

Aus der Klein- und Heimtierklinik
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Anwendbarkeit der neurologischen Untersuchung bei
ausgewählten Vogelspezies und Charakterisierung einer Erkrankung mit
neurologischen Symptomen durch das West-Nil-Virus bei
Habichten (*Accipiter gentilis*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sina Feyer
Tierärztin
aus Celle

Berlin 2024

Journal-Nr.: 4487

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler |
| Erste Gutachterin: | PD Dr. Kerstin Müller |
| Zweiter Gutachter: | PD Dr. Lars Mundhenk |
| Dritter Gutachter: | Prof. Dr. Isabelle Ruhnke |

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

birds, predatory birds, neurology, examination, flavivirus, vector-borne diseases,
Accipiter gentilis, west nil virus

Tag der Promotion: 06.09.2024

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Tabellenverzeichnis..... | III |
| Abbildungsverzeichnis..... | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Literatur | 3 |
| 2.1 Der neurologische Untersuchungsgang | 3 |
| 2.2 Ziel des neurologischen Untersuchungsganges: Die neuroanatomische Lokalisation ... | 4 |
| 2.3 Ablauf des neurologischen Untersuchungsganges bei Vögeln | 4 |
| 2.3.1 Untersuchung und Beurteilung von Bewusstsein, Haltung und Gangbild..... | 4 |
| 2.3.2 Untersuchung und Beurteilung der Kopfnerven | 5 |
| 2.3.3 Beurteilung der Haltungs- und Stellreaktionen..... | 9 |
| 2.3.4 Beurteilung der spinalen Reflexe | 10 |
| 2.4 Differenzialdiagnosen für neurologische Symptome bei Wildvögeln | 10 |
| 2.4.1 Das West-Nil-Virus bei Wildvögeln | 12 |
| 2.4.1.1 Das Virus | 12 |
| 2.4.1.2 Verbreitung | 12 |
| 2.4.1.3 Pathogenese | 13 |
| 2.4.1.4 Klinisches Erkrankungsbild bei Habicht..... | 14 |
| 2.4.1.5 Labordiagnostischer Nachweis einer WNV-Infektion bei Vögeln | 14 |
| 3. Eigene Untersuchungen..... | 15 |
| 3.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen | 15 |
| 3.1.1 Studie 1 | 15 |
| 3.1.2 Studie 2 | 26 |
| 4. Diskussion..... | 40 |
| 4.1 Anwendbarkeit des neurologischen Untersuchungsganges bei gesunden Vögeln | 40 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Klinische Präsentation und Diagnosestellung bei Habichten mit WNV-Infektion..... | 42 |
| 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick..... | 47 |
| 5. Zusammenfassung..... | 48 |
| 6. Summary..... | 50 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 52 |
| 8. Publikationsverzeichnis..... | 65 |
| 8.1 Eigene Untersuchungen..... | 65 |
| 8.2 Kongressbeiträge über die eigenen Untersuchungen..... | 65 |
| Danksagung..... | 67 |
| Finanzierungsquellen..... | 68 |
| Interessenskonflikte..... | 68 |
| Selbstständigkeitserklärung..... | 69 |

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die Gehirnnerven (GN), ihre jeweilige Funktion sowie die Tests, die zur Untersuchung bei Vögeln beschrieben wurden 5

Publikation 1:

Table 1: Composition (number of examined birds [N], species, weight and age [juvenile or adult]) of the three examination groups used for evaluation of a neurological examination protocol (Feyer et al. 2024)

Table 2: Results of the neurological examination of 42 clinically healthy feral and domestic pigeons (*Columba livia domestica*) (Feyer et al. 2024)

Table 3: Results of the neurological examination of 42 clinically healthy mute swans (*Cygnus olor*) (Feyer et al. 2024)

Table 4: Results of the neurological examination of clinically healthy common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and northern goshawks (*Accipiter gentilis*) (Feyer et al. 2024)

Table 5: Interobserver agreement (percent agreement and Gwet's AC1) between the neurological examinations of three raters examining 11 clinically healthy pigeons (*Columba livia domestica*) and 11 clinically healthy mute swans (*Cygnus olor*) (Feyer et al. 2024)

Publikation 2:

Table 1: Results of the blood analyses of eight goshawks (*Accipiter gentilis*) with fatal West Nile virus infection (Feyer et al. 2021)

Table 2: Age, body weight, neurological symptoms, neuroanatomical localization and other major clinical findings of the ten goshawks (*Accipiter gentilis*) with fatal West Nile virus infection (Feyer et al. 2021)

Table 3: Histopathological lesions most probably associated with West Nile virus (WNV) infection of ten infected goshawks (*Accipiter gentilis*) as well as immunohistochemical WNV antigen detection (polyclonal antibody OM8) in different tissues (Feyer et al. 2021)

Table 4: Virological results by West Nile virus (WNV)-specific quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays (INEID, FLI-WNF (Eiden et al., 2010)) and serological results by Ingenasa-ELISA and by WNV- and Usutu virus (USUV)-neutralization test (VNT) of the ten goshawks (*Accipiter gentilis*) with fatal WNV infection (Feyer et al. 2021)

Abbildungsverzeichnis

Publikation 1:

Figure 1: Proportion of healthy pigeons ($n = 42$) and mute swans ($n = 42$) in which a response to each neurological test could be evaluated (Feyer et al. 2024).

Publikation 2:

Figure 1: The brain, the eyes and the heart are hallmark-organs for the histopathological diagnosis of WNV disease in birds. Histologic sections of the cerebrum (a, b, c, d2), cerebellum (d4), meninges (d1), spinal cord (d3), eye (ciliary body (e1), pecten oculi (e2), retina (e3)) and heart (f) are illustrated (Feyer et al. 2021).

Figure 2: Immunohistochemical detection of WNV antigen in brain and different tissue samples (Feyer et al. 2021).

Figure A 1: (a) Brain (cerebrum), (b) kidney and (c) heart of a goshawk from a routine submission without a WNV infection, Bar 50 μm ; the examination of this negative control was done with an in-house polyclonal antibody specific for WNV (pab OM8) (Feyer et al. 2021).

Figure A 2: Sections of physiological eye tissues (ciliary body (a1), pecten oculi (b1) and retina (c1)) from a hooded crow (*Corvus cornix*) in comparison with identical locations (ciliary body (a2), pecten oculi (b2) and retina (c2)) of WNV infected goshawks discussed in this article and shown in Figure 1e (Feyer et al. 2021).

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| AK | Antikörper |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| FU Berlin | Freie Universität Berlin |
| GN | Gehirnnerv |
| <i>M.</i> | <i>Musculus</i> |
| <i>Mm.</i> | <i>Musculi</i> |
| RT-qPCR | Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription |
| WNV | West-Nil-Virus |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1. Einleitung

Neurologische Symptome sind ein häufiger Vorstellungsgrund für Vögel in der veterinärmedizinischen Praxis und können zahlreiche Ursachen haben. Die neurologische Untersuchung ist ein wichtiger diagnostischer Schritt, der dazu dient, neurologische Symptome zu erkennen und die symptomauslösende Läsion innerhalb des Nervensystems einzugrenzen. Jedoch stellt die klinische Evaluation von Vogelpatienten dabei aus unterschiedlichen Gründen eine Herausforderung dar: So ist unklar, inwieweit der bei Kleintieren verwendete neurologische Untersuchungsgang auf verschiedene Vogelarten übertragbar ist. Die Unterschiede in Anatomie und Physiologie zwischen Vögeln und Säugetieren legen nahe, dass nicht alle Tests, die bei Kleintieren angewendet werden, gleichermaßen für Vögel geeignet sind. Angesichts der Vielfalt der Vogelarten sind zudem auch verschiedene Reaktionsmuster, beispielsweise von Beute- und Prädatoren-Spezies, zu erwarten. Die Kenntnis von arttypischen Verhaltensweisen und physiologischen Befunden der einzelnen Tests ist daher entscheidend, um eine neurologische Untersuchung aussagekräftig und stressarm für den Patienten zu gestalten und die Symptomatik neuroanatomisch einzuordnen. Die neuroanatomische Lokalisation bildet die Basis für die Einschätzung möglicher Differenzialdiagnosen und die Auswahl geeigneter diagnostischer Maßnahmen. Insbesondere für Wildvögel wird diese Einschätzung zusätzlich dadurch erschwert, dass häufig anamnestische Hinweise über Beginn und Verlauf der Symptomatik fehlen. Daneben sind in der Fachliteratur vollständige Beschreibungen klinischer Krankheitsbilder, wie beispielsweise die neuroanatomische Lokalisation und Befunde weiterführender diagnostischer Maßnahmen, oft nur spärlich vorhanden, da viele Wildvögel erst in sehr weit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium aufgefunden werden.

Ziel der eigenen Untersuchungen war die neurologische Untersuchung sowie die Diagnosestellung von Erkrankungen mit neurologischen Symptomen bei Vögeln zu verbessern.

Im Rahmen einer Studie wurde die Durchführbarkeit und Anwendbarkeit der neurologischen Untersuchung bei klinisch gesunden Individuen unterschiedlicher Vogelarten bewertet. Es wurden drei Untersuchungsgruppen gebildet, die Beute- und Räuberspezies repräsentieren. Die Auswahl der Vogelarten erfolgte anhand des Patientenaufkommens in der Klein- und Heimtierklinik der Freien Universität (FU) Berlin im Studienzeitraum und umfasste 42 Haustauben (*Columba livia domestica*), 42 Höckerschwäne (*Cygnus olor*) und 42 Greifvögel, darunter zwölf Mäusebussarde (*Buteo buteo*), 24 Turmfalken (*Falco tinnunculus*) und sechs Habichte (*Accipiter gentilis*).

Des Weiteren konnten die klinische Symptomatik und Diagnose einer Erkrankung mit neurologischen Symptomen bei einer Vogelart beschrieben werden. Im Jahr 2019 wurden

zehn freilebende Habichte mit neurologischen Symptomen in der Klein- und Heimtierklinik der FU Berlin vorgestellt, bei denen im weiteren Verlauf eine autochthon erworbene, klinisch manifeste Infektion mit dem West-Nil-Virus (WNV) nachgewiesen wurde. Die klinischen sowie pathologischen und virologischen Befunde dieser Fallserie wurden in einer weiteren Arbeit detailliert dargestellt.

2. Literatur

2.1 Der neurologische Untersuchungsgang

Die neurologische Untersuchung hat das Ziel neurologische Symptome zu erkennen und innerhalb des Nervensystems zu lokalisieren (de Lahunta et al. 2021). Nach einer ausführlichen Anamnese, inklusive Beurteilung des Signalements und einer klinischen Untersuchung, werden im Rahmen des neurologischen Untersuchungsganges das Bewusstsein, die Haltung und das Gangbild, die Kopfnerven, die Haltungs- und Stellreaktionen sowie die spinalen Reflexe beurteilt (de Lahunta et al. 2021).

Der systematische Untersuchungsgang ist für Kleintiere (Hunde und Katzen) in zahlreichen Lehrbüchern umfassend beschrieben (Gandini et al. 2007; Lorenz et al. 2011; Garosi und Lowrie 2013; Dewey und Da Costa 2015; de Lahunta et al. 2021) und einzelne Tests des Untersuchungsganges wurden an gesunden (Coulmance et al. 1979; Levine et al. 2002; Giebels et al. 2014; Giebels et al. 2019; Foss et al. 2021) und erkrankten Tieren validiert (Forterre et al. 2008; Hamdy et al. 2016; Boudreau et al. 2018; Bongartz et al. 2020). Nach Meinung von de Lahunta et al. (2021) kann der systematische neurologische Untersuchungsgang von Hunden auf jede Spezies adaptiert werden.

In den letzten Jahren wurden Studien zur Anwendbarkeit des neurologischen Untersuchungsganges bei gesunden Individuen verschiedener Kleinsäugerarten wie Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) (Warnefors et al. 2019; Tsai et al. 2023), Chinchillas (*Chinchilla lanigera*) (Snow et al. 2017), Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) (Dietzel et al. 2024) und Afrikanische Weißbauchigel (*Atelerix albiventris*) (Berg et al. 2021) sowie verschiedene Reptilienspezies (Hedley et al. 2021; Tarbert et al. 2022) veröffentlicht. Diese kamen zu dem Ergebnis, dass je nach Spezies bestimmte Tests nicht durchführbar, oder Adaptionen notwendig sind. Ein Teil der durchführbaren Tests konnte zudem gar nicht oder nicht zuverlässig ausgelöst werden. Beispielsweise war die Drohreaktion bei Kaninchen (Warnefors et al. 2019), Chinchillas (Snow et al. 2017) und Afrikanischen Weißbauchigeln (Berg et al. 2021) bei keinem Tier vorhanden.

In einzelnen Reviews (Clippinger et al. 1996; Jones und Orosz 1996; Clippinger et al. 2007; Hunt 2015) und Buchkapiteln (Platt 2006; Orosz und Antinoff 2016) wird ein adaptierter neurologischer Untersuchungsgang für Vögel beschrieben, der überwiegend auf der persönlichen Erfahrung der Autoren beruht. Lediglich für vereinzelte Kopfnerven-Tests wurden physiologische Befunde an gesunden Individuen verschiedener Vogelarten, fast ausnahmslos im Rahmen von ophthalmologischen Studien, ermittelt (Harris et al. 2008; Kuhn et al. 2013; Sandercock et al. 2014; Meekins et al. 2015; Wills et al. 2016; Ansari Mood et al. 2017; O'Connell et al. 2017; Park et al. 2017). Bestimmte Tests, wie die Drohreaktion, waren bei einigen Vogelarten gar nicht (Harris et al. 2008; Meekins et al. 2015; Wills et al. 2016; Hwang

et al. 2020) und bei anderen sehr zuverlässig auslösbar (Sandercock et al. 2014; Ansari Mood et al. 2017; Park et al. 2017).

2.2 Ziel des neurologischen Untersuchungsganges: Die neuroanatomische Lokalisation

Das Ziel einer neurologischen Untersuchung ist die neuroanatomische Eingrenzung des Krankheitsprozesses, um über geeignete weiterführende diagnostische Maßnahmen zu entscheiden und Verdachtsdiagnosen zu stellen (Jones und Orosz 1996; de Lahunta et al. 2021). Dazu wird anhand der Untersuchungsbefunde die symptomauslösende Läsion bei Kleintieren und Vögeln einer oder mehrerer neuroanatomischer Regionen zugeordnet: Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm, Vestibularapparat, Rückenmark und peripheres Nervensystem (periphere Nerven, neuromuskuläre Endplatte und Muskel) (Clippinger et al. 2007; Garosi 2013). Die neuroanatomische Lokalisation ergibt sich dabei aus der Gesamtheit aller neurologischen Defizite. Nur wenige Symptome oder Defizite lassen sich einzeln betrachtet bei Kleintieren und Vögeln einer oder wenigen bestimmten Lokalisationen zuordnen (Clippinger et al. 2007; Loderstedt 2019) und werden in der folgenden Beschreibung des Ablaufes des neurologischen Untersuchungsganges bei Vögeln genannt.

2.3 Ablauf des neurologischen Untersuchungsganges bei Vögeln

2.3.1 Untersuchung und Beurteilung von Bewusstsein, Haltung und Gangbild

Zunächst werden, analog zu Kleintieren, das Bewusstsein, die Haltung und das Gangbild durch Beobachtung des Vogels beurteilt. Eine eigenständige Bewertung des Flugbildes wird in diesem Zusammenhang in den vorhandenen Publikationen nicht thematisiert. Der Bewusstseinszustand wird als normal bewertet, wenn der Vogel aufmerksam ist und angemessen auf die aktuelle Situation, in der er sich befindet, reagiert (Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016). Apathie, Stupor und Koma sind dabei Veränderungen im Bewusstseinsniveau, die am wahrscheinlichsten auf eine Lokalisation im Bereich des Großhirns oder Stammhirns hindeuten (Jones und Orosz 1996; Platt 2006; Clippinger et al. 2007).

Als Haltung wird sowohl die Position des gesamten Körpers im Verhältnis zur Schwerkraft als auch die Position der Augen und des Kopfes in Bezug auf den Körper in Ruhe beschrieben (Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016). Der Vogel sollte dabei aufrecht, je nach Vogelart auf einer Stange sitzend, stehen können und den Kopf ebenfalls in aufrechter Position halten (Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016). Veränderungen in der Haltung können sich beispielsweise als Kopfschiefhaltung oder Opisthotonus darstellen (Orosz und Antinoff 2016). Eine Kopfschiefhaltung ist dabei relativ wahrscheinlich auf den Vestibularapparat zu

lokalisieren, ein Opisthotonus hinweisend auf eine Läsion im Kleinhirn oder Hirnstamm (Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016).

Bei der Beurteilung des Gangbildes wird die Fähigkeit, koordinierte, bewusste Bewegungen auszuführen, bewertet (Clippinger et al. 2007). Gangbildstörungen können sich dabei als Ataxien (Störung in der Bewegungskoordination), Paresen oder Plegien (unvollständiger oder vollständiger Verlust der Fähigkeit willkürliche Bewegungen auszuführen), Kreislaufen, Dysmetrien (Veränderungen in der Schrittlänge) sowie in abnormalen, unwillkürlichen Bewegungen (Tremor, Myoklonien, Krampfanfälle) äußern (Jones und Orosz 1996; Clippinger et al. 2007). Paraparesen, d.h. Lähmungserscheinungen der Hintergliedmaßen bei unbetreffenen Flügeln, lassen sich dabei relativ wahrscheinlich auf eine Läsion im Bereich des Rückenmarks, spezifischer auf Rückenmarksabschnitte kaudal des brachialen Plexus bei Vögeln zuordnen (Clippinger et al. 2007).

2.3.2 Untersuchung und Beurteilung der Kopfnerven

Analog zu Säugetieren gibt es bei Vögeln zwölf Gehirnnervenpaare, die von I bis XII nummeriert werden (Frewein und Sinowatz 2004). Jeder Gehirnnerv (GN) hat eine unterschiedliche Rolle bei der Kontrolle verschiedener Funktionen von Muskeln oder Drüsen im Bereich des Kopfes (Platt 2006). Aufgrund ihrer anatomischen Lage spielt die Untersuchung der Kopfnerven eine entscheidende Rolle bei der Lokalisation von Läsionen (Jones und Orosz 1996; Orosz 1996; Platt 2006; Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016). Mit Ausnahme der GN I und II, deren zentrale Bahnen durch das Telencephalon und Diencephalon verlaufen, liegen die Kerne der übrigen GN im Hirnstamm (Orosz 1996; Frewein und Sinowatz 2004; Orosz und Antinoff 2016). Eine Reihe von Tests können verwendet werden, um die Funktion einzelner oder verschiedener Kombinationen von GN bei Vögeln zu bewerten (Tabelle 1), wobei in den vorhandenen Publikationen überwiegend keine spezifischen Vogelarten angegeben werden (Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016).

Tabelle 1: Überblick über die Gehirnnerven (GN), ihre jeweilige Funktion sowie die Tests, die zur Untersuchung bei Vögeln beschrieben wurden

(Orosz 1996; Frewein und Sinowatz 2004; Platt 2006; Clippinger et al. 2007; Hunt 2015)

| Gehirnnerv (GN) | Nervale Funktion | Anwendbare Tests |
|-------------------------------------|------------------|--|
| <i>Nervus olfactorius</i> (GN I) | Geruchssinn | Eventuelle Reaktion auf einen starken Geruch, wie beispielsweise Alkohol |
| <i>Nervus opticus</i> (GN II) | Sehsinn | Drohreaktion |
| | | Direkter Pupillarreflex |

Mm.: Musculi, *M.:* Musculus

Fortsetzung Tabelle 1: Überblick über die Gehirnnerven (GN), ihre jeweilige Funktion sowie die Tests, die zur Untersuchung bei Vögeln beschrieben wurden

| Gehirnnerv (GN) | Nervale Funktion | Anwendbare Tests |
|---|--|---|
| <i>Nervus oculomotorius</i> (GN III) | Motorische Innervation der <i>Mm. recti medialis, ventralis</i> und <i>dorsalis</i> , des <i>M. obliquus ventralis</i> und des <i>M. levator palpebrae superioris</i> des Oberlides | Position des Augapfels |
| | | Drohreaktion |
| | Parasympathische Innervation der glatten Muskulatur des Ziliarkörpers und des <i>M. levator palpebrae superioris</i> | Direkter Pupillarreflex |
| <i>Nervus trochlearis</i> (GN IV) | Motorische Innervation des <i>M. obliquus dorsalis</i> | Position des Augapfels |
| <i>Nervus trigeminus</i> (GN V) | Sensible Innervation (als <i>Nervus ophthalmicus</i>) der Oberlider, der Stirnhaut und des rostralen Teils der Nasenhöhle und des Oberschnabels | Lidreflex Gesichtssensibilität Drohreaktion Beurteilung von Schnabelschluss und -tonus |
| | Sensible Innervation (als <i>Nervus maxillaris</i>) beide Augenlider und der Konjunktiva, des harten Gaumens, der Nasenhöhle und des seitlichen Oberschnabels | |
| | Motorische Innervation (als <i>Nervus mandibularis</i>) der Augenringmuskeln, des unteren Lidmuskels, der Kiefermuskulatur und sensible Innervation des Unterschnabels, der Haut und Schleimhaut der Schnabelwinkel sowie des Bodens des Oropharynx | |
| <i>Nervus abducens</i> (GN VI) | Motorische Innervation des <i>M. rectus lateralis</i> | Position des Augapfels |
| | Motorische Innervation der Nickhautmuskulatur (<i>M. pyramidalis</i> und <i>M. quadratus</i>) | Schluss des dritten Augenlides |

Mm.: Musculi, *M.:* Musculus

Fortsetzung Tabelle 1: Überblick über die Gehirnnerven (GN), ihre jeweilige Funktion sowie die Tests, die zur Untersuchung bei Vögeln beschrieben wurden

| Gehirnnerv (GN) | Nervale Funktion | Anwendbare Tests |
|---|--|---------------------------------------|
| <i>Nervus facialis</i> (GN VII) | Motorische Innervation der Mimikmuskulatur; parasymphatische Innervation vieler Drüsen des Kopfes (Tränendrüsen, Schleimdrüsen); artspezifisch sensorische Innervation von Geschmacksknospen | Nicht beurteilbar bei Vögeln |
| <i>Nervus vestibulo-cochlearis</i> (GN VIII) | Gehörsinn | Reaktion auf einen auditiven Stimulus |
| | Gleichgewichtssinn | Okulovestibuläre Reaktion |
| <i>Nervus glosso-pharyngealis</i> (GN IX) | Sensorische Innervation der Zunge (inklusive Geschmacksknospen) und Trachea; motorische Innervation der Muskulatur des Pharynx, Larynx, Kropf und Oesophagus | Schluckreflex |
| <i>Nervus vagus</i> (GN X) | Sensorische und motorische Innervation der Muskulatur des Pharynx, Larynx sowie motorische Innervation von Kropf und Oesophagus; parasymphatische Innervation von Drüsen und Viszera | Schluckreflex |
| <i>Nervus accessorius</i> (GN XI) | Motorische Innervation der oberflächlichen Muskulatur des Nackens und der kranialen Muskulatur der Skapula | Keine |
| <i>Nervus hypoglossus</i> (GN XII) | Motorische Innervation von Zunge, Trachea und Syrinx | Adspektion der Zunge auf Symmetrie |

Mm.: Musculi, *M.:* Musculus

Die Drohreaktion ist eine erlernte Reaktion, die vom Großhirn als Reaktion auf ein plötzlich im nahen Sichtfeld auftretendes Objekt initiiert wird (Clippinger et al. 2007). Dabei wird eine plötzliche Handbewegung in Richtung eines Auges des Vogels durchgeführt und die Reaktion

bewertet (Lidschluss, eventuell auch Zurückbewegen des Kopfes) (Platt 2006). In den afferenten Anteil dieser Reaktion sind dabei die visuellen Bahnen (Retina, GN II, Großhirn) involviert, der efferente Anteil ist dagegen bisher nicht ausreichend untersucht, beteiligt sind aber das Großhirn und das ipsilaterale Kleinhirn (Platt 2006; Garosi und Lowrie 2013; de Lahunta et al. 2021). Im Gegensatz zu Säugetieren wird der Lidschluss bei Vögeln nicht durch den GN VII, sondern durch GN V initiiert (Jones und Orosz 1996).

