.6	0.7	4.5
albumin (%)	49	49.9	45.5	47.3	46.8	45.9	45	43.7	46.4	41.6	44	48.9	45.8
$\alpha$ -globulins (%)	28.9	22.7	34.7	27.6	27.4	29.9	24.7	28	24	22.4	22.9	27.2	27.8
$\beta$ -globulins (%)	15.7	17.9	11.9	17.7	18.1	18.6	16	13.4	6.8	21.4	19.8	15.6	14.5
$\gamma$ -globulins (%)	5.8	8.1	7.2	5.8	6.3	4.8	10.4	9.5	21.6	12.5	9.7	7.6	7.4
prealbumin abs.	0	0.1	0	0.1	0.1	0	0.1	0.2	0	0.1	0.1	0	0.1
albumin abs.	1.7	2	1.3	1.7	1.6	1.4	1.6	1.3	1.5	1.6	1.3	1.6	1.3
$\alpha$ -globulins abs.	1	0.9	1	1	1	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.7	0.9	0.8
$\beta$ -globulins abs.	0.6	0.7	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.2	0.8	0.6	0.5	0.4
$\gamma$ -globulins abs.	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.4	0.2	0.7	0.5	0.3	0.3	0.2

## **IX. DANKSAGUNG**

An erster Stelle danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende fachliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Rüdiger Korbel für die Möglichkeit diese Dissertation an der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische anzufertigen, die großzügige Unterstützung und die schöne und lehrreiche Zeit an der Klinik.

Außerdem möchte ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische für ihre vielfältige Hilfe und Unterstützung danken. Insbesondere Lisa Koch und den Azubis in der Virologie für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden, die Unterstützung bei der Durchführung unzähliger ELISA- und PCR-Untersuchungen und die Betreuung der Papageien. Vielen Dank auch an Dr. Kristina Moser, Dr. Andrea Peschel, Nancy Schmitt und Martina Rzepka für die Hilfe bei der Blutentnahme und Untersuchung.

Ein großes Dankeschön auch an meinen Freund Ulrich Vögele für die Erstellung sämtlicher Grafiken und Tabellen, die Behebung aller Computer-Probleme und seine grenzenlose Geduld.

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern für die große Unterstützung und Motivation während des gesamten Studiums und der Promotion und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.