Der Pupillarreflex wird überprüft, indem mit einem hellen Licht in jeweils ein Auge geleuchtet wird (Platt 2006). Der Einfall des hellen Lichtes führt dabei zu einer Konstriktion der Pupille (Clippinger et al. 2007). Mit diesem Test wird die Funktion von GN II (Wahrnehmung des Lichtes) und GN III (Konstriktion der Pupille über parasymphatische Anteile) getestet (Platt 2006; Clippinger et al. 2007). Im Gegensatz zu Säugetieren wird bei Vögeln der indirekte Pupillarreflex nicht überprüft, da es aufgrund der vollständigen Kreuzung der Sehnervenfasern im Chiasma opticum bei einem Lichtreiz nicht zu einer Konstriktion der kontralateralen Pupille kommt (Platt 2006; Clippinger et al. 2007). Die quergestreifte Muskulatur in der Iris (Frewein und Sinowatz 2004) ermöglicht Vögeln zudem auch eine willkürliche Kontrolle der Pupillengröße, die zu einer Abschwächung oder Fehlen des Pupillarreflexes führen kann (Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016). Zudem kann Stress durch Handling während der Untersuchung durch einen erhöhten Sympathikotonus den Pupillarreflex beeinflussen (Clippinger et al. 2007; Orosz und Antinoff 2016).

Abweichungen in der Position des Augapfels von der zentralen Achse geben Hinweise auf Dysfunktionen der GN III (ventrolaterale Deviation), GN IV (dorsolaterale Deviation) und GN VI (mediale Deviation) (Clippinger et al. 2007).

Die Gesichtssensibilität sowie der Lidreflex werden vom GN V vermittelt (Clippinger et al. 2007). Eine Berührung des medialen Augenwinkels sollte dabei zu einem Lidschluss führen, die Gesichtssensibilität ist dagegen nur eingeschränkt zu beurteilen, da Vögel keine beziehungsweise (bzw.) eine stark reduzierte Mimikmuskulatur besitzen (Jones und Orosz 1996; Orosz 1996; Clippinger et al. 2007).

Die auditive Funktion des GN VIII wird mit der Reaktion auf einen plötzlichen, auditiven Stimulus (wie zum Beispiel (z.B.) ein Pfeifen) bewertet (Orosz und Antinoff 2016).

Der vestibuläre Anteil des Nervens kann mittels der okulovestibulären Reaktion beurteilt werden, bei der ein physiologischer Nystagmus mit der schnellen Phase in Richtung der Bewegung ausgelöst wird, wenn der Kopf in einer horizontalen Ebene hin und her bewegt wird (Platt 2006; Orosz und Antinoff 2016). Mit diesem Test werden auch die motorischen Anteile der GN III, IV und VI überprüft (Clippinger et al. 2007). Ein pathologischer Nystagmus ist ein Symptom, das sich relativ wahrscheinlich auf den Vestibularapparat lokalisieren lässt (Clippinger et al. 2007).

Die GN IX, X, XI und XII besitzen bei Vögeln zahlreiche Anastomosen, wodurch die Unterscheidung spezifischer Nervenbeteiligungen erschwert wird (Jones und Orosz 1996; Clippinger et al. 2007). Der Schluckreflex kann zur Beurteilung der Funktion von GN IX und X herangezogen werden (Jones und Orosz 1996; Orosz und Antinoff 2016). Dazu wird der Schnabel geöffnet und ein Finger im Schnabelwinkel platziert, um den Schnabel geöffnet zu halten. Der Oropharynx und die Zunge werden dann mit einem Wattestäbchen berührt, um einen Schluckvorgang zu provozieren (Hunt 2015).

2.3.3 Beurteilung der Haltungs- und Stellreaktionen

Die komplexen Reaktionen, die eine physiologische Körperhaltung sicherstellen, werden als Haltungs- und Stellreaktionen bezeichnet (Clippinger et al. 2007; Lorenz et al. 2011). Diese Reaktionen werden über komplexe neurologische (propriozeptive und motorische) Leitungsbahnen vermittelt, die das gesamte Nervensystem involvieren (Clippinger et al. 2007). Das Ziel dieser Tests bei Kleintieren ist es, subtile Defizite zu erkennen, die während der Gang- und Haltungsbeurteilung möglicherweise nicht offensichtlich sind sowie diese von z.B. orthopädischen Erkrankungen zu unterscheiden (Garosi und Lowrie 2013; Dewey und Da Costa 2015). Aufgrund des komplexen Ablaufs der Haltungs- und Stellreaktionen sind abnorme Befunde bei Kleintieren jedoch nicht geeignet, um eine Läsion innerhalb des Nervensystems zu lokalisieren (Garosi und Lowrie 2013). Bei Vögeln sind diese Tests bisher nicht untersucht, es finden sich in der Literatur allerdings Vorschläge für Adaptionen von Kleintieren (Jones und Orosz 1996; Orosz und Antinoff 2016).

Zur Überprüfung dieser Reaktionen wird grundsätzlich eine Gliedmaße in eine abnormale Position gebracht und die korrigierende Antwort des Tieres bewertet (Clippinger et al. 2007). Die für Vögel beschriebenen Tests umfassen überwiegend die „Drop and flap“-Reaktion, die Korrekturreaktion der Flügel und Zehen, die Unterstütsungsreaktion und die Hüpfreaktion (Platt 2006; Clippinger et al. 2007). Bei der „Drop and flap“-Reaktion wird der Vogel am Körper umfasst, hochgehalten und ein Fall aus der Höhe simuliert. Die physiologische Reaktion ist, dass beide Flügel gleichmäßig schlagen (Clippinger et al. 2007).

Die Korrekturreaktionen werden überprüft, indem abwechselnd auf jeder Seite die Flügel jeweils ausgezogen und die nach kranial gerichteten Zehen gleichzeitig auf ihre Dorsalfläche gestellt werden. Der Vogel sollte diese Position unmittelbar korrigieren (Platt 2006; Clippinger et al. 2007).

Bei der Unterstütsungsreaktion wird der Körper des Vogels umfasst und angehoben, sodass die Hintergliedmaßen keinen Bodenkontakt mehr aufweisen. Anschließend wird das Tier dem Boden angenähert. Kurz vor oder bei Bodenkontakt sollte es zu einer Extension der Ständer kommen. Im Anschluss wird der Vogel rückwärts bewegt und sollte dabei kurze Schritte rückwärts machen (Clippinger et al. 2007).

Die Hüpfreaktion wird durchgeführt, indem der Vogel so umfasst wird, dass nur jeweils ein Bein den Boden berührt. Im Anschluss wird der Vogel seitwärts gedrängt. Dabei sollte das Tier sein Gewicht mit der anderen Hintergliedmaße in einer hüpfenden Bewegung auffangen (Clippinger et al. 2007).

2.3.4 Beurteilung der spinalen Reflexe

Die Integrität der Reflexbögen sowie der Einfluss des Gehirns auf die Reflexbögen wird durch die Untersuchung der spinalen Reflexe bewertet (Platt 2006; Clippinger et al. 2007). Dabei handelt es sich um eine weiterführende Beurteilung des Gangbildes sowie der Haltungs- und Stellreaktionen, welche die Lokalisation der symptomauslösenden Läsion zu einem bestimmten Rückenmarksabschnitt oder einem bestimmten peripheren Nerv ermöglicht (Garosi 2009; Garosi und Lowrie 2013; Orosz und Antinoff 2016). Läsionen im Bereich des motorischen Anteils des Reflexbogens (dem sogenannten unteren motorischen Neuron) resultieren in einem verminderten oder fehlenden Reflex (Hyporeflexie oder Areflexie). Eine übersteigerte Reflexantwort (Hyperreflexie) entsteht bei einer Unterbrechung in den absteigenden motorischen Bahnen, die den Reflex modulieren (oberes motorisches Neuron) (Platt 2006; Clippinger et al. 2007; Garosi und Lowrie 2013). Verminderte Reflexe in einer oder allen vier Gliedmaßen deuten eher auf eine Läsion im peripheren Nervensystem hin (neuromuskuläre Lokalisation), als auf eine spinale Läsion (Loderstedt 2019).

Bei Vögeln sind der Kloakenreflex, der Flexorreflex, der Patellarsehnenreflex und der Gastrocnemiusreflex beschrieben (Platt 2006; Clippinger et al. 2007). Zur Überprüfung des Kloakenreflexes wird die Haut um die Kloake manuell gereizt, was zu einer Kontraktion des äußeren Sphinkters führen sollte (Platt 2006). Der Flexorreflex bewirkt ein Anziehen des Beines bzw. des Flügels als Reaktion auf einen Reiz der Zehenhaut und der Haut im Bereich des Digitus major des Flügels (Platt 2006; Clippinger et al. 2007). Der Patellarsehnenreflex wird durch die Perkussion der Patellarsehne ausgelöst und resultiert in einer Streckung des Kniegelenkes (Clippinger et al. 2007). Der Gastrocnemiusreflex bewirkt, nach Perkussion der Achillessehne, eine Streckung des Intertarsalgelenkes (Clippinger et al. 2007).

2.4 Differenzialdiagnosen für neurologische Symptome bei Wildvögeln

Anhand der neuroanatomischen Lokalisation am Ende der neurologischen Untersuchung erfolgt eine Einschätzung und gewichtete Auflistung möglicher Differenzialdiagnosen, die über weiterführende diagnostische Maßnahmen entscheiden (Loderstedt 2019; de Lahunta et al. 2021). Da in diese Arbeit überwiegend Wildvögel einbezogen wurden, wird der Schwerpunkt im Folgenden auf Erkrankungen von freilebenden Vögeln gelegt.

Als Ursachen für neurologische Symptome kommen degenerative, neoplastische, nutritive, entzündliche (infektiös und nicht-infektiös), immunmedierte, traumatische, metabolische, toxische und vaskuläre Erkrankungen sowie Anomalien des Nervensystems in Frage (Lorenz et al. 2011; de Lahunta et al. 2021).

Bei Wildvögeln sind traumatische Verletzungen grundsätzlich häufig (Le Souëf et al. 2015; Cococchetta et al. 2022) und dementsprechend auch häufige Ursache von neurologischen Symptomen wie z.B. Paresen oder Plegien durch Rückenmarksverletzungen oder Schädel-Hirn-Traumata (Stauber et al. 2007; Jolly 2015). Neben toxischen Ursachen, wie Intoxikationen durch Blei oder Organophosphate bzw. Carbamate (Müller et al. 2007; Manning et al. 2019), oder Botulismus (Gutiérrez-Arnal und Marín 2024), sind zudem infektiös-entzündliche Ätiologien für neurologische Symptome beschrieben: Zahlreiche bakterielle Erreger, wie z.B. *Clostridium piliforme*, *Chlamydia* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. und *Salmonella* sp., kommen als Auslöser von Meningitiden, Enzephalitiden und Myelitiden in Frage, sind allerdings bei Wildvögeln seltener beschrieben als bei gehaltenen Vögeln (Benskin et al. 2009; Seguel et al. 2012; Mete et al. 2017; Struthers und Schmidt 2024). Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS) durch Protozoen, darunter vor allem *Sarcocystis* sp. (Olias et al. 2010; Ziegler et al. 2018; Bamac et al. 2020), oder durch aberrante Wanderungen von Nematoden wie *Serratospiculum tendo* (Fischer et al. 2020) oder *Baylisascaris procyonis* (Struthers und Schmidt 2024) kommen gelegentlich bei Wildvögeln vor. Eine Vielzahl an Viren aus den Familien *Adenoviridae*, *Bornaviridae*, *Flaviviridae*, *Orthoherpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* und *Togaviridae* sind als Erreger von ZNS-Erkrankungen bei Wildvögeln beschrieben (Struthers und Schmidt 2024). Insbesondere aufgrund des zoonotischen Potenzials nehmen die Influenzaviren und Flaviviren eine bedeutene Rolle ein. Neben den hochpathogenen aviären Influenzaviren, die aktuell für eine nahezu globale Panzootie mit Mortalitäten in bislang ungekanntem Ausmaß bei Wildvögeln verantwortlich sind (Abdelwhab und Mettenleiter 2023; Abdelwhab und Beer 2024), ist auch das West-Nil-Virus (WNV) als Auslöser neurologischer Symptome bei verschiedenen Wildvögeln und Säugetieren inklusive des Menschen in den letzten Jahren in Europa von zunehmender Relevanz (Ziegler et al. 2022). Aus diesem Grund zählt in Deutschland eine WNV-Infektion bei Vögeln und Equiden zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen (BEML 2011). Eine nationale Bekämpfungsverordnung ist bisher nicht vorhanden.

2.4.1 Das West-Nil-Virus bei Wildvögeln

2.4.1.1 Das Virus

Das WNV ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus und zählt zu den, durch Arthropoden übertragenen, zoonotischen Flaviviren (Weissenböck et al. 2010). Es gehört, wie z.B. das Usutu-Virus, zum Antigenkomplex des Japanischen-Enzephalitis-Virus (David und Abraham 2016). Phylogenetisch sind aktuell neun Linien des WNV bekannt, von denen bisher vor allem die Linien eins und zwei für die Mehrzahl der festgestellten Infektionen verantwortlich sind (Ziegler et al. 2022; Simonin 2024). Das Virus wurde bisher bei über 300 Vogelarten (Centers for Disease Control and Prevention 1999-2016), über 100 verschiedenen Säugetierarten inklusive des Menschen sowie Reptilien und Amphibien festgestellt (Root und Bosco-Lauth 2019; Simonin 2024). Das WNV zirkuliert enzootisch vornehmlich zwischen ornithophilen Mücken, v.a. der Gattung *Culex*, als Vektor und zahlreichen Wildvogelarten, die eine Virämie ausbilden und als Amplifikationswirt und Reservoir fungieren (David und Abraham 2016). Säugetierwirte entwickeln dagegen in der Regel keine ausreichende Virämie, um Mücken zu infizieren, auch wenn klinische Erkrankungen auftreten (David und Abraham 2016). Neben der Übertragung über blutsaugende Arthropoden, sind experimentell bei Vögeln auch orale Infektionsrouten über infizierte Mücken oder Beutetiere beschrieben (Komar et al. 2003; Nemeth et al. 2006).

Die meisten Infektionen bei Menschen und Tieren verlaufen asymptomatisch, es kann jedoch, insbesondere bei bestimmten Vogelarten, Pferden und Menschen, auch zu einer neuroinvasiven Erkrankung kommen (Camp und Nowotny 2020; Simonin 2024). Bei Menschen kommt es bei circa 20 bis 30 % der Infizierten zu einer fieberhaften Allgemeinerkrankung, bei circa 1 % treten (Meningo-)enzephalitiden auf (Pacenti et al. 2020). Bei diesen Fällen liegt die Mortalität bei ungefähr 10 % (Pacenti et al. 2020).

2.4.1.2 Verbreitung

Das WNV wurde das erste Mal 1937 im ehemaligen West-Nil-Distrikt in Uganda als Erreger des West-Nil-Fiebers beim Menschen isoliert (Smithburn et al. 1940). Seitdem hat es sich auf nahezu alle Kontinente, mit Ausnahme von der Antarktis, ausgebreitet und wird aktuell als das geographisch am weitesten verbreitete Flavivirus angesehen, von dem ein beständiges Risiko für die globale Gesundheit von Menschen und Tieren ausgeht (David und Abraham 2016; Heidecke et al. 2023). Bis Mitte der 1990er Jahre kam es in Afrika, Eurasien, Australien und dem Nahen Osten eher zu sporadischen menschlichen Erkrankungsfällen (Hubálek und Halouzka 1999; Heidecke et al. 2023). Seit 1996 wurden vermehrte Infektionen bei Menschen und Pferden sowie auch zunehmend bei Wildvögeln an vielen Orten Europas beobachtet (Kramer et al. 2019). 1999 wurde das WNV Linie 1 erstmals in den USA nachgewiesen und es kam zu einer hohen Anzahl an perakut verlaufenden Erkrankungen mit hohen Mortalitäten

bei Wildvögeln und zahlreichen Enzephalitisfällen bei Menschen und Pferden (Kramer et al. 2019). Innerhalb von zehn Jahren breitete sich das Virus über den gesamten amerikanischen Kontinent aus (Kramer et al. 2019). Seitdem kommt es dort regelmäßig zu endemischen Ausbrüchen, sodass das WNV eine der häufigsten Ursachen für eine viral bedingte Enzephalitis beim Menschen darstellt (David und Abraham 2016; Kramer et al. 2019). In den letzten 20 Jahren hat sich die Verbreitung auch innerhalb Europas deutlich ausgeweitet (Simonin 2024) und die Frequenz der Ausbrüche, die Zahl an menschlichen Erkrankungen, als auch die Pathogenität für bestimmte Wildvogelarten nimmt zu (Perez-Ramirez et al. 2014). Im Jahr 2018, einem Jahr mit ungewöhnlich lang anhaltend hohen Temperaturen in ganz Europa, kam es zur bisher größten europäischen Epidemie (Camp und Nowotny 2020) und dem ersten Nachweis von WNV in Deutschland bei zwölf verstorbenen Vögeln und zwei Pferden (Ziegler et al. 2019a). Seitdem wurden jedes Jahr in Deutschland, vor allem in den östlichen Bundesländern, Erkrankungen und Todesfälle bei Wild- und Zoovögeln, Pferden und Menschen in unterschiedlichem Ausmaß in den Sommermonaten nachgewiesen (Ziegler et al. 2019b; Ziegler et al. 2020; Ziegler et al. 2022).

2.4.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese ist virus- und wirtsabhängig, verläuft bei Vögeln grundsätzlich aber in drei Phasen: Nach einer lokalen Infektion, auf die eine Virämie folgt, kommt es zu einer Ausbreitung und Replikation des Virus in verschiedensten Geweben und (je nach Immunantwort des Wirtes) zu einer Neuroinvasion (Gamino und Höfle 2013). Die Ausbildung einer klinischen Erkrankung resultiert dabei aus der Invasion des WNV ins ZNS und in andere wichtige Organsysteme (Leber, Niere, Milz, Herz) (Gamino und Höfle 2013).

Die Unterschiede im Verlauf einer Infektion zwischen verschiedenen Vogelarten und Individuen sind höchstwahrscheinlich das Resultat einer Kombination von Faktoren, die sowohl mit dem Wirt, dem Vektor als auch mit dem beteiligten Virusstamm zusammenhängen (Vidaña et al. 2020). Während einige Vogelarten oft keine Symptome ausbilden, sind andere Arten empfänglicher (Heidecke et al. 2023). Aus diesem Grund unterscheiden sich die durch das WNV verursachten klinischen Symptome und die Lokalisation und der Schweregrad der pathologischen Läsionen zwischen verschiedenen Spezies (Vidaña et al. 2020). In Europa sind Habichte häufiger von einer klinischen Erkrankung mit hoher Mortalität betroffen (Bakonyi et al. 2013; Csank et al. 2016; Busquets et al. 2019; Hubálek et al. 2019; Simonin 2024). Sie werden aus diesem Grund als Indikatorspezies für WNV-Ausbrüche in Europa bezeichnet (Wodak et al. 2011; Bakonyi et al. 2013; Hubalek et al. 2018). Auch unter den Vögeln, bei denen 2018 erstmals eine WNV-Infektion in Deutschland nachgewiesen wurde, waren vier Habichte (Ziegler et al. 2019a).

2.4.1.4 Klinisches Erkrankungsbild bei Habichten

Die klinischen Daten, die im Zusammenhang mit einer WNV-Infektion bei Habichten genannt sind, beschränken sich überwiegend auf eine kurze Auflistung der Symptome und umfassen Apathie, Inappetenz, Visuseinschränkungen und Blindheit, „zentralnervöse oder neurologische Symptome“, Tremor, Ataxie, Paresen, Krampfanfälle und Torticollis (Wünschmann et al. 2005; Bakonyi et al. 2006; Erdelyi et al. 2007; Wodak et al. 2011; Savini et al. 2013; Csank et al. 2016; Hubalek et al. 2018; Busquets et al. 2019; Hubálek et al. 2019). In den meisten dieser Fälle kam es sehr zeitnah nach Vorstellung zu einem Versterben oder einer Euthanasie der Vögel. Klinische Daten zu Befunden von neurologischen Untersuchungen und bildgebenden Verfahren sowie blutchemische und hämatologische Ergebnisse wurden bis zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen für freilebende Habichte mit WNV-Infektionen nicht publiziert.

2.4.1.5 Labordiagnostischer Nachweis einer WNV-Infektion bei Vögeln

Für die Diagnose einer WNV-Infektion bei Vögeln werden nach amtlicher Methodensammlung des nationalen Referenzlabors sowohl der Nachweis WNV-spezifischer Nukleinsäuren mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription (RT-qPCR) aus dem Blutkuchen einer Nativblutprobe oder aus Organgewebeproben als auch die Erregerisolierung aus Serum oder aus Organgewebeproben aufgeführt (Friedrich-Loeffler-Institut 2022). Zum indirekten Nachweis von Antikörpern (AK) sind für Vögel ein Immunglobulin G Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Neutralisationstests aus Serum oder Nativblut etabliert (Seidowski et al. 2010; Michel et al. 2019; Friedrich-Loeffler-Institut 2022).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

3.1.1 Studie 1

Titel: Neurological examination of clinically healthy pigeons (*Columba livia domestica*), mute swans (*Cygnus olor*), common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and northern goshawks (*Accipiter gentilis*).

Autoren: Feyer S, Loderstedt S, Halter-Gölkel L, Merle R, Zein S, Müller K

Jahr: 2024

Zeitschrift: Veterinary Record, Volume 194, Issue 4: e3828.

DOI: <https://doi.org/10.1002/vetr.3828>

Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Wissenschaftlicher Beitrag:

Sina Feyer (Erstautorin): Konzeption und Planung der Studie, Durchführung und Dokumentation aller neurologischer Untersuchungen, formale Analyse und Auswertung der Daten, Visualisierung der Ergebnisse und Erstellung des Manuskriptes

Shenja Loderstedt (Co-Autor): Mitwirkung bei der Konzeption und Planung sowie fachliche Begleitung der Studie, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Review und Editieren)

Lesley Halter-Gölkel und Stephanie Zein (Co-Autorinnen): Mitwirkung bei der Datenerhebung (Durchführung eines Teils der neurologischen Untersuchungen für die Beurteilung einer möglichen Interobserver-Variabilität), Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Review und Editieren)

Roswitha Merle (Co-Autorin): Mitwirkung bei der Planung der Studie (Fallzahlplanung), Mitwirkung bei der statistischen Analyse der Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Review und Editieren)

Kerstin Müller (Co-Autorin): Konzeption und Planung sowie fachliche Begleitung der Studie, Mitwirkung bei der Auswertung der Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Review und Editieren)

ORIGINAL RESEARCH

Neurological examination of clinically healthy pigeons (*Columba livia domestica*), mute swans (*Cygnus olor*), common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and northern goshawks (*Accipiter gentilis*)

Sina Feyer¹  | Shenja Loderstedt²  | Lesley Halter-Gölkel³  | Roswitha Merle⁴ |
Stephanie Zein¹  | Kerstin Müller¹ 

¹Small Animal Clinic, Unit for Small Mammals, Reptiles, Exotic and Wild Birds, School of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

²Small Animal Department, Neurology and Neurosurgery Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³Department of Reproduction Management, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany

⁴Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, School of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

Correspondence

Kerstin Müller, Small Animal Clinic, Unit for Small Mammals, Reptiles, Exotic and Wild Birds, School of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.
Email: Kerstin.Mueller@fu-berlin.de

Abstract

Background: A neurological examination is essential for determining the localisation of neurological lesions. However, in avian species, quantitative data regarding the practicability and feasibility of neurological tests are very limited. Therefore, the aim of this study was to establish normative data for the neurological examination of clinically healthy birds of different species.

Methods: Forty-two domestic and feral pigeons (*Columba livia domestica*), 42 mute swans (*Cygnus olor*), 12 common buzzards (*Buteo buteo*), 24 common kestrels (*Falco tinnunculus*) and six northern goshawks (*Accipiter gentilis*) were examined. All birds underwent a predefined neurological examination. Interobserver variations between three examiners were investigated in 11 pigeons and 11 mute swans.

Results: All postural reaction tests, except for the drop and flap reaction in mute swans, provoked a consistent response in pigeons and mute swans, whereas postural reaction tests of the legs in raptors were often not performable. Cranial nerve tests and most of the spinal reflexes revealed variable responses in all birds. The gastrocnemius reflex was not provokable in any bird. Interobserver agreement was almost perfect (Gwet's AC1 coefficient ≥ 0.81) for 16 of 21 parameters in the examination in pigeons and for 14 of 21 in mute swans.

Limitations: The inclusion of free-ranging birds, which were not used to handling and for which limited information regarding age, history of previous diseases, etc. was available, may have influenced the results.

Conclusion: The normative neurological examination data provided in this study will help improve clinicians' interpretation of neurological examination results in the respective bird species.

KEYWORDS

avian neurological examination, feral pigeons, mute swans, neurology, raptors

INTRODUCTION

Avian patients with neurological disorders are frequently presented to veterinary practices; however, examination of these patients can be challenging. The aim of a neurological examination is to identify the neuroanatomical localisation of the causative lesion(s) within the nervous system.¹ The neurological exami-

nation of small and large domestic animals has been described by several authors,^{1–3} with de Lahunta et al.¹ suggesting that the examination protocol used in a cooperative dog can be adapted to any other animal species.

In the recent literature, studies tested the applicability of modified neurological examinations in healthy exotic small mammals^{4–6} and reptile species.^{7,8} In

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Veterinary Record* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Veterinary Association.

these studies, certain neurological tests, such as the gag reflex in chinchillas⁵ and hedgehogs,⁴ were not performable due to anatomical reasons or handling challenges. Additionally, some responses or reflexes, such as the menace response or the perineal/cloacal reflex, were not provokable at all^{4–7} or only in a few individuals.⁸

Techniques for the neurological examination of birds described by several authors.^{9–13} However, normative data from healthy individuals, like they were obtained from the aforementioned small mammal^{4–6} and reptile^{7,8} species, are limited to neuro-ophthalmic tests in various avian species^{14–20} and cranial nerve reflexes in different states of consciousness in turkeys and layer hens.²¹

Given the differences in anatomy and physiology between birds and mammals, as well as the huge variety of avian species, it is likely that not all tests are equally useful for every species. Distinct reaction patterns between predator and prey species, as suggested for small mammals like rabbits,⁶ can also be assumed.

The purpose of this study was to evaluate the feasibility, applicability and interobserver agreement of neurological examinations in clinically neurologically unremarkable individuals of different avian species.

MATERIALS AND METHODS

Study design

To test the applicability of the neurological examination tests for a species, sample size calculation was performed using PASS (version 14.0.7). The power analysis using a one-sided exact test to detect a non-inferiority proportion of 0.75 (significance level of 0.05, power of 80%) resulted in a required sample size of 42 individuals per examination group.

For the interobserver agreement, birds were repeatedly examined by three different examiners. Due to animal welfare reasons, the group sizes were limited to 11 animals per species.

Birds

The study was registered and authorised by the Regional Office for Health and Social Affairs Berlin (LAGeSo) (no. A 0176/18).

To compare the data between different avian species, three examination groups were planned, representing prey and predator species. Individuals were mainly recruited from free-ranging birds presented to the Small Animal Clinic, Freie Universität Berlin, between 2018 and 2020. Species were chosen by frequency of presentation during the study period.

Group 1 consisted of feral and domestic pigeons (*Columba livia domestica*) and group 2 of mute swans (*Cygnus olor*). During the study period, common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and northern goshawks (*Accipiter gentilis*) were presented multiple times to the clinic. How-

ever, the number of individuals per species was less than the calculated group size of 42. Therefore, group 3 had to be excluded from the statistical analysis. The results of these examinations are included in the 'Results' section to illustrate trends of the examination in these species. Table 1 summarises group compositions including parameters such as number, species, age and weight.

The free-ranging birds were brought to the Small Animal Clinic by members of the public due to health concerns and were included in the study only after their full recovery. Additionally, 18 healthy domestic pigeons kept for research purposes were provided for examination by the Institute of Poultry Diseases, Freie Universität Berlin. A total of 126 birds were examined.

Prior to inclusion in the study, free-ranging individuals underwent further diagnostics (e.g., radiological examination) and case-dependent further treatment. Birds were included in the study when a full physical examination revealed no abnormal findings, thus considering them suitable for release. The bodyweight and age (adult or juvenile) of each bird were also recorded. The age was determined based on the plumage and colour of the bill, cere and iris, depending on the respective species.^{22–24} No nestlings were included. Due to the lack of pronounced sexual dimorphism in most of the examined species (with the exception of goshawks and adult kestrels), sex was not assessed in this study.

The free-ranging birds were hospitalised in single cages and the pigeons from the Institute of Poultry Diseases were kept as a group in an outdoor aviary.

Neurological examination

All birds underwent the same neurological examination by the first author (S.F.), who was previously trained by a board-certified veterinary neurologist (S.L.). The results of the examination were recorded on an examination form immediately afterwards. The feasibility of the test, as well as the observed responses (not performable; 2 = normal, 1 = decreased, 0 = absent), were noted.

To assess interobserver agreement, 11 animals from each of groups 1 and 2 were, in addition to the examination by the first author, examined by an exotic pet veterinarian and by a final-year veterinary student, both of whom had no prior training by a neurologist. The order of raters was randomised. They were provided with the same examination protocol form and a description of the tests (performance and expected response). Examinations were repeated three times in total by each examiner, with a maximum of two examinations per day for each bird.

The neurological tests and examinations were performed and modified where required (S.L.), based on the described information for birds^{9,10,12,13,25,26} and companion animals.¹ The neurological examination included mental status, gait, posture, cranial nerve tests, postural reactions and segmental spinal nerve assessment.

TABLE 1 Composition (number of examined birds [N], species, weight and age [juvenile or adult]) of the three examination groups used for evaluation of a neurological examination protocol

| Group | N | Species | Weight | Juvenile | Adult |
|-------|----|--|-------------------------------|----------|-------|
| 1 | 42 | Feral and domestic pigeon (<i>Columba livia domestica</i>) | 0.23–0.99 kg (median 0.35 kg) | 8 | 34 |
| 2 | 42 | Mute swan (<i>Cygnus olor</i>) | 5–12.8 kg (median 7.6 kg) | 13 | 29 |
| 3 | 12 | Common buzzard (<i>Buteo buteo</i>) | 0.56–1 kg (median 0.76 kg) | 3 | 9 |
| | 24 | Common kestrel (<i>Falco tinnunculus</i>) | 0.16–0.24 kg (median 0.22 kg) | 22 | 2 |
| | 6 | Northern goshawk (<i>Accipiter gentilis</i>) | 0.7–1.39 kg (median 0.93 kg) | 3 | 3 |

The birds were observed in their enclosures to evaluate their mental status, gait and posture. The mental status was evaluated as normal when the birds were bright and alert. Gait was assessed for any paresis, ataxia or lameness. Posture was considered normal in the raptor and pigeon groups when the birds were perched in an erect posture and in swans when the birds were standing straight with both legs bearing weight equally and the head in an upright position.

Birds were carefully restrained by an experienced assistant for testing the cranial nerves and the spinal reflexes. For postural reaction tests, birds were restrained by the examiner. Cranial nerve testing was performed first and comprised of the response to an auditory stimulus, menace response, palpebral and direct pupillary light reflex, assessment of facial symmetry, facial sensation, the oculocephalic reflex, gag reflex and closure and tone of the beak.

Finger snapping next to each ear without fixating the head was used to assess any reaction (head or body movement) to an auditory stimulus. The menace response was tested by moving the examiner's hand towards each eye and the palpebral reflex by touching the medial and lateral canthus of each eye using a cotton tip applicator. The expected response was a subsequent blink (closure of the eyelid or nictitating membrane). The direct pupillary light reflex was assessed by using a pen torch. The facial symmetry of the head, including its anatomical structures (feathers, eye position within the orbit, palpebral fissures), was also assessed.

Facial sensation was evaluated for any reaction while touching the skin of the forehead, the nares and the rictus with the wooden end of a cotton tip applicator. The oculocephalic reflex was elicited by moving the head of the bird in a horizontal plane to induce a physiological nystagmus. The gag reflex was provoked by opening the beak and touching the oropharynx with a cotton tip applicator, in this regard closure and tone of the beak were also evaluated.

Postural reactions were tested on an examination table in pigeons and raptors and on the floor in mute swans. Hopping was performed by holding one leg up and pushing the bird to the side to evaluate the compensatory response of the weight-bearing leg. The process was then repeated on the opposite leg. The bird was subsequently lowered to the ground or a table with unrestrained pelvic limbs and then pushed backwards to elicit the extensor postural thrust reaction; here, the pelvic limbs should bear weight and move in a walking fashion.

Foot and wing replacement were assessed by placing the foot repeatedly on its dorsal surface and by pulling each wing away from the body to evaluate if the bird readjusts the extremity to its normal position. The drop and flap reaction was evaluated by moving the bird downwards with unfixed wings to provoke flapping with both wings equally. During this process, the birds' legs were restrained with both hands while simultaneously providing support to the body with the hands during the downward motion.

Spinal nerve tests included examination of thoracic and pelvic limb withdrawal, patellar, gastrocnemius and vent sphincter reflexes. To test the withdrawal reflexes, a gentle pinch stimulus to the skin of each foot and the skin of the major digit of each wing with a haemostat was performed to generate flexion of the leg/wing. The patellar and the gastrocnemius reflex were tested by striking the respective tendon with a reflex hammer in swans and with the handle of a mosquito haemostat in pigeons and raptors to generate extension of the stifle (patellar reflex) or the hock (gastrocnemius reflex). For assessment of the vent sphincter reflex, the cloaca was gently pricked by a cotton tip applicator and observed for a contraction of the external sphincter.

The pectoralis muscle and the muscles of the legs were palpated for symmetry and tone in the latter. The head and neck were rotated to check for any pain or resistance.

Data analysis

Statistical analysis was performed using R (version 4.0.5). The 95% confidence interval for each test of the neurological examination was computed according to the Wilson score interval using the Hmisc package in R.

The interobserver agreement metrics were calculated using the irrCAC v.1.0 package in R. The percentage agreement between raters was determined for each test. The reliability of the observed agreements was also assessed using the kappa statistic. Since the Fleiss kappa calculation resulted in paradox results due to a skewed frequency distribution of given ratings,²⁷ the Gwet's AC1 coefficient, a more paradox-resistant beyond chance agreement coefficient,²⁸ was computed to evaluate interobserver agreement. According to Landis and Koch²⁹ Gwet's AC1 values were interpreted as the following: 0.20 or less = poor agreement, 0.21–0.40 = fair agreement,

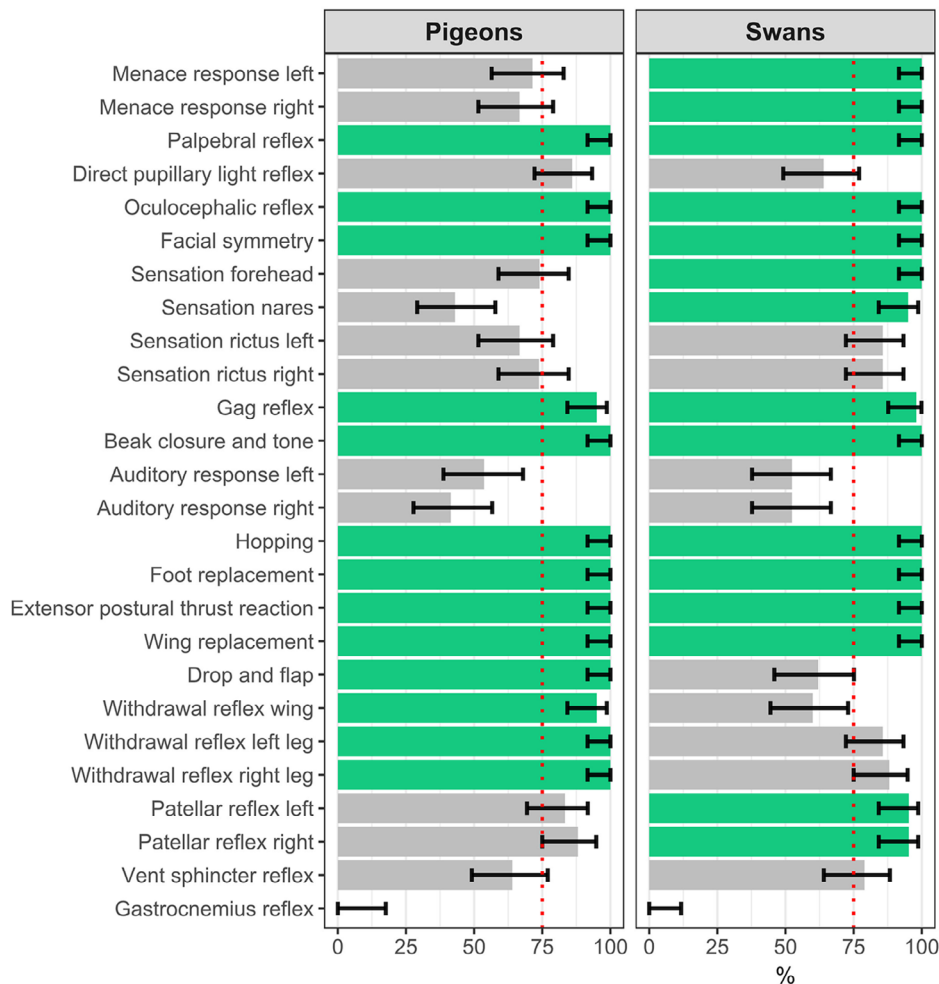


FIGURE 1 Proportion of healthy pigeons ($n = 42$) and mute swans ($n = 42$) in which a response to each neurological test could be evaluated. Bars are coloured in green if the lower confidence interval is above 75% (red dotted line), and hence the test can be considered useful for the concerned species

0.41–0.60 = moderate agreement, 0.61–0.80 = substantial agreement and 0.81–1 = almost perfect agreement.

RESULTS

In this study, a neurological test was considered useful for the total population of the species when a response was provokable and could be evaluated in 38 or more (>90%) of the 42 individuals of each group (Figure 1). The results for each species are summarised in Tables 2–4.

Physical examination was normal in all birds and every individual tolerated a full neurological examination. Mentation, gait, posture, symmetry and tone of muscles, as well as head and neck movement, were determined to be normal in all animals.

Cranial nerve tests

Facial symmetry and the closure and tone of the beak were normal in all subjects of all groups. The oculocephalic and palpebral reflex could be induced in all birds, and the gag reflex was consis-

tently provokable in swans (41/42, 98%) and pigeons (40/42, 95%).

A menace response was present in all swans, but only in 30 (71%) of the pigeons. In two pigeons, there was a positive result in only one eye. In all three raptor species, the menace response was regularly absent. Notably, when testing the menace response and palpebral reflex, closure of the nictitating membrane rather than the eyelid appeared in all swans. This finding was also observed in all three raptor species, except for single kestrels that closed their eyelids. In contrast, most pigeons blinked with their eyelid (menace response 27/30, 90%; palpebral reflex 41/42, 98%).

Facial sensation testing was most successful in swans, when touching the forehead (42/42, 100%) or nares (40/42, 95%). In the other groups, responses were seen irregularly.

Direct pupillary light reflex and auditory response testing revealed inconsistent results in all groups.

Postural reactions

Most postural reaction tests (hopping, foot and wing replacement, extensor postural thrust reaction) were

TABLE 2 Results of the neurological examination of 42 clinically healthy feral and domestic pigeons (*Columba livia domestica*)

| Neurological parameter | Positive response/successfully tested birds | | Positive response | | 95% confidence interval (%) | |
|-----------------------------------|---|-------|-------------------|-------|-----------------------------|-------------|
| | Left | Right | Left | Right | Left | Right |
| Cranial nerves | | | | | | |
| Menace response | 30/42 | 28/42 | 71% | 67% | 56.43–82.83 | 51.55–78.99 |
| Palpebral reflex | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Direct pupillary light reflex | | 36/42 | | 86% | | 72.16–93.28 |
| Oculocephalic reflex | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Facial symmetry | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Sensation forehead | | 31/42 | | 74% | | 58.93–84.70 |
| Sensation nares | | 18/42 | | 43% | | 29.12–57.79 |
| Sensation rictus | 28/42 | 31/42 | 67% | 74% | 51.55–78.99 | 58.93–84.70 |
| Gag reflex | | 40/42 | | 95% | | 84.21–98.68 |
| Beak closure and tone | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Auditory response | 22/41 | 17/41 | 54% | 41% | 38.75–67.94 | 27.76–56.63 |
| Postural reactions | | | | | | |
| Hopping | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Foot replacement | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Extensor postural thrust reaction | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Wing replacement | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Drop and flap | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Spinal reflexes | | | | | | |
| Withdrawal reflex wing | | 40/42 | | 95% | | 84.21–98.68 |
| Withdrawal reflex leg | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Patellar reflex | 35/42 | 37/42 | 83% | 88% | 69.40–91.68 | 75.00–94.81 |
| Vent sphincter reflex | | 27/42 | | 64% | | 49.17–77.01 |
| Gastrocnemius reflex | | 0/18 | | 0% | | 0–17.59 |

successfully completed and assessed in all 42 (100%) pigeons and swans.

In raptors, the postural reaction tests of the pelvic limbs could often not be carried out because individuals (especially goshawks and kestrels) did not tolerate testing and reacted with pronounced defensive behaviour. Furthermore, examiners were required to release their hold on the pelvic limbs of the raptors, which led to inadequate restraint and an increased potential for injuries caused by the raptors' talons. The drop and flap reaction could be elicited in all pigeons and raptors, but the expected wing flapping was absent in 15 of 39 (38%) swans. In three swans, this test could not be performed due to difficulties in lifting these birds.

Spinal reflexes

All pigeons and raptors exhibited a withdrawal reflex of the legs. Meanwhile, in swans, it was not provokable in five of 42 (12%) animals and was only present in one leg in another. In the swan and raptor groups, the patellar reflex was positive in all birds except one kestrel and two swans. The patellar reflex

could also be elicited in 37 of 42 (88%) pigeons, but in two pigeons it was only positive in one leg.

The vent sphincter reflex testing resulted in variable responses (33/42 [79%] swans; 27/42 [64%] pigeons; 7/12 [58%] buzzards; 5/6 [83%] goshawks; 21/24 [88%] kestrels). The gastrocnemius reflex was absent in all animals of all groups.

Interobserver agreement

Interobserver agreement was assessed for pigeons and mute swans (Table 5).

The three examiners agreed almost perfectly (Gwet's AC1 0.81–1) in most of the cranial nerve tests. Substantial agreement (Gwet's AC1 0.61–0.8) was noted for the pupillary light reflex in both groups, the sensation of the nares in pigeons and the auditory response in swans, while moderate agreement (Gwet's AC1 0.41–0.6) was noted for the auditory response in pigeons.

Interobserver agreement was almost perfect in all postural reaction tests in both species except the drop and flap reaction in mute swan, where only moderate agreement was observed.

TABLE 3 Results of the neurological examination of 42 clinically healthy mute swans (*Cygnus olor*)

| Neurological parameter | Positive response/ successfully tested birds | | Positive response | | 95% confidence interval (%) | |
|-----------------------------------|--|-------|-------------------|-------|-----------------------------|-------------|
| | Left | Right | Left | Right | Left | Right |
| Cranial nerves | | | | | | |
| Menace response | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Palpebral reflex | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Direct pupillary light reflex | | 27/42 | | 64% | | 49.17–77.01 |
| Oculocephalic reflex | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Facial symmetry | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Sensation forehead | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Sensation nares | | 40/42 | | 95% | | 84.21–98.68 |
| Sensation rictus | | 36/42 | | 86% | | 72.16–93.28 |
| Gag reflex | | 41/42 | | 98% | | 87.68–99.88 |
| Beak closure and tone | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Auditory response | | 22/42 | | 52% | | 37.72–66.64 |
| Postural reactions | | | | | | |
| Hopping | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Foot replacement | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Extensor postural thrust reaction | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Wing replacement | | 42/42 | | 100% | | 91.62–100 |
| Drop and flap | | 24/39 | | 62% | | 45.90–75.11 |
| Spinal reflexes | | | | | | |
| Withdrawal reflex wing | | 25/42 | | 60% | | 44.49–72.96 |
| Withdrawal reflex leg | 36/42 | 37/42 | 86% | 88% | 72.16–93.28 | 75.00–94.81 |
| Patellar reflex | | 40/42 | | 95% | | 84.21–98.68 |
| Vent sphincter reflex | | 33/42 | | 79% | | 64.06–88.29 |
| Gastrocnemius reflex | | 0/29 | | 0% | | 0–11.70 |

Since the gastrocnemius reflex could not be provoked in any bird by any examiner, perfect agreement was achieved in both groups. Regarding the withdrawal of the pelvic limbs, perfect agreement in pigeons and substantial agreement in swans was determined. Examiners agreed perfectly when assessing the withdrawal of the wings in pigeons, but only moderately when assessing swans. Agreement was substantial for the patellar and vent sphincter reflex in both groups.

In all tests of the examination that resulted in a positive response in more than 90% of individuals (and were therefore considered useful for the species population), almost perfect agreement was achieved.

DISCUSSION

Different authors have described bird-specific adaptations of the neurological examination^{10–13,30} without providing data on whether the tests are applicable to different bird species and individuals. The present study provides normative quantitative data for the tests of a standardised neurological examination protocol in clinically healthy birds from different species.

This study revealed that most tests were feasible in the examined bird species, but certain differences were determined regarding practicability and observed responses between groups. Prioritising tests with the most consistent response is recommended for each respective species (Figure 1). The gastrocnemius reflex could not be elicited in any bird in this study and should, therefore, be excluded from the examination protocol.

The palpebral reflex was always present in all groups in our study. This finding is consistent with the existing literature, where a positive reflex was observed in all examined birds (pigeons [*C. livia domestica*; $n = 10$],¹⁸ American flamingos [*Phoenicopterus ruber ruber*; $n = 17$],¹⁶ cinereous vultures [*Aegypius monachus*; $n = 16$],³¹ screech owls [*Megascops asio*; $n = 23$],¹⁵ turkeys [$n = 10$] and layer hens [$n = 12$]²¹).

The menace response was inconsistently provokable in raptors and pigeons and positive in all mute swans. Our findings reflect the varying results of this test in the literature. Studies aiming to establish normative ophthalmological data found inconsistent, equivocal or consistently absent menace responses in great grey owls (*Strix nebulosa*) and snowy owls (*Bubo scandiacus*),¹⁹ brown pelicans (*Pelecanus*

TABLE 4 Results of the neurological examination of clinically healthy common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and northern goshawks (*Accipiter gentilis*)

| Neurological parameter | Positive response/successfully tested birds (% positive) | | |
|-----------------------------------|--|------------------------------|-----------------------------|
| | Common buzzards (N = 12) | Northern goshawks (N = 6) | Common kestrels (N = 24) |
| Cranial nerves | | | |
| Menace response | 6/12 (50%) | 4/6 (67%) | 15/24 (63%) |
| Palpebral reflex | 12/12 (100%) | 6/6 (100%) | 24/24 (100%) |
| Direct pupillary light reflex | 6/12 (50%) | 6/6 (100%) ^a | 14/24 (58%) |
| Oculocephalic reflex | 12/12 (100%) | 6/6 (100%) | 24/24 (100%) |
| Facial symmetry | 12/12 (100%) | 6/6 (100%) | 24/24 (100%) |
| Sensation forehead | 7/12 (58%) | 2/6 (33%) | 19/24 (79%) |
| Sensation nares | 5/12 (42%) | 1/6 (17%) | 12/24 (50%) |
| Sensation rictus | 3/12 (25%) | 1/6 (17%) | 14/24 (58%) |
| Gag reflex | 6/12 (50%) | 4/6 (67%) | 22/24 (92%) |
| Beak closure and tone | 12/12 (100%) | 6/6 (100%) | 24/24 (100%) |
| Auditory response | 1/12 (8%) | 0/6 (0%) | 12/24 (50%) |
| Postural reactions | | | |
| Hopping | 1/10 (10%) | 0/2 (0%) | 0/1 (0%) |
| Foot replacement | 3/10 (30%) | 1/3 (33%) | 1/2 (50%) |
| Extensor postural thrust reaction | 7/12 (58%) | 3/3 (100%) | 14/15 (93%) |
| Wing replacement | 11/12 (92%) ^b | 6/6 (100%) ^c | 23/24 (96%) |
| Drop and flap | 12/12 (100%) | 6/6 (100%) | 24/24 (100%) |
| Spinal reflexes | | | |
| Withdrawal reflex wing | 6/12 (50%) | 5/6 (83%) ^d | 23/24 (96%) |
| Withdrawal reflex leg | 12/12 (100%) ^e | 6/6 (100%) | 24/24 (100%) |
| Patellar reflex | 12/12 (100%) ^f | 6/6 (100%) ^g | 23/24 (96%) |
| Vent sphincter reflex | 7/12 (58%) | 5/6 (83%) | 21/24 (88%) |
| Gastrocnemius reflex | 0/11 (0%) | 0/6 (0%) | 0/23 (0%) |

^aSlow and incomplete constriction in four birds (both eyes).

^bSlow response in three birds.

^cSlow response in three birds.

^dReduced response in three birds.

^eReduced response in five birds.

^fReduced response in six birds.

^gReduced response in four birds.

occidentalis),¹⁷ American flamingos (*P. ruber ruber*),¹⁶ bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*),²⁰ cinereous vultures (*A. monachus*)³¹ and screech owls (*M. asio*).¹⁵ Other studies revealed a positive menace response in all individuals of the examined species: pigeons ($n = 10$),¹⁸ ducks ($n = 48$), geese ($n = 52$),¹⁴ turkeys ($n = 10$) and layer hens ($n = 12$).²¹ Potential causes for the varying results for the menace response in different avian species (and individuals) may include stress, temperament and unobserved pathologies.^{10,11} Since this test is used to evaluate vision,¹ it should be interpreted with care in birds, especially when triaging free-ranging avian patients. Interestingly, differences in response characteristics between species were observed when the menace response and palpebral reflex were tested: raptors and swans blinked with their nictitating membrane rather than with their eyelid, which was in contrast to most of the pigeons. In accordance with other authors,^{19,31} we considered both reactions as normal.

The direct pupillary light reflex was absent in 14% of pigeons and 36% of swans, with variable results in the raptors (present in 6/12 [50%] of buzzards, 6/6 [100%] of goshawks and 14/24 [58%] of kestrels). Since the musculus dilatator and sphincter pupillae consist mainly of striated muscle fibres in birds,³² this finding was not unexpected. However, our results are contrary to most studies in the existing literature, where the direct pupillary light reflex was present in all examined birds.^{14,16–18,20,21,31} One study on different captive owl species reported this reflex to be absent in five of 23 great grey owls (*S. nebulosa*)¹⁹ and in three of 23 screech owls (*M. asio*),¹⁵ where eye pathologies have been held accountable in these birds. Since these studies were solely conducted on captive individuals, the birds' accustomisation to humans and handling might have been beneficial. This assumption is supported by the fact that all 18 captive individuals of the pigeon group of our study had a positive direct pupillary light reflex.

TABLE 5 Interobserver agreement (percent agreement and Gwet's AC1) between the neurological examinations of three raters examining 11 clinically healthy pigeons (*Columba livia domestica*) and 11 clinically healthy mute swans (*Cygnus olor*)

| Neurological parameter | Pigeons | | Swans | |
|---|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | Percent agreement | Gwet's AC1 (95% CI) | Percent agreement | Gwet's AC1 (95% CI) |
| Cranial nerves | | | | |
| Menace response | 81.8% | 0.81 (0.69–0.93) | 100% | 1 (1–1) |
| Palpebral reflex | 96.0% | 0.96 (0.9–1) | 100% | 1 (1–1) |
| Direct pupillary light reflex left eye | 69.7% | 0.67 (0.54–0.81) | 77.8% | 0.77 (0.64–0.89) |
| Direct pupillary light reflex right eye | | | 79.8% | 0.79 (0.69–0.91) |
| Oculocephalic reflex | 100% | 1 (1–1) | 100% | 1 (1–1) |
| Facial symmetry | 100% | 1 (1–1) | 100% | 1 (1–1) |
| Sensation forehead | 85.9% | 0.85 (0.75–0.96) | 100% | 1 (1–1) |
| Sensation nares | 77.8% | 0.76 (0.64–0.89) | 100% | 1 (1–1) |
| Sensation rictus | 91.9% | 0.92 (0.84–0.99) | 100% | 1 (1–1) |
| Gag reflex | 98% | 0.98 (0.94–1) | 100% | 1 (1–1) |
| Beak closure and tone | 100% | 1 (1–1) | 100% | 1 (1–1) |
| Auditory response | 59.6% | 0.55 (0.41–0.69) | 69.7% | 0.67 (0.53–0.81) |
| Postural reactions | | | | |
| Hopping left leg | 92.9% | 0.93 (0.84–1) | 96% | 0.96 (0.90–1) |
| Hopping right leg | | | 93.9% | 0.94 (0.87–1) |
| Foot replacement left leg | 100% | 1 (1–1) | 98% | 0.98 (0.94–1) |
| Foot replacement right leg | | | 100% | 1 (1–1) |
| Extensor postural thrust reaction | 91.9% | 0.92 (0.82–1) | 98% | 0.98 (0.94–1) |
| Wing replacement | 100% | 1 (1–1) | 100% | 1 (1–1) |
| Drop and flap | 100% | 1 (1–1) | 61.6% | 0.57 (0.38–0.76) |
| Spinal reflexes | | | | |
| Withdrawal reflex left wing | 98.0% | 0.98 (0.94–1) | 58.6% | 0.53 (0.39–0.68) |
| Withdrawal reflex right wing | | | 60.6% | 0.56 (0.41–0.70) |
| Withdrawal reflex left leg | 98.0% | 0.98 (0.94–1) | 68.7% | 0.66 (0.49–0.81) |
| Withdrawal reflex right leg | | | 75.8% | 0.74 (0.59–0.88) |
| Patellar reflex left leg | 73.7% | 0.72 (0.45–1) | 75.8% | 0.74 (0.62–0.87) |
| Patellar reflex right leg | 71.7% | 0.69 (0.56–0.83) | 81.8% | 0.81 (0.69–0.93) |
| Vent sphincter reflex | 77.8% | 0.76 (0.63–0.89) | 79.8% | 0.79 (0.67–0.91) |
| Gastrocnemius reflex | 100% | 1 (1–1) | 100% | 1 (1–1) |

CI, confidence interval

Facial sensation was often not assessable. This was not an unexpected finding since birds lack mimic musculature, and therefore reactions to a touching stimulus of the face are limited. To allow the bird any reaction in this context, we recommend as little fixation of the head as safely possible in the respective species.

Postural reaction tests have not been studied systematically in birds prior to this study.^{12,30} All postural reaction tests produced a consistent response in pigeons in our study. In mute swans, the drop and flap reaction could not be elicited regularly. Due to the higher weight of these birds (median weight 7.6 kg, weight range 5–12.8 kg), performing this test was more difficult. In the raptor species, postural reaction tests of the limbs were often impracticable due to the risk of injury for the examiner. As part of normal defensive behaviour,²⁴ some individuals, especially juvenile kestrels and goshawks, reacted by

throwing themselves on their backs and defending themselves with their talons. Other individuals reacted 'stoic' without responding to changes in the position of their feet. This highlights that knowledge of the normal behaviour of a bird species is crucial to evaluate responses to neurological tests. Postural reactions of the wings were easy to perform in the examined raptors, but might be more difficult in larger species such as, for example, white-tailed eagles (*Haliaeetus albicilla*).

The spinal reflexes resulted in variable responses in all species, with the withdrawal reflex of the pelvic limbs being the most consistent in raptors and pigeons. The vent sphincter reflex was absent regularly, but no bird had any indication for cloacal dysfunction during examination or prior hospitalisation. There is very little information available in the veterinary literature regarding the vent sphincter reflex

in birds in clinical settings. In an anaesthetic study that tested the sedative effect of medetomidine in domestic pigeons, the cloacal reflex was tested in sedated birds and resulted in massive defensive behaviour rather than contraction of the sphincter,³³ probably due to a stronger stimulus. Our results are consistent with the findings in other species: in healthy juvenile bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*), the cloacal reflex was also not provokable⁷ and the authors suggested that a stronger stimulus needed to be applied. In clinically healthy chinchillas (*Chinchilla lanigera*), the perineal reflex was also consistently absent,⁵ but the reason for this finding was unclear.

The gastrocnemius reflex was absent in every bird in our study. This is consistent with the suggestions of other authors regarding this reflex in birds¹⁰ and small animals.¹

Our data should be critically discussed regarding the origin of the animals and age distribution within the groups. Adult birds and juveniles (but no nestlings) were included, so age-related differences in behaviour patterns could have influenced the results of the examination. Furthermore, since most of the birds examined were free-ranging individuals, no or only very limited information about the age, sex, history of previous diseases, etc., was available. Additionally, most of the examined birds in our study were not used to handling. Hence, stress is possibly the main factor for absent responses in the free-ranging birds. Nevertheless, even though we examined predominantly wild birds, most of the tests were feasible and only slight differences between the captive pigeons and the free-ranging individuals were observed (e.g., the pupillary light reflex was present in all captive pigeons but not in the free-ranging birds).

In conclusion, this study provides normative data for the neurological examination of pigeons and mute swans. Furthermore, trends in physiological responses to the neurological tests in three raptor species were reported. We noticed interspecies variations regarding the test feasibility and response consistency. Therefore, test outcomes should be evaluated considering the normal neurological findings in the respective species to avoid misinterpretations. To minimise stress, we recommend prioritising the most reliable tests for the relevant species when examining a bird.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualisation, data curation, investigation, formal analysis, visualisation, methodology and writing—original draft preparation, review and editing: Sina Feyer. *Conceptualisation, methodology, supervision and writing—review and editing:* Shenja Loderstedt. *Investigation and writing—review and editing:* Lesley Halter-Gölkel. *Formal analysis, methodology and writing—review and editing:* Roswitha Merle. *Investigation and writing—review and editing:* Stephanie Zein. *Conceptualisation, methodology, project administration, supervision and writing—review and editing:* Kerstin Müller.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Tobias Gräßle for the excellent support with statistical analysis. We also thank Dörte Lüscho and Anne Kleine for providing the pigeons from the Institute of Poultry Diseases. This work is part of the doctoral thesis of Sina Feyer.

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare they have no conflicts of interest.

FUNDING INFORMATION


The authors received no specific funding for this work.

DATA AVAILABILITY STATEMENT


The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.


ORCID

Sina Feyer  <https://orcid.org/0000-0002-5498-0679>

Shenja Loderstedt  <https://orcid.org/0000-0001-9987-5349>

Lesley Halter-Gölkel  <https://orcid.org/0009-0007-1617-2391>

Stephanie Zein  <https://orcid.org/0000-0002-2237-5976>

Kerstin Müller  <https://orcid.org/0000-0003-0618-6961>

REFERENCES

- de Lahunta A, Glass E, Kent M. The neurologic examination. In: de Lahunta A, Glass E, Kent M, editors. *de Lahunta's veterinary neuroanatomy and clinical neurology*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2021. p. 531–46.
- Garosi L, Lowrie M. The neurological examination. In: Platt S, Olby N, editors. *BSAVA manual of canine and feline neurology*. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2013. p. 1–24.
- Lorenz MD, Coates JR, Kent M. Neurologic history, neuroanatomy, and neurologic examination. In: Oliver JE, Lorenz MD, Kornegay JN, editors. *Handbook of veterinary neurology*. Philadelphia: WB Saunders Company; 2011. p. 2–36.
- Berg CC, Doss GA, Guevar J. Neurologic examination of healthy adult African pygmy hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *J Am Vet Med Assoc*. 2021;258(9):971–76.
- Snow R, Mans C, Rylander H. Neurological examination in healthy chinchillas (*Chinchilla lanigera*). *Lab Anim*. 2017;51(6):629–35.
- Warnefors E, Rueløkke ML, Gredal H. Results of a modified neurological examination in 26 healthy rabbits. *J. Exot Pet Med*. 2019;30:54–59.
- Hedley J, MacHale J, Rendle M, Crawford A. Neurological examinations in healthy juvenile bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *J Herpetol Med Surg*. 2021;31(2):141–46.
- Tarbert DK, Murthy VD, Guzman DSM. Neurological examination in healthy adult inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *J Am Vet Med Assoc*. 2022;260(9):1013–23.
- Clippinger TL, Bennett RA, Platt SR. The avian neurologic examination and ancillary neurodiagnostic techniques. *J Avian Med Surg*. 1996;221–47.
- Clippinger TL, Bennett RA, Platt SR. The avian neurologic examination and ancillary neurodiagnostic techniques: a review update. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2007;10(3):803–36.

11. Platt S. Evaluating and treating the nervous system. In: Harrison G, Lightfoot T, editors. Clinical avian medicine. 2. Palm Beach. FL: Spix Publishing, Inc.; 2006. p. 493–515.
12. Jones M, Orosz S. Overview of avian neurology and neurological diseases. *Semin Avian Exot Pet Med.* 1996;5(3):150–64.
13. Hunt C. Neurological examination and diagnostic testing in birds and reptiles. *J Exot Pet Med.* 2015;24(1):34–51.
14. Ansari Mood M, Rajaei SM, Ghazanfari Hashemi S, Williams DL, Sadjadi R. Measurement of tear production and intraocular pressure in ducks and geese. *Vet Ophthalmol.* 2017;20(1):53–57.
15. Harris M, Schorling J, Herring I, Elvinger F, Bright P, Pickett J. Ophthalmic examination findings in a colony of screech owls (*Megascops asio*). *Vet Ophthalmol.* 2008;11(3):186–92.
16. Meekins JM, Stuckey JA, Carpenter JW, Armbrust L, Higbie C, Rankin AJ. Ophthalmic diagnostic tests and ocular findings in a flock of captive American flamingos (*Phoenicopterus ruber ruber*). *J Avian Med Surg.* 2015;29(2):95–105.
17. O'Connell KM, Michau TM, Stine JM, Reid AT. Ophthalmic diagnostic testing and examination findings in a colony of captive brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*). *Vet Ophthalmol.* 2017;20(3):196–204.
18. Park S, Kang S, Lim J, Park E, Nam T, Jeong S, et al. Ultrasound biomicroscopy and tonometry in ophthalmologically normal pigeon eyes. *Vet Ophthalmol.* 2017;20(5):468–71.
19. Wills S, Pinard C, Nykamp S, Beaufrère H. Ophthalmic reference values and lesions in two captive populations of northern owls: great grey owls (*Strix nebulosa*) and snowy owls (*Bubo scandiacus*). *J Zoo Wildl Med.* 2016;47(1):244–55.
20. Kuhn SE, Jones MP, Hendrix DV, Ward DA, Baine KH. Normal ocular parameters and characterization of ophthalmic lesions in a group of captive bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *J Avian Med Surg.* 2013;27(2):90–98.
21. Sandercock DA, Auckburally A, Flaherty D, Sandilands V, McKeegan DE. Avian reflex and electroencephalogram responses in different states of consciousness. *Physiol Behav.* 2014;133:252–59.
22. Glutz von Blotzheim U, Bauer K. Handbuch der Vögel Mitteleuropas, Band 2: Anseriformes (1. Teil)—Entenvögel. Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft; 2001.
23. Glutz von Blotzheim U, Bauer K. Handbuch der Vögel Mitteleuropas, Band 9: Columbiformes—Piciformes. Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft; 2001.
24. Glutz von Blotzheim U, Bauer K, Bezzel E. Handbuch der Vögel Mitteleuropas, Band 4: Falconiformes—Greifvögel. Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft; 2001.
25. Orosz SE. Principles of avian clinical neuroanatomy. *Semin Avian Exot Pet Med.* 1996;5(3):127–39.
26. Orosz SE, Bradshaw G. Avian neuroanatomy revisited: from clinical principles to avian cognition. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2007;10(3):775–802.
27. Quarfoot D, Levine RA. How robust are multirater interrater reliability indices to changes in frequency distribution? *Am Stat.* 2016;70(4):373–84.
28. Gwet KL. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *Br J Math Stat Psychol.* 2008;61(1):29–48.
29. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159–74.
30. Orosz SE, Antinoff N. Clinical avian neurology and neuroanatomy. In: Speer B, editor. Current therapy in avian medicine and surgery. 1. St. Louis, Missouri: Saunders; 2016. p. 363–77.
31. Hwang J, Kang S, Seok S, Ahmed S, Yeon S. Ophthalmic findings in cinereous vultures (*Aegypius monachus*). *Vet Ophthalmol.* 2020;23(2):314–24.
32. Frewein J, Sinowatz F. Sinnesorgane. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E, editors. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. 5. Stuttgart: Parey; 2004. p. 365–86.
33. Sandmeier P. Evaluation of medetomidine for short-term immobilization of domestic pigeons (*Columba livia*) and Amazon parrots (*Amazona species*). *J Avian Med Surg.* 2000;14(1):8–14.

How to cite this article: Feyer S, Loderstedt S, Halter-Gölkel L, Merle R, Zein S, Müller K. Neurological examination of clinically healthy pigeons (*Columba livia domestica*), mute swans (*Cygnus olor*), common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and northern goshawks (*Accipiter gentilis*). *Vet Rec.* 2024;e3828. <https://doi.org/10.1002/vetr.3828>

3.1.2 Studie 2

Titel: Clinical, pathological and virological aspects of fatal West Nile virus infections in ten free-ranging goshawks (*Accipiter gentilis*) in Germany.

Autoren: Feyer S, Bartenschlager F, Bertram C A, Ziegler U, Fast C, Klopffleisch R, Müller K

Jahr: 2021

Zeitschrift: Transboundary and Emerging Diseases, Volume 68, Issue 2: 907-919.

DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13759>

Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Wissenschaftlicher Beitrag:

Sina Feyer (Erstautorin): Konzeption der Studie, Erhebung (Durchführung der klinischen und neurologischen und computertomographischen Untersuchungen, Probenentnahmen und Durchführung der Behandlungen der Habichte) und Dokumentation des überwiegenden Teils der klinischen Daten, Auswertung der Daten, Visualisierung der klinischen Ergebnisse, Erstellung des Manuskriptes (mit Ausnahme des Ergebnisteils und der Abbildungen und Tabellen der pathologischen und virologischen Ergebnisse)

Florian Bartenschlager (Co-Autor): Erhebung der pathologischen Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Verfassen des Ergebnisteils inklusive der Abbildungen zu den pathologischen Befunden; Review und Editieren)

Christof Albert Bertram (Co-Autor): Erhebung der pathologischen Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Review und Editieren)

Ute Ziegler (Co-Autorin): Erhebung der virologischen und serologischen Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Verfassen des Ergebnisteils inklusive der Tabelle zu den virologischen und serologischen Befunden; Review und Editieren)

Christine Fast (Co-Autorin): Erhebung der immunhistochemischen Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Verfassen des Ergebnisteils inklusive der Tabelle und Abbildungen zu den immunhistochemischen Befunden; Review und Editieren)

Robert Klopffleisch (Co-Autor): Erhebung der pathologischen Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Review und Editieren)

Kerstin Müller (Co-Autorin): Initiierung und Konzeption der Studie, Mitwirkung bei der Erhebung der klinischen Daten, Mitwirkung bei der Auswertung der Daten, Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskriptes (Review und Editieren)

Clinical, pathological and virological aspects of fatal West Nile virus infections in ten free-ranging goshawks (*Accipiter gentilis*) in Germany

Sina Feyer¹  | Florian Bartenschlager² | Christof A. Bertram² | Ute Ziegler³  | Christine Fast³ | Robert Klopffleisch² | Kerstin Müller¹

¹Small Animal Clinic, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

²Institute of Veterinary Pathology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

³Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, Greifswald-Insel Riems, Germany

Correspondence

Kerstin Müller, Small Animal Clinic, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany
Email: Kerstin.Mueller@fu-berlin.de

Abstract

West Nile virus (WNV), a zoonotic arbovirus, is a new epizootic disease in Germany and caused increasing avian and equine mortality since its first detection in 2018. The northern goshawk (*Accipiter gentilis*) is highly susceptible to fatal WNV disease and thus is considered as an indicator species for WNV emergence in European countries. Therefore, information regarding clinical presentation and pathological findings is important for identifying suspect cases and initiating further virological diagnostics. Between July and September 2019, ten free-ranging goshawks were admitted to the Small Animal Clinic of the Freie Universität Berlin with later confirmed WNV infection. Clinical, pathological and virological findings are summarized in this report. All birds were presented obtunded and in poor to cachectic body condition. Most of the birds were juveniles (8/10) and females (9/10). Neurologic abnormalities were observed in all birds and included stupor (3/10), seizures (3/10), head tremor (2/10), head tilt (2/10), ataxia (2/10) and monoplegia (2/10). Concurrent diseases like aerosacculitis/pneumonia (7/10), clinical infections with *Eucolus* spp. and *Trichomonas* spp. (3/10), trauma-related injuries (3/10) and myiasis (2/10) were found. Blood analysis results were unspecific considering concurrent diseases. Median time of survival was two days. The most common pathological findings were meningoencephalitis (9/10), myocarditis (8/10), iridocyclitis (8/8) and myositis (7/10). WNV infection was diagnosed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and confirmed by serology and immunohistochemistry.

KEYWORDS

birds of prey, flavivirus, goshawk, neurology, vector-borne disease, West Nile virus

1 | INTRODUCTION

West Nile virus (WNV) is an important zoonotic arbovirus with the most widespread geographical distribution of all mosquito-borne flaviviruses (Weissenböck, Hubálek, Bakonyi, & Nowotny, 2010). WNV has been present in Europe for decades, but since 2004 lineage

2 WNV is increasingly spreading in European countries (Bakonyi et al., 2006, 2013).

The first WNV infection in Germany was detected in summer 2018 in a deceased captive great grey owl (*Strix nebulosa*), followed by 11 further WNV cases in birds, including four northern goshawks (*Accipiter gentilis*) (Ziegler et al., 2019). In 2019, a larger

© 2020 The Authors. *Transboundary and Emerging Diseases* published by Wiley-VCH GmbH.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

epizootic outbreak occurred in Germany with the first confirmed case of fatal WNV in July in a captive snowy owl (*Bubo scandiacus*) (Friedrich-Loeffler-Institut, 2019, October 7). Subsequently, increasing numbers of WNV infections in birds and horses (Friedrich-Loeffler-Institut, 2019, September 12) as well as several human infections occurred (Robert Koch-Institut, 2019; Robert Koch-Institut, 2019, October 24). To date, 76 different birds and 36 horses as well as five diseased humans were tested WNV positive for 2019 (Ziegler et al., 2020). The vast majority of cases were concentrated in the eastern part of Germany, where favourable weather conditions prevailed.

For transmission of WNV, free-ranging birds are important due to their large home ranges and migratory behaviour (Rappole & Hubalek, 2003). Susceptibility to WNV infections and clinical presentation vary between avian species (Joyner et al., 2006; Komar et al., 2003; Lopes, Redig, Glaser, Armien, & Wünschmann, 2007; Nemeth et al., 2009). Therefore, knowledge about clinical symptoms in a species is invaluable to detect cases of WNV infections in an early stage, especially in free-ranging birds, where history is usually scarce.

Northern goshawks are highly susceptible to WNV infections with fatal outcome (Bakonyi et al., 2013; Hubalek et al., 2018; Hubálek et al., 2019; Wünschmann et al., 2005) and hence might serve as an indicator species for WNV emergence in European countries (Bakonyi et al., 2013; Hubalek et al., 2018; Wodak et al., 2011). Even more so since this species is capable of adapting to highly urbanized environments and human proximity—like in the city of Berlin. The northern goshawk has successfully populated Berlin in the last decades resulting in a population of around 100 breeding pairs in 2015 (Altenkamp, 2015).

However, descriptions of clinical signs in this species are mainly limited to captive individuals and include head tremor, seizures, ataxia and torticollis (Erdelyi et al., 2007; Hubalek et al., 2018; Hubálek et al., 2019; Wünschmann et al., 2005).

Between July and September 2019, ten free-ranging northern goshawks were presented to the Small Animal Clinic of the Freie Universität Berlin, showing neurological signs prior to death. WNV infection was confirmed by post-mortem examination, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), serology and immunohistochemistry (IHC). In this report, we describe the clinical findings and clinical course as well as pathological, virological and serological aspects of these cases.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Birds

Upon admission, all birds underwent a physical examination. Body condition was evaluated by measurement of the body weight and evaluation of the pectoralis muscles. Age and sex were determined based on the plumage and the weight (Mueller, Berger, & Allez, 1976).

Additional diagnostic procedures were performed on a case to case basis depending on displayed symptoms and general condition of each bird. Neurological and ophthalmological examinations were executed, and survey radiographic and computed tomographic

images were taken during the time of hospitalization. Blood was obtained from the jugular vein or immediately post-mortem via cardiac puncture in cases where birds died before blood sampling. Swabs of the pharyngeal surface and crop were examined cytologically to determine possible endoparasitic infections.

Analysis of blood chemistry was carried out on lithium heparin plasma by the Konelab 60I® (Thermo Fisher Scientific Inc., Vantaa, Finland) at 37°C and included potassium, sodium, ionized calcium, glucose, anorganic phosphorus, magnesium, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), uric acid (UA), alkaline phosphatase (AP), creatine kinase (CK), total protein (TP) (biuret method) and butyrylcholinesterase (Che). Haematocrit was determined by microhaematocrit method, and a blood smear was prepared. Biochemistry and haematology results were compared to reference ranges for that species (Müller, 2012).

All goshawks were hospitalized and received symptomatic treatment according to displayed symptoms and diagnostic findings (e.g. fluid therapy, nutritional supplementation, anti-fungal and anti-parasitic therapy).

2.2 | Post-mortem

After death, the birds were submitted for post-mortem examination to the Institute of Veterinary Pathology of the Freie Universität Berlin.

Post-mortem examinations of all birds were carried out within one hour after death. Fresh samples were stored at -80°C for virological analysis. Tissue samples (brain, spinal cord, sciatic nerve, lung, heart, proventriculus, small intestine, large intestine, pancreas, liver, kidney, spleen, bone marrow, pectoralis muscle of all ten birds and both eyes of eight animals) for histopathology and immunohistochemistry were fixed for 48 hr in neutral buffered formaldehyde solution (4%) and embedded in paraffin. Eyes were decalcified (25% EDTA solution) at 60°C for 72 hr prior to paraffin embedding. Histological sections were cut at approximately 1 µm thickness and stained with haematoxylin and eosin (H&E).

2.3 | Immunohistochemistry

For IHC, 3-µm tissue sections were mounted on Superfrost plus slides (Menzel, Darmstadt, Germany), deparaffinized and rehydrated. As a primary antibody, in-house polyclonal antibody OM8 was used for the detection of WNV antigen at a dilution of 1:1,700 in goat serum. To exclude the presence of Usutu virus (USUV) antigen, polyclonal in-house antibody U433 was used at a dilution of 1:1,400 in goat serum. Endogenous peroxidase was blocked by 3% H₂O₂/methanol. WNV antigen was retrieved by Proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) digestion (15 min at 37°C with 4 µg/ml). For the detection of USUV, sections were heated in citrate buffer (121°C for 20 min). A serum block was applied directly before incubation of both first antibodies. Negative control sections were incubated with goat serum alone. As a secondary antibody system,

we used the EnVision™ reagent (Dako). The slides were finally developed in diaminobenzidine tetrahydrochloride and counterstained with Mayer's haematoxylin. Tissue of a goshawk tested negative for WNV by qRT-PCR from a routine submission served as negative controls (Figure A1).

2.4 | Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Viral RNA out of the goshawks blood and organ samples was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was investigated using a WNV-specific qRT-PCR described by Eiden, Vina-Rodriguez, Hoffmann, Ziegler, and Groschup (2010). Furthermore, the samples were tested using the USUV-specific qRT-PCR to exclude cross reactions (Jöst et al., 2011). Cycle threshold (Ct) values below 37 were regarded as positive, from 37 to 40 as suspicious and above 40 as negative.

2.5 | Serology

From nine of the ten goshawks, suitable serum material before death was available. Serum samples were screened for WNV-specific antibodies using a commercially available competition ELISA, which allowed species-independent recognition of WNV antibodies against the domain III of the envelope protein, following the manufacturer's instructions (INgezim® West Nile Compact, Ingenasa, Madrid, Spain). Samples were considered positive when the inhibition percentage (IP) was $\geq 40\%$.

To evaluate the ELISA results, all serum samples were examined by differentiating virus neutralization tests (VNT). The serum samples were investigated against WNV strain Austria (acc. no. HM015884, kindly provided by S. Revilla-Fernandez, AGES Mödlingen, Austria) and USUV strain Germany (acc. no. HE599647) in VNTs to identify the cross-reacting antibody titres among the Japanese encephalitis serogroup. The virus neutralization tests were conducted as described by Seidowski et al. (2010). Serum samples with neutralization dose 50% (ND50) values above 10 were evaluated as positive and samples with ND50 values lower than 10 as negative. Wild birds were only regarded positive for WNV if they had a negative (ND50 < 10) or significantly lower (twofold lower) USUV titre.

3 | RESULTS

3.1 | Clinical findings and outcome

All birds were presented to our clinic between July and September 2019, with a peak in August (7/10). They originated from the federal states of Berlin (8/10) and Brandenburg (2/10). Eight goshawks were juvenile (hatch-year birds), and two birds were adults. More females

(9/10) than males (1/10) were admitted. The birds were found by members of the public because they were unable to fly.

All birds were obtunded and moderately to severely emaciated at initial presentation. Females weight ranged from 0.74 to 0.92 kg (median weight 0.83 kg) and the male weighed 0.53 kg. In three birds, clinically apparent oral infections with *Trichomonas* spp. and/or *Eucoleus* spp. were found. One goshawk had penetrating skin lesions on the back with wound myiasis and in another bird aural myiasis was noted.

Whole-body radiographs were taken in all birds, and computed tomography scans were performed in nine goshawks. Diagnostic imaging revealed multiple rounded soft tissue opacities of the lung parenchyma or the airsacs that led to the tentative diagnosis of an aerosacculitis or pneumonia (5/10). A splenomegaly (2/10) and possible trauma-related injuries (fractures of the carina sterni and scapula) (2/10) were also identified.

Ophthalmologic examination was performed in seven birds. Clinical impaired vision without visible ocular abnormalities was found (4/7) as well as unilateral (2/7) or bilateral (1/7) uveitis, hyphema (1/7) and corneal erosion (1/7). Blood analyses were performed in eight of ten cases, and results are presented in Table 1. Abnormal biochemistry findings included elevated CK (7/7), AST (6/8), ALT (6/7), AP (3/7) and UA (2/8). Haematology results revealed a mild (5/8) to severe (2/8) anaemia.

All birds were anorexic during their stay at the clinic and unable to perch. All goshawks developed neurological signs like stupor (3/10), seizures (3/10), head tremor (2/10), head tilt (2/10), ataxia (2/10) and monoplegia (2/10) at the time or during hospitalization within one to four days after admission. Neurological examinations revealed a multifocal neuroanatomical localization in eight of nine examined birds and one bird was localized to the forebrain. The neurological symptoms are summarized in Table 2. Neurological symptoms progressed in all birds despite of supportive treatment.

Due to clinical deterioration, seven goshawks were euthanized and three birds died within 1–5 days after they were found (median time of survival 2 days).

3.2 | Pathological findings

Gross lesions included a poor to cachectic body condition (10/10), mycotic pneumonia or aerosacculitis (7/10), liver congestion (7/10), intestinal nematodes (5/10), splenic congestion (5/10), myocarditis (4/10), cloacal dilatation (3/10), splenomegaly (2/10), pericardial effusion (2/10), fracture of the sternal carina (2/10), renal infarction (1/10), anaemia (1/10), subcutaneous haemorrhages (1/10), penetrating skin lesions with wound myiasis (1/10), hyphema (1/8) and corneal erosion (1/8).

The most prominent histopathological finding in all birds (10/10) was central nervous system lesions of variable grade ranging from mild, diffuse gliosis and scattered glial nodules in one animal (1/10) to moderate to severe, subacute, multifocal, lymphoplasmacytic and necrotizing meningoencephalitis and myelitis (9/10, Figure 1a–d).

TABLE 1 Results of the blood analyses of eight goshawks (*Accipiter gentilis*) with fatal West Nile virus infection

| | Unit | Case No. | | | | | | | | Reference range ^b |
|----------------------------|--------|----------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-----------------|------------------------------|
| | | 1 | 3 | 4 | 5 ^a | 6 | 7 | 8 | 10 ^a | |
| Potassium | mmol/L | 2.3 | 2.3 | 2.2 | 7.2 | 2.6 | 2.0 | 3.3 | 6.2 | 1.4–4.2 |
| Sodium | mmol/L | 164 | 159 | 163 | 155 | 149 | 153 | 146 | 148 | 150–168 |
| Ionized calcium | mmol/L | 1.4 | 1.31 | 1.35 | 1.51 | 1.48 | 1.3 | 1.06 | 1.13 | Not available |
| Anorganic phosphorus | mmol/L | - | - | 1.77 | 3.15 | 1.28 | 1.35 | 1.31 | 2.88 | 0.1–1.1 |
| Magnesium | mmol/L | - | 0.76 | 0.77 | 1.88 | 0.98 | 0.87 | 0.79 | 1.25 | 0.7–1.0 |
| Alanine aminotransferase | IU/L | - | 304 | 195 | 196 | 107 | 239 | 141 | 123 | 26–114 |
| Aspartate aminotransferase | IU/L | 7,621 | 3,492 | 1,033 | 1,355 | 980 | 1,982 | 1,597 | 1,669 | 265–1,113 |
| Butyrylcholine esterase | IU/L | 2,241 | 1,870 | 2,784 | 2,956 | 1,515 | 2,539 | 1,569 | 3,934 | 606–3,151 |
| Alkaline phosphatase | IU/L | - | 89 | 15 | 48 | 110 | 99 | 57 | 28 | 25–67 |
| Creatine kinase | IU/L | - | 8,502 | 2,632 | 10,697 | 2,651 | 1,953 | 1,908 | 14,015 | 249–1,430 |
| Glucose | mmol/L | 13.6 | 16.5 | 16.4 | 8.7 | 20.4 | 17.6 | 14.4 | 13.7 | 18.0–25.3 |
| Uric acid | μmol/L | 1,197 | 563 | 1,090 | 13,610 | 606 | 1,172 | 898 | 2,956 | 133–1,440 |
| Total protein | g/L | 38.3 | 40.4 | 57.6 | 41.8 | 39.7 | 35.9 | 30.4 | 37.6 | 23–40 |
| Haematocrit | L/L | 0.34 | 0.33 | 0.30 | 0.10 | 0.34 | 0.44 | 0.21 | 0.39 | 0.41–0.54 |

^aBlood sampled immediately postmortal, plasma haemolytic.

^bReference ranges from Müller (2012).

Brain areas most severely affected were the cerebrum, followed by the brainstem and cerebellum in all birds. Lesion distribution was randomly within all parts of the cerebrum. Severely affected brain lesions showed severe, mononuclear, perivascular cuffing; severe, subacute, multifocal, necrotizing vasculitis; multifocal, neuronal necrosis; multifocal neuronophagia; multifocal satellitosis; and sometimes malacia (Figure 1b–d). In addition, at least areas of mild, diffuse gliosis; scattered glial nodules; and diffuse endothelial activation were present in the cerebrum of all birds.

In the cerebellum (9/10), mild to moderate, multifocal, mononuclear, perivascular cuffing; a multifocal, activated endothelium; scattered glial nodules; and occasionally foci of malacia were apparent in the molecular layer as well as in the cerebellar peduncles. The Purkinje cell layer showed oligo- to multifocal Purkinje cell necrosis in animals with moderate and severe cerebral lesions. One animal (1/10) had a moderate, subacute, focal, lymphoplasmacytic perineuritis of the sciatic nerve.

All eyes (16/16) showed a mild to moderate, subacute, multifocal and lymphoplasmacytic iridocyclitis (Figures 1E1 and A2). In addition, five eyes (5/16) were affected by a mild to moderate, subacute, multifocal, lymphoplasmacytic choroiditis and five eyes (5/16) showed a mild to moderate, subacute, diffuse, lymphoplasmacytic pectinitis (Figures 1E2 and A2B2). In three eyes (3/16), a mild to moderate, diffuse gliosis of the optic nerve was apparent. In two birds (2/10), a segmental necrosis of the retina of one eye was present (Figures 1E3 and A2C2). In one eye (1/16), a severe, acute, focal, subretinal haemorrhage was present. The appearance and the degree of inflammatory lesions varied between the left and the right eye of each bird.

A mild to severe, subacute to chronic, multifocal to coalescing, lymphoplasmacytic (2/10) or necrotizing (6/10) myocarditis partially

with a massive reactive fibrosis was present in eight birds (8/10) and associated with oligofocal, dystrophic calcifications in one case (1/10, Figure 1F). One bird (1/10) had a focal, fibrinonecrotizing arteritis.

Seven goshawks had a mild to moderate, subacute, multifocal, lymphoplasmacytic (1/10) or necrotizing (6/10) myositis with reactive fibrosis. Multifocal, chronic, intramuscular and protozoal cysts were present in two of these animals (2/10).

A mild to moderate, chronic and multifocal hemosiderosis within the splenic parenchyma was evident in eight birds (8/10). Four (4/10) animals revealed a mild, acute and necrotizing splenitis associated with oligofocal necrosis of small capillaries (2/10), oligofocal lymphofollicular centre necrosis (1/10) and an acute, oligofocal and fibrinonecrotizing arteritis in one case (1/10).

In the kidney, three birds (3/10) had an acute, multifocal and columnar epithelial cell necrosis of the collecting ducts in particular and four birds mild, subacute, multifocal, interstitial and lymphoplasmacytic infiltrations (4/10).

In the liver, besides a mild to moderate, chronic, multifocal hemosiderosis (10/10) and an acute, multifocal necrosis of single hepatocytes (9/10), four (4/10) animals revealed mild, subacute, multifocal, periportal, lymphoplasmacytic infiltrations and two birds (2/10) showed mild, acute, oligofocal and intralobular necrotic foci.

3.3 | Immunohistochemical findings

West Nile virus antigen was detected by IHC in all animals (10/10). In most cases (9/10), antigen was present in a moderate to severe degree, just one animal showed only a mild involvement. Most birds revealed a

TABLE 2 Age, body weight, neurological symptoms, neuroanatomical localization and other major clinical findings of the ten goshawks (*Accipiter gentilis*) with fatal West Nile virus infection

| Case No. | Age | Sex | Neurological symptoms | Neuroanatomical localization | Other major clinical findings |
|----------|-----|-----|---|--|---|
| 1 | J | F | Stupor, seizures | Multifocal brain (forebrain and brainstem) | Wound myiasis, scapula fracture, clinical <i>Eucoleus</i> spp. infection |
| 2 | A | F | Obtundation, monoplegia leg | Could not be determined due to clinical deterioration | Suspected pneumonia and aerosacculitis |
| 3 | J | F | Obtundation, seizures | Multifocal brain (forebrain and brainstem) | Moderate splenomegaly, suspected pneumonia, unilateral uveitis and contralateral corneal erosion |
| 4 | J | F | Obtundation, temporary head tremor, ataxia, head tilt | Multifocal brain (forebrain, brainstem and cerebellum) | Splenomegaly, suspected pneumonia, impaired vision |
| 5 | J | F | Stupor, impaired vision | Multifocal brain (forebrain and brainstem) | Fracture carina sterni and haematoma pectoralis muscle, unilateral uveitis and hyphema, clinical trichomoniasis, severe anaemia |
| 6 | J | F | Obtundation, temporary head tilt | Multifocal brain (forebrain, brainstem and cerebellum) | Bilateral uveitis |
| 7 | J | F | Obtundation, ataxia, impaired vision | Forebrain | Clinical trichomoniasis and <i>Eucoleus</i> spp. infection, impaired vision |
| 8 | J | F | Obtundation, monoplegia leg, impaired vision | Multifocal (forebrain and spinal cord) | Muscle atrophy right leg, suspected pneumonia, impaired vision, severe anaemia |
| 9 | J | F | Seizures, stupor | Multifocal brain (forebrain and brainstem) | Aural myiasis |
| 10 | A | M | Obtundation, temporary head tremor, impaired vision | Multifocal brain (forebrain, brainstem and cerebellum) | Suspected pneumonia, impaired vision |

Abbreviations: A, adult; F, female; J, juvenile; M, male.

distinct antigen accumulation in more than one tissue. Clear individual differences between the involvement of examined tissues and the distribution of the antigen within these tissues were noted. WNV antigen was identified by IHC most frequently in the following tissues: brain (9/10, Figure 2a–c), skeletal muscle (9/10, Figure 2d), kidney (8/10, Figure 2e) and heart (5/10, Figure 2f). In only one bird, almost all examined tissues contained WNV antigen. The cellular reaction pattern of the affected tissues was in accordance among the birds. Table 3 gives an overview of histopathological lesions most probably due to viral infection as well as of the associated immunohistochemical results.

All tissue samples were also routinely processed with an USUV-specific antibody. Most of the samples, in particular in severe cases, a weak to mild cross-reactivity was seen, which was clearly distinguishable from the distinct positive reaction pattern seen with WNV-specific antibody.

3.4 | Virological and serological findings

Most of the examined organs of the ten goshawks were WNV RNA positive by qRT-PCR. Only two of the ten birds showed positive results in just a few organs. In two birds, only two organs were tested

positive: cerebellum and heart in case no. 5 and cerebrum and spleen in case no. 6 (Table 4).

Furthermore, specific WNV RNA could also be detected in the obtained blood of six goshawks (6/8). No blood clot was available from two birds (2/8) for this test. Interestingly, the partly weak PCRs in blood were also confirmed by the second PCR assay (see assay 2 FLI-WNV) in four cases.

Serum was available from nine of the ten (9/10) birds, and all investigated goshawks showed clearly seroconversion by Ingenasa-ELISA. These results were confirmed by specific neutralizing antibodies against WNV. The WNV-specific titres ranged from 1/240 to 1/1920. Cross reactions with USUV-specific antibodies could be excluded, because the USUV titres were significantly lower or negative (Table 4).

4 | DISCUSSION

This is the first report of detailed clinical, pathological and virological findings of fatal WNV infection in free-ranging goshawks from Germany.

To date, more than 300 avian species are known to be susceptible to WNV infection in the USA (Centers for Disease Control &

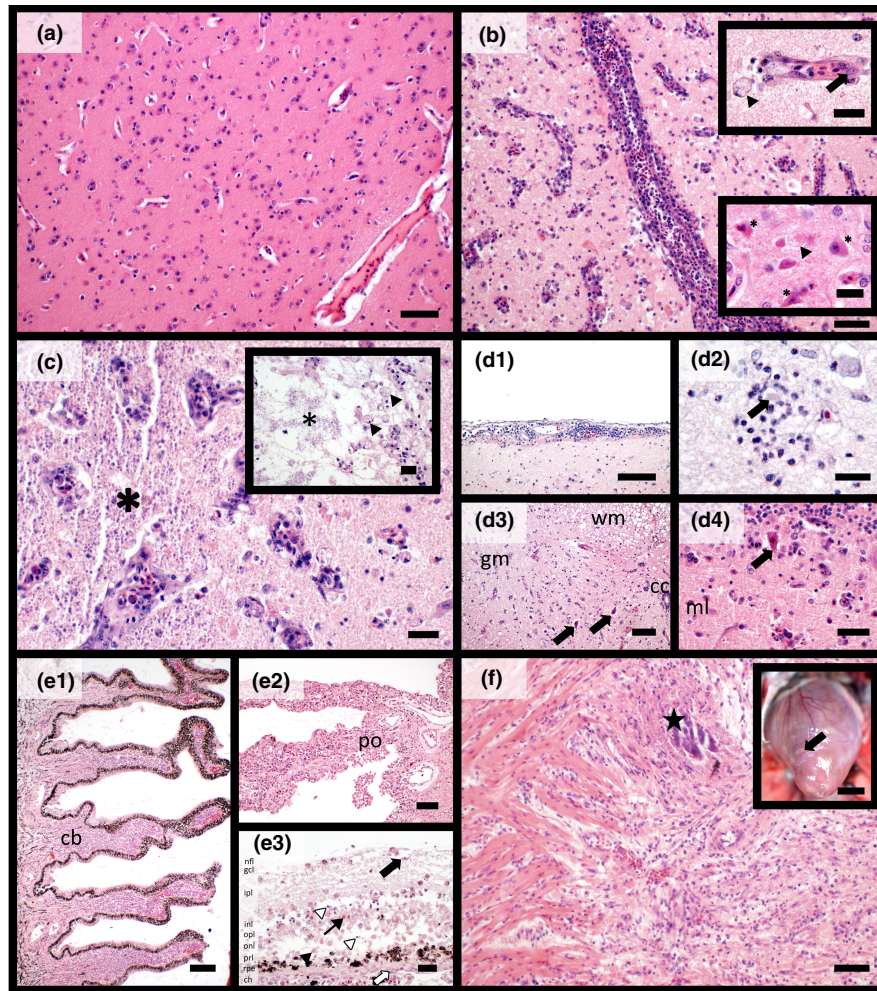


FIGURE 1 The brain, the eyes and the heart are hallmark-organs for the histopathological diagnosis of WNV disease in birds. Histologic sections of the cerebrum (a, b, c, d2), cerebellum (d4), meninges (d1), spinal cord (d3), eye (ciliary body (e1), pecten oculi (e2), retina (e3)) and heart (f) are illustrated. Haematoxylin and eosin (HE). Main lesions in the cerebrum and brainstem ranged from mild, diffuse gliosis (a) to severe, non-suppurative encephalitis with prominent mononuclear perivascular cuffing and vasculitis (b), activated vascular endothelium (b, upper inset, arrow), the presence of macrophages with abundant foamy cytoplasm (consistent with gitter cells, b, upper and lower inset, arrowhead) and central chromatolysis, respectively, neuronal acidophilic necrosis (b, lower inset, asterisks). Occasionally, foci of acute liquefactive necrosis without any signs of a macrophage involved reaction (c, asterisk) and subacute malacia (c, inset, asterisk) characterized by the presence of gitter cells (c, inset, arrowheads) and clearing of necrotic neuronal parenchyma and neuropil were apparent in birds with severe encephalitis. Furthermore, multifocal, mononuclear, submeningeal infiltrates (d1), glial nodes and satellitosis (d2, arrow) within the rarefied neuronal parenchyma could be shown along all parts of the cerebrum. Gliosis and neuronal necrosis (d3, arrows) were found frequently in the spinal cord (d3, wm = white matter, gm = grey matter, cc = central canal). Typical changes in the cerebellum included Purkinje cell necrosis and mononuclear, perivascular cuffing, vasculitis, malacia and glial nodes in the molecular layer (d4, ml = molecular layer). In all eyes, a lymphoplasmacytic iridocyclitis (e1, cb = ciliary body) was present, five eyes showed a lymphoplasmacytic chorioiditis (e3, open fat arrow), and five eyes showed a lymphoplasmacytic pectinitis (e2, po = pecten oculi). Two birds showed a segmental retinal necrosis (e3, ch = choroidea, rpe = retinal pigment epithelium, prl = photoreceptor layer, onl = outer nuclear layer, opl = outer plexiform layer, inl = inner nuclear layer, ipl = inner plexiform layer, gcl = ganglion cell layer, nfl = nerve fibre layer) along with loss of the photoreceptor-interdigitation of the rpe, rounded and necrotic photoreceptors (e3, closed arrowhead), virtually entire eradication of the onl and inl (e3, open arrowheads), rarefaction of the opl and ipl, degeneration of the ganglion cells (e3, fat arrow) and presence of foamy macrophages and heterophils (e3, asterisk, thin arrow) within all retinal layers. Eight individuals showed a lymphoplasmacytic, necrotizing and fibrosing myocarditis and occasional dystrophic calcifications (f, star), which were observed macroscopically as multifocal, ovoid to round, light grey discolorations of up to 0.5 cm in diameter within the myocardium (e, inset, arrow). Bars indicate: 10 μ m (b insets), 20 μ m (c, c inset, d2, d4, e3), 50 μ m (a, b, d1, d3, e2, f), 100 μ m (e1), 0.7 cm (f inset)

Prevention, 1999-2016). High mortality rates occurred in species of the family Corvidae, but raptors were also affected frequently (Bernard et al., 2001; Komar et al., 2003; Kramer & Bernard, 2001; Nemeth, Gould, Bowen, & Komar, 2006; Steele et al., 2000). Mortality

in birds linked to WNV infection in Europe was recently mainly reported in raptor species (including in particular species of the orders Accipitriformes and Falconiformes) and occasionally in Passeriformes (Bakonyi et al., 2013; Hubalek et al., 2018; Hubálek et al., 2019; Petrovic

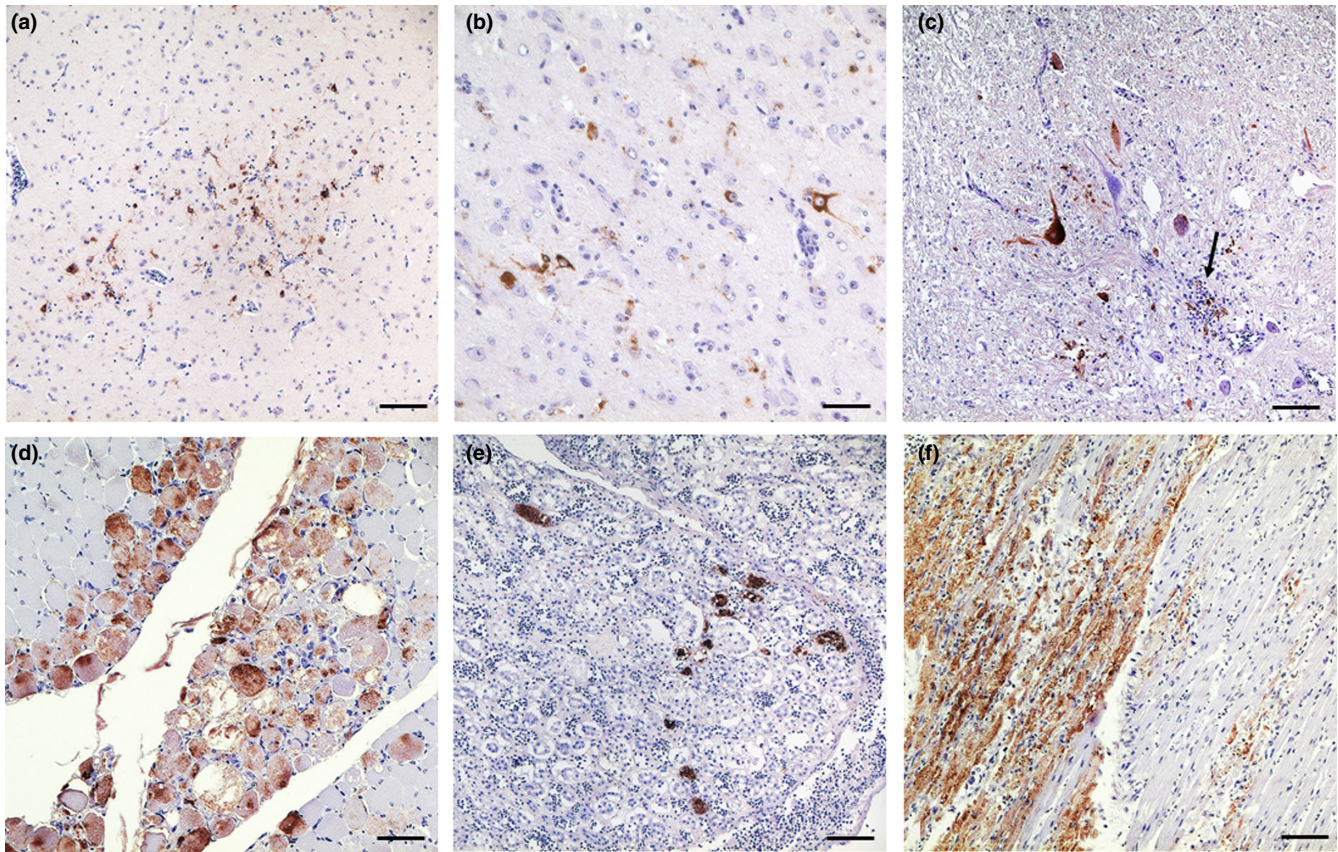


FIGURE 2 Immunohistochemical detection of WNV antigen in brain and different tissue samples. (a) Distinct focal foci of WNV antigen in cerebrum associated with WNV induced lesions, case 2, Bar 50 µm. (b) Details of multifocal viral antigen accumulation in neuron and glial cells in cerebrum, case 8, bar 20 µm. (c) Focal foci of lesion associated viral antigen accumulation in large neurons, glial cells and infiltrating mononuclear cells (perivascular cuff, arrow) in brain stem, case 9, bar 50 µm. (d) Focal, lesion associated, moderate WNV antigen in myocytes and single histiocytes, case 1, bar 50 µm. (e) Multifocal mild viral antigen in tubuloepithelial cells of kidney, note that in particular collecting ducts are affected, case 3, bar 50 µm. (f) Multifocal, lesion associated, severe viral antigen detection in cardiomyocytes and single histiocytes, case 1, bar 50 µm; the examination was done with an in-house polyclonal antibody specific for WNV (pab OM8)

et al., 2013; Savini et al., 2013; Ziegler et al., 2019). In European countries like Spain, Hungary, Slovakia, Czech Republic, Serbia, Italy and Austria, fatal WNV lineage 2 infections occurred in northern goshawks (Bakonyi et al., 2013; Busquets et al., 2019; Csank et al., 2016; Erdelyi et al., 2007; Hubalek et al., 2018; Hubálek et al., 2019; Petrovic et al., 2013; Savini et al., 2013; Wodak et al., 2011). Predominantly, a small number of goshawks were reported with exception of larger outbreaks in Hungary 2008 and the Czech Republic in 2018 affecting respectively 17 goshawks (Bakonyi et al., 2013; Hubálek et al., 2019). One WNV-positive adult hooded crow (*Corvus cornix*) and one common wood pigeon (*Columba palumbus*) with neurological symptoms were admitted to our clinic following the ten goshawks (unpublished data). Interestingly, no other WNV-positive birds were admitted to our clinic, even though crows, pigeons and goshawk share the same urban habitat in Berlin and are equally noticeable for the public. Nevertheless, it is likely that more birds were affected and our cases reflect just the tip of the iceberg.

In our study, eight out of ten goshawks were hatch-year birds. This finding is consistent with other reports of WNV diseased free-ranging goshawks (Erdelyi et al., 2007; Hubálek et al., 2019;

Wünschmann et al., 2005). Experimental observations regarding to feeding preferences of different mosquito species towards nestling or adult birds were inconsistent (Burkett-Cadena et al., 2010; Garvin et al., 2018), and age-related differences in susceptibility to WNV vary between avian species (Gancz et al., 2004; Sovada et al., 2008; Swayne, Beck, Smith, Shieh, & Zaki, 2001; Wünschmann et al., 2004, 2005), so our data indicate that juvenile free-ranging goshawks are more susceptible to debilitating disease after infection than adults.

Nine out of ten birds, including all juvenile individuals (8/10), were female. Additionally, three positive tested goshawks of known sex from other parts of Germany in 2019 were also female, whereas sex of two other birds was unknown (U. Ziegler, personal communication, February 2020). Our findings are in contrast to other reports of WNV-infected goshawks, where proportion of sexes were approximately equal (Hubalek et al., 2018; Hubálek et al., 2019; Wünschmann et al., 2005). Among WNV-infected American crows (*Corvus brachyrhynchos*), no sex-biased mortality was found (Caffrey, Smith, & Weston, 2005; Yaremych, Levengood, Novak, Mankin, & Warner, 2004). There is no evidence of a bias in sex ratio

TABLE 3 Histopathological lesions most probably associated with West Nile virus (WNV) infection of ten infected goshawks (*Accipiter gentilis*) as well as immunohistochemical WNV antigen detection (polyclonal antibody OM8) in different tissues

| Case no. | Brain | | Spinal cord ^a | | Heart | | Lung | | Liver | | Spleen | | Kidney | | Muscle | | Ganglia/Nerves ^b | | Adrenal Gland | | Ovary | | Eyes | |
|----------|-------|-----|--------------------------|-----|-------|-----|------|-----|-------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|-----------------------------|-----|---------------|-----|-------|-----|------|-----|
| | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC |
| 1 | +++ | ++ | NA | NA | +++ | + | - | - | - | - | + | - | - | + | ++ | ++ | - | +N | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 2 | ++ | ++ | NA | NA | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | +N ^c | - | - | - | - | - | - | NA |
| 3 | +++ | +++ | + | + | +++ | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | +N ^c | - | NA | NA | - | - | - | +R |
| 4 | +++ | +++ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +N | +G | NA | NA | - | - | - | ++ |
| 5 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | NA | NA | NA | NA | - | - | - | ++ |
| 6 | +++ | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | NA | NA | - | - | - | ++ |
| 7 | ++ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | ++ | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 8 | ++ | ++ | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 9 | ++ | +++ | + | + | ++ | + | - | - | - | - | + | - | - | + | ++ | + | +NG | - | - | - | - | - | - | + |
| 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +G | ++G | - | + | - | NA | NA | + |

Abbreviations: (-), negative; (+), mild; (++) moderate; (+++) severe; G, vegetative ganglia; HE, histopathological lesions; IHC, immunohistochemical results; N, motoric nerves; NA, not available; R, Retina.

^aDifferent localizations.

^bMotoric nerves.

^cNo ganglia, only nerves are available.

^dOnly uterus available.

in goshawks at hatching [ringing data of goshawk fledglings in Berlin from 1994 to 2001 showed that 53.1% of the fledglings were males and 46.9% were female (Altenkamp, 2002)]. Kenward, Marcström, and Karlbom (1999) demonstrated lower survival rates for male goshawks compared to females. Therefore, the female-biased sex ratio in WNV-diseased goshawks was unexpected. One possible explanation could be a sex-biased host use by mosquito vectors. Egzi, Farajollahi, and Fonseca (2014) reported that *Culex restuans* took more blood meals from female birds during the early season (April-June), with the limitation that this bias occurred exclusively in species in which the female alone is the incubating sex. Burkett-Cadena, Bingham, and Unnasch (2014) identified more blood meals from male birds in different mosquito species. In contrast, *Culex pipiens* did not prefer a distinct sex in experimental trials (Cozzarolo, Sironi, Glaizot, Pigeault, & Christe, 2019). Another hypothesis for our finding could be a different exposure of female goshawks to infected prey species, since a common proffered explanation for sexual size dimorphism in raptor species is that it allows prey size partitioning between the sexes (Boal & Mannan, 1996). But Boal and Mannan (1996) found no difference between goshawk sexes in mean mass of prey captured during the breeding seasons of three years in northern Arizona. In conclusion, causes of the female-biased sex ratio in our report or whether this is due to coincidence remain unclear.

Descriptions of clinical findings in WNV-infected free-ranging goshawks are brief in most reports. Often birds were found dead or died shortly after onset of clinical signs. Described symptoms include depression, loss of appetite, reduced ability to perch, ataxia, head tilt, head tremors, impaired vision/blindness and seizures as well as torticollis and paresis (Erdelyi et al., 2007; Hubalek et al., 2018; Hubálek et al., 2019; Wünschmann et al., 2005). This is consistent with our findings. Concurrent diseases were found in the majority of our birds. Those could have also triggered some of the displayed symptoms like obtundation or inappetence.

In our birds, several unspecific changes in blood chemistry were observed and anaemia was a common finding. There are only few studies that report laboratory data of WNV-infected raptors. D'Agostino and Isaza (2004) tested eight of 11 WNV infected birds, including raptor species. Only hyperglobulinemia was diagnosed (2/8), but it was not mentioned in which species. Lopes et al. (2007) found mild elevation of creatine kinase activity in two great grey owls (*Strix nebulosa*). Most common haematologic abnormalities described by D'Agostino and Isaza (2004) included leukocytosis and heterophilia (n = 5). In contrast to our results [7/8 birds (88%) were anaemic and severe anaemia was observed in 2/8 birds (25%)], anaemia was not mentioned by D'Agostino and Isaza (2004). Joyner et al. (2006) found anaemia in all tested WNV-infected great horned owls (*Bubo virginianus*) and red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*). Necropsies were not performed in this study, so concurrent diseases in these birds were not ruled out. As emaciation or traumatic injuries were present in all our birds, the causal link of this finding is unclear. Interestingly, anaemia was

TABLE 4 Virological results by West Nile virus (WNV)-specific quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays (INEID, FLI-WNF (Eiden et al., 2010)) and serological results by Ingenasa-ELISA and by WNV- and Usutu virus (USUV)-neutralization test (VNT) of the ten goshawks (*Accipiter gentilis*) with fatal WNV infection

| Case No. | Virology | | | | Serology | | |
|----------|------------------|--------------------|---|-----------------------------|--------------------|-------------------|------|
| | qRT-PCR blood | | qRT-PCR Organ samples | | ELISA | VNT | VNT |
| | Assay 1 INEID | Assay 2 FLI-WNF | Tested tissue | Assay 1 INEID | WNV | WNV | USUV |
| | Ct-value | Ct-value | | | IP % ^a | ND50 ^b | ND50 |
| 1 | 32.74 | 32.79 | Heart/kidney/liver/spleen | 21.04/26.63/28.06/34.21 | 70.15 | 480 | 80 |
| 2 | n.t. | n.t. | Cerebrum/spleen/liver | 23.81/29.03/37.34 | No serum available | | |
| 3 | n.t. | n.t. | Cerebrum/heart/liver | 17.89/22.09/33.28 | 73.98 | 640 | 15 |
| 4 | 30.97 | 32.07 | Cerebrum/spleen/heart | 13.05/28.96/30.89 | 83.36 | 1,280 | 40 |
| 5 | >42 | >42 | Cerebrum/cerebellum/spleen/ liver/heart/lung | >42/35.99/>42/>42/34.02/>42 | 84.15 | 1,920 | 40 |
| 6 | 36.91 | 44.99 | Cerebrum/spleen/heart/kidney | 17.51/31.97/>42/>42 | 61.22 | 240 | <10 |
| 7 | 39.9 | neg. | Cerebrum/spleen/heart | 24.59/28.33/33.5 | 83.39 | 640 | 40 |
| 8 | 33.19 | 34.01 | Cerebrum/spleen/heart | 16.51/27.88/35.72 | 60.52 | 480 | 30 |
| 9 | >42 | >42 | Cerebrum/kidney/heart | 11.84/31.73/34.52 | 66.69 | 640 | 10 |
| 10 | 30.17 | 31.24 | Cerebrum/liver/spleen | 24.46/27.28/30.28 | 77.29 | 480 | 40 |

Abbreviations: Ct, Cycle threshold; IP, inhibition percentage; n.t., sample not available; ND50, neutralization dose 50%.

^aSamples will be considered positive, when the IP is $\geq 40\%$.

^bPositives highlighted in bold.

reported in a high proportion of human patients upon admission during a West Nile fever outbreak, but, as in our cases, the underlying cause remained unclear since anaemia has not been reported as a common finding in other flaviviral infections in humans (Chowers et al., 2001).

Gross lesions and histopathological findings were mainly consistent with previous reports of WNV-infected goshawks and falcons (Erdelyi et al., 2007; Wünschmann et al., 2005; Ziegler et al., 2013). Central nervous system lesions were the most striking histopathological findings with the cerebrum most severely affected. These findings reflect the clinical presentation of all birds, which was dominated by cerebral symptoms.

Besides the brain, the heart was the second most affected site characterized by a necrotizing myocarditis (6/10) with signs of fibrotic reparation in some of these birds. In this regard, signs of fibrosis—as a typical reparation process—indicate an at least subacute process. The comparable low detection of viral antigen in cardiomyocytes of five birds (5/10) might be due to an early clearance of WNV antigen leading to a loss of visibility of the IHC signal in advanced stages of disease (Angenvoort et al., 2014).

Although histopathological lesions of the kidney were mild, WNV antigen was detectable by IHC in eight of ten goshawks.

Noteworthy is the involvement of the skeletal muscle, which showed, besides a myositis (7/10), a distinct accumulation of WNV antigen in myocytes and associated inflammatory cells (9/10). Wünschmann et al. (2005) already considered other tissues, besides heart and kidney, equally or even more useful for the detection of WNV antigen in birds by IHC.

In contrast to Wünschmann et al. (2005), who found pancreatitis in six of twelve WNV infected goshawks, pancreas was not affected in any of the birds in this report.

In summary, the combination of a necrotizing inflammation in brain, heart and skeletal muscle is indicative for WNV infection in goshawks. Furthermore, WNV antigen detection by IHC in goshawks is best performed on brain, skeletal muscle, heart and particularly kidney. The results obtained by IHC correlated well with PCR results.

Unlike the findings of Wünschmann et al. (2005), concurrent diseases were present in most of the birds in our report and all were in poor to cachectic body condition. Emaciation or cachexia seems to be a common finding in free-ranging raptor species with WNV infection (Erdelyi et al., 2007; Wünschmann et al., 2005). In contrast to that, captive individuals with WNV infection were regularly in good body condition (Wünschmann et al., 2005), likely due to earlier presentation. However, starvation is a known cause of goshawk mortality, especially in juvenile birds after dispersal from natal areas (Kenward et al., 1999; Wiens, Noon, & Reynolds, 2006). Time of presentation corresponded to the post-fledgling period of the juvenile goshawks, so a poor body condition due to poor hunting success could have left the birds more prone to WNV infection as well as to concurrent diseases.

But the high ND50 titre in addition to mild lesions specific for a viral infection and minor amounts of viral antigen in only few tissue samples of goshawk no. 5 indicate that the bird was close to overcome the WNV infection. This bird was admitted with significant traumatic injuries (fracture of the carina sterni, extensive

subcutaneous haemorrhages) and severe anaemia that were most likely the cause of displayed symptoms and death. In this case, the WNV infection could have predisposed the bird for trauma resulting in death.

Astonishingly, in all serological investigated goshawks (9/10) specific WNV antibodies were determined. Some goshawks had already quite high ND50 titres, ranged between 1/640 and 1/1920 ND50. These high titres are directly related to the proven WNV infection and the occurred clinical symptoms. Similarly results were obtained by the experimental infection of large falcons with different WNV doses (Ziegler et al., 2013), where antibodies to WNV were initially detected by ELISA and neutralization assay after 6 days post infection (dpi). After 14 dpi, at the end of the experiment, neutralizing antibody titres ranged from 1/160 up to 1/2560 ND50.

All clinical cases occurred during the season of high mosquito activity (Johnson et al., 2018). Suitable vectors (*Culex* mosquitoes) are present in Germany (Jansen et al., 2019; Leggewie et al., 2016), so the route of infection was most likely via mosquito-vector.

However, prior to 2019 no circulation of WNV in German mosquitoes could be detected, although a great number of field-collected mosquitoes were tested annually and different arboviruses were identified (Scheuch et al., 2018). In the summers of 2016 and 2017, more than 3,800 mosquitoes were collected at Tierpark Berlin, but all tested negative for flaviviruses (Heym, Kampen, Krone, Schäfer, & Werner, 2019). Only the mosquito examinations linked to 2018 and 2019 WNV outbreak scenarios in eastern Germany resulted in seven WNV RNA positive pools of mosquitoes collected in the Tierpark Berlin in 2019 (Kampen et al., 2020).

In addition, oral routes of infection are described experimentally for different bird species (Komar et al., 2003; Nemeth et al., 2006), but not for Accipitriformes. Garmendia et al. (2000) suspected an oral route of infection in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*) that had died in winter due to WNV. Rock pigeons (*Columba livia*) experimentally infected with WNV lineage 1 developed an infectious viremia, but did not develop clinical signs (Spedicato et al., 2016). Reisen et al. (2014) detected chronic infections more than 6 weeks after experimental infection in common ground doves (*Columbina passerina*). It might be speculated that pigeons could contribute to transmission of WNV to goshawks via oral route, since feral pigeons (*Columba livia domestica*) are the main prey of goshawks in Berlin (Altenkamp, 2015).

It remains unclear if WNV will affect the goshawk population or other bird populations in Germany. In North America, a negative effect for bird populations due to WNV was demonstrated for 23 of 49 bird species and 12 of these species did not show signs of recovery since WNV introduction (George et al., 2015).

Though goshawks are particularly susceptible to fatal WNV disease, there are reports of recovered captive individuals (Erdelyi et al., 2007). This is likely due to early presentation and supportive treatment, whereas free-ranging birds were usually presented in already poor body condition. Interestingly, two juvenile goshawks, presented to our clinic during the same time period, had high ND50

WNV-specific titres (1/240 and $\geq 1/3840$). In one of these birds, a weak PCR in blood was also noted (unpublished data). These birds had fractures caused by illegal gunshots and no signs indicative for WNV infection. This leads to the suggestion that these birds had overcome the infection.

West Nile virus infection should be included as a differential diagnosis in goshawks presented with obtundation and other neurological symptoms, especially in the summer and it should be considered that concurrent disease or trauma may be present.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Lesley Halter, Janine Weiß, Sabine Schulze, Katharina Thieme and Corinna Eule (Small Animal Clinic, Freie Universität Berlin, Germany) for the support. We also thank Cornelia Steffen, Katja Wittig, Gesine Kreplin and Ulrike Wilhelm (FLI-Institute, Greifswald, Germany) for excellent technical assistance in the laboratory.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare there is no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. Handling and diagnostic procedures involving live birds were performed as part of the veterinary clinical care.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing is not applicable to this article.

ORCID

Sina Feyer  <https://orcid.org/0000-0002-5498-0679>

Ute Ziegler  <https://orcid.org/0000-0001-5295-7339>

REFERENCES

- Altenkamp, R. (2002). *Bestandsentwicklung, Reproduktion und Brutbiologie einer urbanen Population des Habichts Accipiter gentilis (Linné 1758)*. Berlin, Germany: University of Berlin. (Unpublished diploma thesis).
- Altenkamp, R. (2015). *Die urbanen Habichte in Berlin*. Paper presented at the Tagung zum Vogel des Jahres 2015, Recklinghausen.
- Angenvoort, J., Fischer, D., Fast, C., Ziegler, U., Eiden, M., de La Fuente, J. G., ... Groschup, M. H. (2014). Limited efficacy of West Nile virus vaccines in large falcons (*Falco* spp.). *Veterinary Research*, 45(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-41>
- Bakonyi, T., Ferenczi, E., Erdelyi, K., Kutasi, O., Csorgo, T., Seidel, B., ... Nowotny, N. (2013). Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology*, 165(1–2), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>
- Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 618–623. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051379>
- Bernard, K. A., Maffei, J. G., Jones, S. A., Kauffman, E. B., Ebel, G., Dupuis, A. P. 2nd, ... Shi, P.-Y. (2001). West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 679. <https://doi.org/10.3201/eid0704.010415>

- Boal, C. W., & Mannan, R. W. (1996). Prey sizes of male and female northern goshawks. *The Southwestern Naturalist*, 41, 355–358.
- Burkett-Cadena, N. D., Bingham, A. M., & Unnasch, T. R. (2014). Sex-biased avian host use by arbovirus vectors. *Royal Society Open Science*, 1(3), 140262. <https://doi.org/10.1098/rsos.140262>
- Burkett-Cadena, N. D., Ligon, R. A., Liu, M., Hassan, H. K., Hill, G. E., Eubanks, M. D., & Unnasch, T. R. (2010). Vector–host interactions in avian nests: Do mosquitoes prefer nestlings over adults? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 395–399. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0048>
- Busquets, N., Laranjo-González, M., Soler, M., Nicolás, O., Rivas, R., Talavera, S., ... Aranda, C. (2019). Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 617–621. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>
- Caffrey, C., Smith, S. C. R., & Weston, T. J. (2005). West Nile virus devastates an American crow population. *The Condor*, 107(1), 128–132. <https://doi.org/10.1650/7646>
- Centers for Disease Control and Prevention (1999–2016). *Species of dead birds in which West Nile virus has been detected, United States, 1999–2016*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/BirdSpecies1999-2016.pdf>
- Chowers, M. Y., Lang, R., Nassar, F., Ben-David, D., Giladi, M., Rubinshtein, E., ... Kitzes, R. (2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 675. <https://doi.org/10.3201/eid0704.017414>
- Cozzarolo, C.-S., Sironi, N., Glaizot, O., Pigeault, R., & Christe, P. (2019). Sex-biased parasitism in vector-borne disease: Vector preference? *PLoS One*, 14(5), e0216360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007861>
- Csank, T., Bhide, K., Bencurova, E., Dolinska, S., Drzewniokova, P., Major, P., ... Pisl, J. (2016). Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a universal primer set. *Archives of Virology*, 161(6), 1679–1683. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2828-5>
- D'Agostino, J. J., & Isaza, R. (2004). Clinical signs and results of specific diagnostic testing among captive birds housed at zoological institutions and infected with West Nile virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(10), 1640–1643, 1606. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1640>
- Egizi, A. M., Farajollahi, A., & Fonseca, D. M. (2014). Diverse host feeding on nesting birds may limit early-season West Nile virus amplification. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 14(6), 447–453. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1536>
- Eiden, M., Vina-Rodriguez, A., Hoffmann, B., Ziegler, U., & Groschup, M. H. (2010). Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(5), 748–753. <https://doi.org/10.1177/104063871002200515>
- Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Szeredi, L., Ratz, F., Skare, J., & Bakonyi, T. (2007). Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), 181–188. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0586>
- Friedrich-Loeffler-Institut (2019a, October 7). *Erster Fall von West-Nil-Virus Infektion 2019* [Press release]. Retrieved from <https://www.fli.de/en/news/short-messages/short-message/erster-fall-von-west-nil-virus-infektion-2019/>
- Friedrich-Loeffler-Institut (2019b, September 12). *Weitere Ausbreitung des West-Nil-Virus: Fünf Infektionen bei Pferden und erhöhte Fallzahlen bei Vögeln festgestellt* [Press release]. Retrieved from <https://www.fli.de/de/presse/pressemitteilungen/presse-einzelsicht/weitere-ausbreitung-des-west-nil-virus-fuenf-infektionen-bei-pferden-und-erhoelte-fallzahlen-bei-voege/>
- Gancz, A. Y., Barker, I. K., Lindsay, R., Dibernardo, A., McKeever, K., & Hunter, B. (2004). West Nile virus outbreak in north American owls, Ontario, 2002. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2135. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040167>
- Garmendia, A. E., Van Kruiningen, H. J., French, R. A., Anderson, J. F., Andreadis, T. G., Kumar, A., & West, A. B. (2000). Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 3110–3111. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.3110-3111.2000>
- Garvin, M. C., Austin, A., Boyer, K., Gefke, M., Wright, C., Pryor, Y., ... Whelan, R. J. (2018). Attraction of *Culex pipiens* to house sparrows is influenced by host age but not uropygial gland secretions. *Insects*, 9(4), 127. <https://doi.org/10.3390/insects9040127>
- George, T. L., Harrigan, R. J., LaManna, J. A., DeSante, D. F., Saracco, J. F., & Smith, T. B. (2015). Persistent impacts of West Nile virus on North American bird populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(46), 14290–14294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507747112>
- Heym, E. C., Kampen, H., Krone, O., Schäfer, M., & Werner, D. (2019). Molecular detection of vector-borne pathogens from mosquitoes collected in two zoological gardens in Germany. *Parasitology Research*, 118(7), 2097–2105. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06327-5>
- Hubálek, Z., Kosina, M., Rudolf, I., Mendel, J., Strakova, P., & Tomesek, M. (2018). Mortality of goshawks (*Accipiter gentilis*) due to West Nile virus lineage 2. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 18(11), 624–627. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2289>
- Hubálek, Z., Tomešek, M., Kosina, M., Šikutová, S., Straková, P., & Rudolf, I. (2019). West Nile virus outbreak in captive and wild raptors, Czech Republic, 2018. *Zoonoses and Public Health*, 66(8), 978–981. <https://doi.org/10.1111/zph.12638>
- Jansen, S., Heitmann, A., Lühken, R., Leggewie, M., Helms, M., Badusche, M., ... Tannich, E. (2019). *Culex torrentium*: A potent vector for the transmission of West Nile virus in Central Europe. *Viruses*, 11(6), 492. <https://doi.org/10.3390/v11060492>
- Johnson, N., Fernández de Marco, M., Giovannini, A., Ippoliti, C., Danzetta, M., Svartz, G., ... Mirazimi, A. (2018). Emerging mosquito-borne threats and the response from European and Eastern Mediterranean Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(12), 2775. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122775>
- Jöst, H., Bialonski, A., Maus, D., Sambri, V., Eiden, M., Groschup, M. H., ... Schmidt-Chanasit, J. (2011). Isolation of Usutu virus in Germany. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(3), 551–553. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0248>
- Joyner, P. H., Kelly, S., Shreve, A. A., Snead, S. E., Sleeman, J. M., & Pettit, D. A. (2006). West Nile virus in raptors from Virginia during 2003: Clinical, diagnostic, and epidemiologic findings. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2), 335–344. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.335>
- Kampen, H., Holicki, C. M., Ziegler, U., Groschup, M. H., Tews, B. A., & Werner, D. (2020). West Nile virus mosquito vectors (Diptera: Culicidae) in Germany. *Viruses*, 12(5), 493. <https://doi.org/10.3390/v12050493>
- Kenward, R., Marcström, V., & Karlbom, M. (1999). Demographic estimates from radio-tagging: Models of age-specific survival and breeding in the goshawk. *Journal of Animal Ecology*, 68(5), 1020–1033. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00347.x>
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., ... Bunning, M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 311. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020628>
- Kramer, L. D., & Bernard, K. A. (2001). West Nile virus infection in birds and mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951, 84–93. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02687.x>
- Leggewie, M., Badusche, M., Rudolf, M., Jansen, S., Börstler, J., Krumkamp, R., ... Tannich, E. (2016). *Culex pipiens* and *Culex torrentium* populations from Central Europe are susceptible to West

- Nile virus infection. *One Health*, 2, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.04.001>
- Lopes, H., Redig, P., Glaser, A., Armien, A., & Wünschmann, A. (2007). Clinical findings, lesions, and viral antigen distribution in great gray owls (*Strix nebulosa*) and barred owls (*Strix varia*) with spontaneous West Nile virus infection. *Avian Diseases*, 51(1), 140–145. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2007\)051\[0140:CFLAVA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2007)051[0140:CFLAVA]2.0.CO;2)
- Mueller, H. C., Berger, D. D., & Allez, G. (1976). Age and sex variation in the size of goshawks. *Bird-Banding*, 47(4), 310–318. <https://doi.org/10.2307/4512266>
- Müller, K. (2012). *Untersuchungen zur Hämatologie, Blutchemie und dem Vitaminstoffwechsel frei lebender mitteleuropäischer Greifvögel*. Berlin, Germany: University of Berlin. (Unpublished habilitation thesis).
- Nemeth, N., Gould, D., Bowen, R., & Komar, N. (2006). Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), 1–13. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.1>
- Nemeth, N. M., Kratz, G. E., Bates, R., Scherpelz, J. A., Bowen, R. A., & Komar, N. (2009). Clinical evaluation and outcomes of naturally acquired West Nile virus infection in raptors. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(1), 51–63. <https://doi.org/10.1638/2007-0109.1>
- Petrovic, T., Blazquez, A. B., Lupulovic, D., Lazic, G., Escribano-Romero, E., Fabijan, D., ... Saiz, J. (2013). Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: First isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Eurosurveillance*, 18(44), 20622. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.44.20622>
- Rappole, J. H., & Hubalek, Z. (2003). Migratory birds and West Nile virus. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 47–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.6.x>
- Reisen, W. K., Fang, Y., Lothrop, H. D., Martinez, V. M., Wilson, J., O'Connor, P., ... Brault, A. C. (2014). Overwintering of West Nile virus in southern California. *Journal of Medical Entomology*, 43(2), 344–355. <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.2.344>
- Robert Koch-Institut. (2019, October 24). *Epidemiologisches Bulletin* [Press release]. Retrieved from https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/43_19.pdf?__blob=publicationFile
- Savini, G., Puggioni, G., Di gennaro, A., Di francesco, G., Rocchigiani, A. M., Polci, A., ... Monaco, F. (2013). West Nile virus lineage 2 in Sardinian wild birds in 2012: A further threat to public health. *Epidemiology and Infection*, 141(11), 2313–2316. <https://doi.org/10.1017/S0950268812003147>
- Scheuch, D. E., Schäfer, M., Eiden, M., Heym, E. C., Ziegler, U., Walther, D., ... Kampen, H. (2018). Detection of Usutu, Sindbis, and Batai viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in Germany, 2011–2016. *Viruses*, 10(7), 389. <https://doi.org/10.3390/v10070389>
- Seidowski, D., Ziegler, U., Von Rönn, J. A., Müller, K., Hüppop, K., Müller, T., ... Ulrich, R. G. (2010). West Nile virus monitoring of migratory and resident birds in Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(7), 639–647. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0236>
- Sovada, M. A., Pietz, P. J., Converse, K. A., King, D. T., Hofmeister, E. K., Scherr, P., & Ip, H. S. (2008). Impact of West Nile virus and other mortality factors on American white pelicans at breeding colonies in the northern plains of North America. *Biological Conservation*, 141(4), 1021–1031. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.01.019>
- Spedicato, M., Carmine, I., Bellacicco, A. L., Marruchella, G., Marini, V., Piscicella, M., ... Savini, G. (2016). Experimental infection of rock pigeons (*Columba livia*) with three West Nile virus lineage 1 strains isolated in Italy between 2009 and 2012. *Epidemiology and Infection*, 144(6), 1301–1311. <https://doi.org/10.1017/S0950268815002642>
- Steele, K. E., Linn, M. J., Schoepp, R. J., Komar, N., Geisbert, T. W., Manduca, R. M., ... McNamara, T. S. (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Veterinary Pathology*, 37(3), 208–224. <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-208>
- Swayne, D. E., Beck, J. R., Smith, C. S., Shieh, W.-J., & Zaki, S. R. (2001). Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 751. <https://doi.org/10.3201/eid0704.017429>
- Weissenböck, H., Hubálek, Z., Bakonyi, T., & Nowotny, N. (2010). Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.025>
- Wiens, J. D., Noon, B. R., & Reynolds, R. T. (2006). Post-fledging survival of northern goshawks: The importance of prey abundance, weather, and dispersal. *Ecological Applications*, 16(1), 406–418. <https://doi.org/10.1890/04-1915>
- Wodak, E., Richter, S., Bago, Z., Revilla-Fernandez, S., Weissenböck, H., Nowotny, N., & Winter, P. (2011). Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Veterinary Microbiology*, 149(3–4), 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.012>
- Wünschmann, A., Shivers, J., Bender, J., Carroll, L., Fuller, S., Saggese, M., ... Redig, P. (2004). Pathologic findings in red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*) and Cooper's hawks (*Accipiter cooperi*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Diseases*, 48(3), 570–580. <https://doi.org/10.1637/7170-022004R>
- Wünschmann, A., Shivers, J., Bender, J., Carroll, L., Fuller, S., Saggese, M., ... Redig, P. (2005). Pathologic and immunohistochemical findings in goshawks (*Accipiter gentilis*) and great horned owls (*Bubo virginianus*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Diseases*, 49(2), 252–259. <https://doi.org/10.1637/7297-103104R>
- Yaremych, S. A., Levensgood, J. M., Novak, R. J., Mankin, P. C., & Warner, R. E. (2004). Gender determination and lack of sex-specific West Nile virus mortality in American crows. *Wildlife Society Bulletin*, 32(3), 893–899. [https://doi.org/10.2193/0091-7648\(2004\)032\[0893:GDALOS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2193/0091-7648(2004)032[0893:GDALOS]2.0.CO;2)
- Ziegler, U., Angenooort, J., Fischer, D., Fast, C., Eiden, M., Rodriguez, A. V., ... Groschup, M. H. (2013). Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons. *Veterinary Microbiology*, 161(3–4), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.041>
- Ziegler, U., Luhken, R., Keller, M., Cadar, D., van der Grinten, E., Michel, F., ... Groschup, M. H. (2019). West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Research*, 162, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.005>
- Ziegler, U., Santos, P., Groschup, M. H., Hattendorf, C., Eiden, M., Höper, D., Lühken, R. (2020). West Nile virus epidemic in Germany triggered by epizootic emergence, 2019. *Viruses*, 12(4), 448. <https://doi.org/10.3390/v12040448>

How to cite this article: Feyer S, Bartenschlager F, Bertram CA, et al. Clinical, pathological and virological aspects of fatal West Nile virus infections in ten free-ranging goshawks (*Accipiter gentilis*) in Germany. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68:907–919. <https://doi.org/10.1111/tbed.13759>

APPENDIX

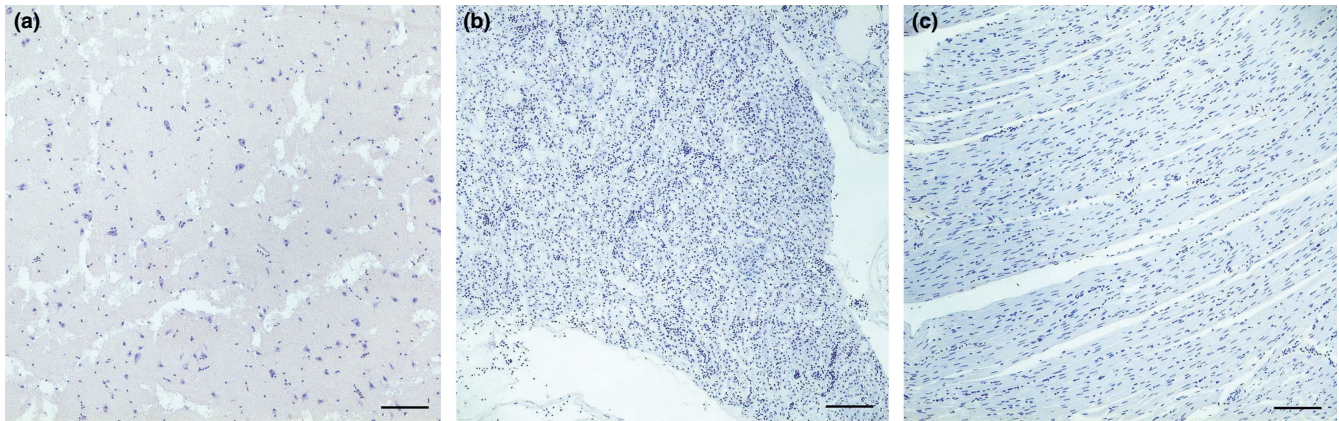
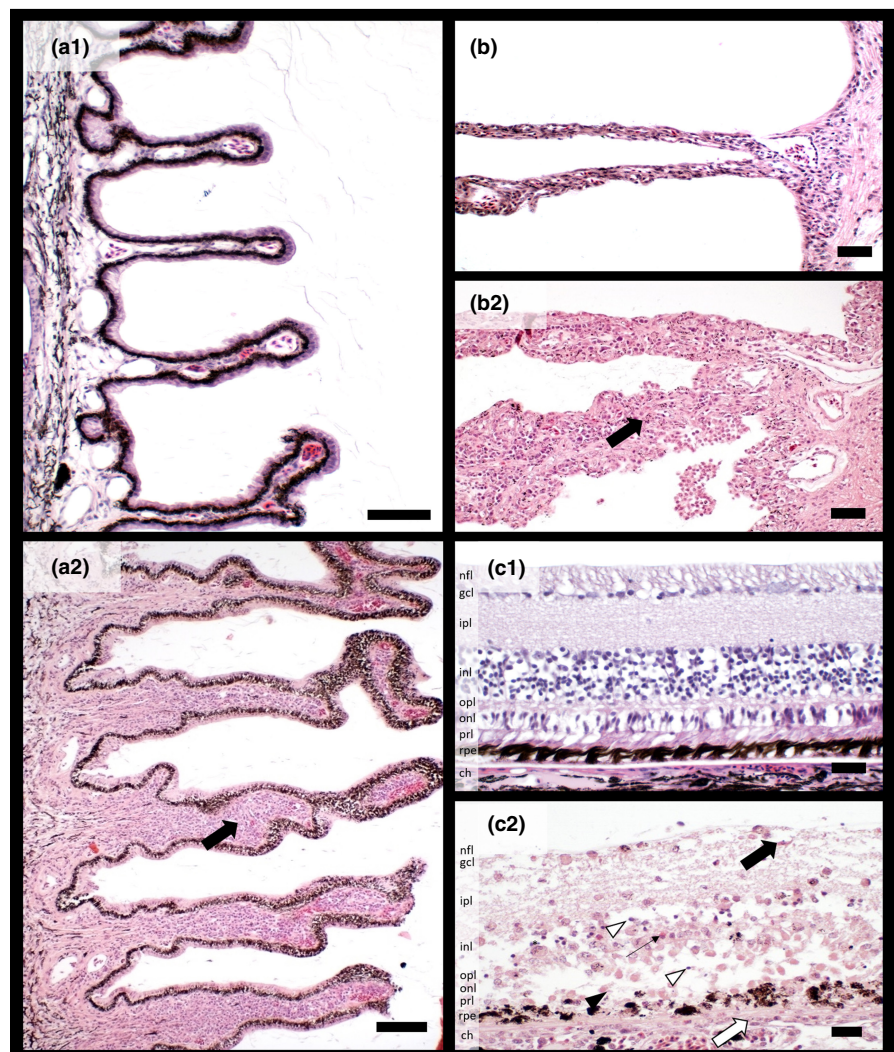


FIGURE A1 (a) Brain (cerebrum), (b) kidney and (c) heart of a goshawk from a routine submission without a WNV infection, Bar 50 μm ; the examination of this negative control was done with an in-house polyclonal antibody specific for WNV (pab OM8)

FIGURE A2 Sections of physiological eye tissues (ciliary body (a1), pecten oculi (b1) and retina (c1)) from a hooded crow (*Corvus cornix*) in comparison with identical locations (ciliary body (a2), pecten oculi (b2) and retina (c2)) of WNV infected goshawks discussed in this article and shown in Figure 1e. Haematoxylin and eosin (HE). The ciliary processes (a2, arrow) and pectineal folds (b2, arrow) of the WNV infected bird are distended up to three respectively four times due to an infiltration of mononuclear inflammatory cells. Retinal necrosis (c2, ch = choroidea, rpe = retinal pigment epithelium, prl = photoreceptor layer, onl = outer nuclear layer, opl = outer plexiform layer, inl = inner nuclear layer, ipl = inner plexiform layer, gcl = ganglion cell layer, nfl = nerve fibre layer) is characterized by the loss of the photoreceptor-interdigitation of the rpe, rounded and necrotic photoreceptors (c2, closed arrowhead), virtually entire destruction of the onl and inl (c2, open arrowheads), rarefication of the opl and ipl, degeneration of the ganglion cells (c2, fat arrow) and presence of foamy macrophages and heterophils (c2, asterisk, thin arrow) within all retinal layers. Bars indicate: 20 μm (c1, c2), 50 μm (b1, b2), 100 μm (a1, a2)



4. Diskussion

4.1 Anwendbarkeit des neurologischen Untersuchungsganges bei gesunden Vögeln

Die Studie 1 konnte einige neurologische Tests als geeignet für die untersuchten Vogelarten identifizieren, jedoch waren artspezifische Unterschiede bezüglich der Anwendbarkeit feststellbar. Im Folgenden werden ein paar Beispiele herausgearbeitet.

Alle Parameter, die aufgrund reiner Beobachtung und ohne Berührung des Tieres bewertet wurden, waren bei allen Individuen gut zu beurteilen und umfassten das Bewusstsein, die Haltung, das Gangbild und Symmetrien im Bereich des Kopfes. Dies deckt sich mit Studien bei Kleinsäugetern (Warnefors et al. 2019; Berg et al. 2021; Dietzel et al. 2024) und Reptilien (Chrisman et al. 1997; Hedley et al. 2021; Tarbert et al. 2022).

Bei der Überprüfung der Kopfnerven waren die okulovestibuläre Reaktion und der Lidreflex am zuverlässigsten und bei allen untersuchten Tieren auslösbar. Bezüglich des Lidreflexes deckt sich dieses Ergebnis mit ophthalmologischen Studien an gesunden Individuen verschiedener Vogelarten, die okulovestibuläre Reaktion wurde in diesen Veröffentlichungen dagegen nicht untersucht (Harris et al. 2008; Kuhn et al. 2013; Wills et al. 2016; Ansari Mood et al. 2017; O'Connell et al. 2017; Park et al. 2017; Hwang et al. 2020). Eine positive Drohreaktion war artspezifisch variabel zu beobachten: Bei Schwänen sehr zuverlässig bei 100 % der Tiere, bei Tauben und Greifvögeln jedoch nur bei 50 % bis 70 %. Auch in den in der Fachliteratur vorhandenen Studien konnte die Drohreaktion in sehr unterschiedlichem Ausmaß bei Vögeln ausgelöst werden – entweder bei allen Tieren einer Art, einem Teil oder keinem Tier (Harris et al. 2008; Kuhn et al. 2013; Wills et al. 2016; Ansari Mood et al. 2017; O'Connell et al. 2017; Park et al. 2017; Hwang et al. 2020). In den eigenen Untersuchungen war zusätzlich auffallend, dass es artspezifisch Unterschiede in der Ausprägung der Drohreaktion bzw. des Lidreflexes gab: Während der Großteil der Tauben die Augenlider schlossen, erfolgte bei den Greifvögeln und Schwänen ein Schluss der Nickhaut. Unterschiede im Blinzelnverhalten wurden auch von Morris und Parsons (2023) beobachtet, die Filmaufnahmen von 561 verschiedenen Vogelarten bezüglich der Art des Lidschlusses auswerteten. Sie stellten fest, dass artspezifisch und situationsabhängig entweder nur die Nickhaut oder aber die Ober- und Unterlider (ebenfalls in unterschiedlichen Anteilen, teilweise auch in Kombination mit der Nickhaut) beim Blinzeln involviert waren. Passend zu den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen wurde in dieser Studie bei allen 37 untersuchten Taubenarten (inklusive Haustauben) Blinzeln mit Augenlibeteiligung beobachtet, während dies nur bei zwei von 48 untersuchten Arten aus der Familie der Anatidae und nicht bei Höckerschwänen nachgewiesen wurde (Morris und Parsons 2023).

Im Gegensatz zu Hunden (Talbot 1974), Katzen (Coulmance et al. 1979; Czarkowska-Bauch 1990) und Kaninchen (Tsai et al. 2023), wurden bei Vögeln die Haltungs- und Stellreaktionen bisher nicht systematisch untersucht (Jones und Orosz 1996; Orosz und Antinoff 2016). Bei diesen Tests waren in den eigenen Untersuchungen Unterschiede bezüglich der Durchführbarkeit zwischen den drei Untersuchungsgruppen auffallend. Die Hüpfreaktion, die Korrekturreaktionen von Flügeln und Zehen sowie die Unterstützungsreaktion konnten bei allen Schwänen und Tauben durchgeführt und beurteilt werden.

Die „Drop and flap“-Reaktion war dagegen bei Schwänen aufgrund der Größe und des Körpergewichtes dieser Vögel teilweise schwer durchführbar und nur bei 62 % der Tiere auslösbar, während sie bei den anderen zwei Untersuchungsgruppen bei 100 % der Vögel getestet und ausgelöst werden konnte.

Bei den Greifvögeln konnten die Haltungs- und Stellreaktionen der Hintergliedmaßen artübergreifend nur bei einem kleinen Anteil der Vögel überprüft werden, da diese Arten mit starkem Abwehrverhalten reagierten und damit eine erhöhte Verletzungsgefahr für den Untersucher einherging. Wenn durchführbar, reagierte ein Teil der Tiere gar nicht auf Veränderungen der Körper- bzw. Hintergliedmaßenposition.

Auch bei den spinalen Reflexen kam es artspezifisch zu variablen Ergebnissen in der Auslösbarkeit, wobei der Flexorreflex der Hintergliedmaßen am zuverlässigsten und bei allen Greifvögeln und Tauben vorhanden war. Bei 14 % der Schwäne dagegen fehlte er. Auffallend war, dass der Gastrocnemiusreflex bei keinem Individuum auslösbar war. Somit ist dieser Reflex, vergleichbar zu Kleintieren, ohne klinischen Nutzen (de Lahunta et al. 2021).

Limitierend bei dieser Studie ist die Herkunft der Tiere. Da es sich, mit Ausnahme von 18 Tauben, ausschließlich um freilebende Vögel handelte, waren die Vögel nicht an Handling gewöhnt. Stress wird als Hauptfaktor für fehlende Reflexantworten bei Vögeln genannt (Clippinger et al. 2007). Zudem fehlten teilweise Informationen zu Vorerkrankungen, Alter und Geschlecht der Wildvögel. Aus diesen Gründen konnte der Einfluss dieser Faktoren auf das Ergebnis der einzelnen neurologischen Tests nicht bewertet werden. Mit Ausnahme der Turmfalken und Habichte haben die untersuchten Arten keinen deutlich erkennbaren Geschlechtsdimorphismus (Glutz von Blotzheim und Bauer 2001a; Glutz von Blotzheim und Bauer 2001b; Glutz von Blotzheim et al. 2001). Somit wäre eine Geschlechtsbestimmung nur mit einer invasiven (z.B. endoskopische Geschlechtsbestimmung) oder kostenintensiven Methode (Desoxyribonukleinsäure-Analyse) möglich gewesen. Da zudem bei Katzen (Foss et al. 2021) und Hunden (Giebels et al. 2014; Giebels et al. 2019) kein Einfluss des Geschlechtes auf einzelne Reflexantworten nachgewiesen werden konnte, wurde auf eine Geschlechtsbestimmung verzichtet.

Bei Kleintieren kann ein sehr junges als auch ein stark fortgeschrittenes Alter einen Einfluss auf verschiedene neurologische Tests haben. Für die Drohreaktion bei Haustieren (Hunde, Katzen, Pferde, Rinder) ist bekannt, dass es sich um eine erlernte Reaktion handelt, die erst im Alter von einigen Tagen (Großtiere) bis Wochen (Kleintiere) auslösbar ist (de Lahunta et al. 2021). Ein höheres Alter hat bei Hunden die Reflexaktivität des Patellarsehnenreflexes beeinflusst (Levine et al. 2002; Willems et al. 2017). Bei geriatrischen, neurologisch unauffälligen Hunden war dabei häufiger ein fehlender Patellarsehnenreflex feststellbar (Levine et al. 2002). In anderen Studien hatte das Alter dagegen keinen Einfluss auf verschiedene Reflexantworten bei Hunden (Muguet-Chanoit et al. 2011; Giebels et al. 2014; Giebels et al. 2019) und Katzen (Quitt et al. 2019; Foss et al. 2021). Eine Alterseinteilung erfolgte bei den untersuchten Vögeln anhand morphologischer Kriterien artspezifisch in juvenil und adult (Glutz von Blotzheim und Bauer 2001a; Glutz von Blotzheim und Bauer 2001b; Glutz von Blotzheim et al. 2001), war jedoch nicht präzise in Monate oder Jahre möglich. Um einen möglichen Alterseinfluss zu minimieren, wurden Nestlinge von der Untersuchung ausgeschlossen.

Eine weitere Limitation der Studie ist die Heterogenität der untersuchten Greifvogelgruppe. Da ausschließlich freilebende Greifvögel untersucht wurden, die als Patienten in der Klein- und Heimtierklinik der FU Berlin vorgestellt wurden, waren im Studienzeitraum nicht genügend Greifvögel einer Art verfügbar, um eine statistische Auswertung vornehmen und damit Aussagen zur Gesamtpopulation treffen zu können. Da bis zu dem Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen keine Daten für Vögel in der Fachliteratur verfügbar waren, wurden drei verschiedene Vogelarten in die dritte Untersuchungsgruppe eingeschlossen und die Ergebnisse berichtet. So konnte aber demonstriert werden, dass beispielweise die Überprüfung der Haltungs- und Stellreaktionen bei allen Greifvogelarten aufgrund von Abwehrverhalten deutlich schwieriger war als bei den Tauben und Höckerschwänen.

4.2 Klinische Präsentation und Diagnosestellung bei Habichten mit WNV-Infektion

Im Rahmen der Studie 2 wurde eine im Jahr 2018 erstmals in Deutschland diagnostizierte Infektionserkrankung, die neurologische Symptome bei Habichten hervorrufen kann, klinisch charakterisiert.

Das WNV ist ein zoonotischer Erreger mit zunehmender weltweiter Ausbreitung und Ausbruchsintensität (Simonin 2024). In vielen Ländern – inklusive Deutschland – wurden Monitoring-Programme eingerichtet, die insbesondere auf die Untersuchung von Wildvögeln (Blutproben und Tierkörper) abzielen (Seidowski et al. 2010; Johnson et al. 2018). Zudem zählt eine WNV-Infektion bei einem Vogel in Deutschland zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen (BMEL 2011). Die Kenntnis der möglichen klinischen Symptomatik bei einer Vogelart ist entscheidend, um dieser Anzeigepflicht nachzukommen. Die Empfänglichkeit und damit auch

die klinische Ausprägung einer Erkrankung durch das WNV ist speziesspezifisch. Habichte gelten in Europa im Vergleich zu anderen Greifvögeln als besonders empfänglich für klinisch apparente WNV-Infektionen, da das Virus in den letzten Jahren in verschiedenen Ländern Europas wiederholt bei dieser Art nachgewiesen wurde – überwiegend bei tot aufgefundenen Vögeln oder bei nach kurzer Erkrankung akut verstorbenen Einzeltieren (Bakonyi et al. 2006; Erdelyi et al. 2007; Wodak et al. 2011; Bakonyi et al. 2013; Petrovic et al. 2013; Savini et al. 2013; Csank et al. 2016; Hubalek et al. 2018; Busquets et al. 2019; Hubálek et al. 2019; Michel et al. 2019; Ziegler et al. 2019a). So wurde beispielsweise bei einem größeren WNV-Ausbruch in Europa 2008 bis 2009 in Ungarn und Österreich unter tot aufgefundenen Vögeln das WNV vor allem bei Habichten (bei 35 von 57 Tieren) nachgewiesen, bei wenigen anderen Arten dagegen nur vereinzelt (Bakonyi et al. 2013). Auch in Deutschland wurden WNV-Infektionen bei Vögeln in den Jahren 2018 bis 2020 anteilig vor allem bei Habichten nachgewiesen (Ziegler et al. 2022). Da im Rahmen des nationalen Monitoring-Programmes Blutproben von verschiedensten Greifvogelarten untersucht werden (Ziegler et al. 2020; Ziegler et al. 2022), ist der Anteil der positiven Habichte auffallend. Insbesondere auch im Hinblick darauf, dass die Habichtpopulation im Vergleich zu anderen Greifvogelarten in Europa eher klein ist (Vidaña et al. 2020). Für Deutschland wird der Brutbestand von Habichten auf circa 11.500 bis 16.500 Tiere geschätzt, während der Brutbestand von z.B. Sperbern bei 22.000 bis 34.000 Tieren, von Turmfalken bei 44.000 bis 74.000 und von Mäusebussarden bei 80.000 bis 135.000 Tieren liegt (Grüneberg et al. 2015).

Die Ursachen für die Empfänglichkeit von Habichten für eine WNV-Infektion sind unklar. Experimentelle Studien wurden bei dieser Art bisher nicht durchgeführt. Für andere Greifvogelarten wurden experimentell, neben einer Infektion über Mückenstiche, auch orale Infektionsrouten über infizierte Beutetiere nachgewiesen (Komar et al. 2003; Nemeth et al. 2006). Vidaña et al. (2020) diskutiert aus diesem Grund Unterschiede im Beutespektrum als Ursache für die vermehrte Empfänglichkeit von Habichten. Habichte erbeuten überwiegend Vögel, die als Reservoir für das Virus dienen können, während beispielsweise Mäusebussarde und Turmfalken vor allem kleinere Säugetiere fressen (Glutz von Blotzheim et al. 2001; Vidaña et al. 2020). Die Zusammensetzung des Beutespektrums von Habichten variiert in Europa, regional übergreifend werden aber zu einem großen Anteil Tauben als Nahrung erbeutet (Rutz et al. 2006). Da in experimentellen und serologischen Feld-Studien bei Felsentauben (*Columba livia*) gezeigt werden konnte, dass Felsentauben ausreichend virämisch werden können, um als kompetente Reservoirwirte in Frage zu kommen und dabei in der Regel klinisch nicht erkranken (Allison et al. 2004; Spedicato et al. 2016), vermuten einige Autoren, dass Tauben über orale Infektionswege zu einer Infektion von Greifvögeln beitragen könnten (Saito et al. 2007; Bakonyi et al. 2013). Allerdings sind andere empfängliche Greifvogelarten wie Wanderfalken (*Falco peregrinus*), die ebenfalls zu einem großen Anteil Tauben fressen

(Glutz von Blotzheim et al. 2001), nicht in dem Ausmaß betroffen wie Habichte (Bakonyi et al. 2013).

Die neurologischen Symptome der Habichte mit WNV-Infektion der eigenen Untersuchungen umfassten Stupor, Krampfanfälle, Kopftremor, Kopfschiefhaltung, Ataxie und Monoplegie und decken sich weitestgehend mit der in der Literatur beschriebenen Symptomatik für Habichte (Wünschmann et al. 2005; Bakonyi et al. 2006; Erdelyi et al. 2007; Wodak et al. 2011; Savini et al. 2013; Hubalek et al. 2018; Busquets et al. 2019; Hubálek et al. 2019). In diesen Publikationen werden jedoch nur die Symptome erwähnt. Eine detaillierte Beschreibung des klinischen Krankheitsbildes bei Habichten, inklusive der Ergebnisse einer neurologischen Untersuchung, bildgebender Befunde sowie klinisch-chemischer und hämatologischer Laborparameter, waren in der zugänglichen Fachliteratur bis zum Zeitpunkt dieser Studie nicht verfügbar. Aus der Kleintiermedizin ist bekannt, dass z. B. bei Hunden mit infektiös-entzündlichen Erkrankungen des ZNS eine spezifische Diagnose häufig schwierig zu stellen ist (Tipold 1995). Die genaue Erfassung der klinischen Symptome in Kombination mit weiterführenden Untersuchungen kann die Diagnosestellung erleichtern (Tipold 1995). Somit sind die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen ein wichtiger Beitrag, um die Diagnosestellung dieser Erkrankungen bei Vögeln und insbesondere bei Habichten zu verbessern.

Die neuroanatomische Lokalisation der Läsionen wurde in den eigenen Untersuchungen anhand der verfügbaren Informationen für Vögel und Kleintiere vorgenommen (Clippinger et al. 2007; Lorenz et al. 2011). Einige neurologische Symptome waren dabei insbesondere hinweisend auf wenige bestimmte Lokalisationen innerhalb des ZNS: Die Bewusstseinsstörungen wiesen auf eine Läsion im Großhirn oder Stammhirn, die Krampfanfälle auf eine Läsion im Großhirn und die Kopftremores auf eine Läsion im Kleinhirn hin. Die Gesamtheit der Symptome führte bei acht von neun neurologisch untersuchten Tieren zu einer multifokalen Lokalisation innerhalb des ZNS.

Unter Berücksichtigung der blutchemischen und hämatologischen Befunde, die keine Hinweise auf eine metabolische Ursache (wie z.B. eine Hypoglykämie, Hypokalzämie, Leber- und Nierenfunktionsstörung) für Bewusstseinsstörungen oder Krämpfe ergaben (Jones und Orosz 1996; Chandler und Volk 2008), waren zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchungen ein Trauma, eine infektiös-entzündliche Erkrankung des ZNS oder eine toxische Ursache (wie z.B. eine Bleiintoxikation) die wahrscheinlichsten Differenzialdiagnosen.

Eine Bleiintoxikation wurde bisher nur bei drei freilebenden Habichten beschrieben (Pain und Amiardtriquet 1993; Kenntner et al. 2003). Nur für eines dieser Tiere wird eine klinische Symptomatik in Form einer Paraplegie erwähnt (Kenntner et al. 2003). Typische Befunde bei einer Bleiintoxikation bei anderen Greifvögeln, wie dem Seeadler (*Haliaeetus albicilla*), sind

Apathie, Dyspnoe, Kropfstase, Erbrechen, ein schlechter Ernährungszustand, hämolytische Anämie und Biliverdinurie sowie neurologische Symptome wie Krampfanfälle, Ataxie, Kopftremor, Tortikollis, Kopfnervenausfällen sowie Paresen der Gliedmaßen (Müller et al. 2007; Halter-Gölkel 2022). Eine Bleiintoxikation wird bei Vögeln vor allem durch die orale Aufnahme von Bleimunition hervorgerufen, daher sind Vogelarten wie der Seeadler, die vermehrt Aas als Nahrungsquelle nutzen, insbesondere in den Wintermonaten häufiger betroffen (Pain und Amiardtriquet 1993). Da Habichte kaum tote Beutetiere fressen, wird das Risiko für eine Bleiintoxikation bei dieser Art in Deutschland als sehr gering eingeschätzt (Kenntner et al. 2003). Obwohl keine Messung der Blutbleikonzentration bei den Habichten erfolgte, war eine Bleiintoxikation unwahrscheinlich, da weder die klinischen Befunde noch die weiterführenden Untersuchungen Hinweise darauf gaben.

Bei einem akuten, progressiven Verlauf und dem multifokalen Erscheinungsbild sind entzündliche Erkrankungen des ZNS bei Kleintieren als Ursache wahrscheinlich (Gandini et al. 2007). Aus diesem Grund schien eine infektiös-entzündliche Genese der neurologischen Symptome, insbesondere bei den neun Habichten ohne schwerwiegende traumatische Verletzungen, am wahrscheinlichsten.

In den eigenen Untersuchungen war auffallend, dass alle Tiere einen schlechten Ernährungszustand aufwiesen und bei neun Habichten zusätzliche Erkrankungen (wie z.B. klinisch apparente Infektionen mit *Trichomonas* spp. und/oder *Eucolus* spp., mykotische Pneumonien oder Aerosacculitiden, Wunden) vorlagen. Derartige zusätzliche Befunde wurden in den meisten Veröffentlichungen zu WNV-positiven Habichten nicht erwähnt, sind jedoch bei anderen freilebenden Greifvögeln mit WNV-Infektionen beschrieben (Wünschmann et al. 2005; Joyner et al. 2006; Lopes et al. 2007; Saito et al. 2007; Höfle et al. 2008; Smith et al. 2018). Acht von zehn Tiere der eigenen Untersuchungen waren juvenile Vögel aus dem Jahr 2019 und Abmagerung bzw. Verhungern durch Unerfahrenheit bei der Jagd, Traumata sowie klinische Infektionen mit *Trichomonas* spp. sind als Haupttodesursachen für Habichte im ersten Lebensjahr beschrieben (Morishita et al. 1998; Kenward et al. 1999; Wiens et al. 2006; Merling De Chapa et al. 2020). Eine schlechte Körperkonstitution und Immunsuppression der Vögel bedingt durch eine WNV-Infektion könnte sekundäre Infektionen begünstigt und damit auch zu dem sehr akuten und progressiven Verlauf (die mediane Überlebenszeit lag bei zwei Tagen) bei den zehn Habichten beigetragen haben. Wie bei Wünschmann et al. (2005), die im Rahmen eines Monitoring-Programmes in den USA insgesamt zwölf Tierkörper von WNV-infizierten Habichten untersucht haben, standen auch bei den pathohistologischen Untersuchungsergebnissen der Studie 2 eine Meningoenzephalitis und Myokarditis im Vordergrund. Zudem war auch eine Myositis häufig (7/10), wohingegen Skelettmuskulatur histologisch und immunhistochemisch bei Wünschmann et al. (2005) nur bei vier von zwölf Habichten untersucht wurde. Eine Pankreatitis, die Wünschmann et al. (2005) bei sechs von

zwölf Habichten diagnostizierte, konnte dagegen bei keinem der Tiere festgestellt werden. Während bei Wünschmann et al. (2005) WNV-Antigen am häufigsten im Gehirn (85 %), in der Milz (75 %), im Herzmuskel (58 %) und im Auge (50 %) nachgewiesen wurde, gelang dies bei den Habichten der Studie 2 vor allem in Gehirn- (90 %), Skelettmuskel- (90 %), Nieren- (80 %) und Herzmuskelgewebe (50 %). Die Unterschiede in der Verteilung der histopathologischen und immunhistochemischen Befunde sind unklar, es könnten allerdings Unterschiede in der Wirtspopulation oder der Viruslinie eine Rolle spielen (Gamino und Höfle 2013). So handelte es sich in der Studie von Wünschmann et al. (2005) überwiegend um falknerisch gehaltene Habichte in guter Körperkonstitution. Zudem waren die Habichte von Wünschmann et al. (2005) mit einer anderen Viruslinie (WNV Linie 1) als die Habichte der eigenen Untersuchungen (WNV Linie 2) infiziert (Ziegler et al. 2020). Allerdings konnte bei experimentell infizierten Großfalken kein Unterschied der pathohistologischen Läsionen zwischen den beiden Viruslinien festgestellt werden (Ziegler et al. 2013).

Aufgrund des schnellen Todes der betroffenen Tiere wurde die ätiologische Diagnose in dieser Studie postmortal gestellt. Da ein WNV-Nachweis bei sechs von acht Tieren aus dem Blutkuchen gelang und bei allen serologischen untersuchten Tieren teilweise bereits hohe WNV-spezifische AK-Titer mittels ELISA nachgewiesen werden konnten, sind unsere Ergebnisse auch für eine Diagnose einer WNV-Infektion bei lebenden Habichten interessant. Im Jahr 2020 waren im Rahmen des nationalen Monitoring-Programmes unter den seropositiven Vögeln im östlichen Deutschland vor allem Habichte, von denen der größte Anteil verstarb (Ziegler et al. 2022). Es gibt allerdings auch Berichte von überlebenden, in Gefangenschaft gehaltenen Habichten (Erdelyi et al. 2007; Ziegler et al. 2020; Straub et al. 2021). Im Patientengut der Klein- und Heimtierklinik waren zudem zwei weitere Habichte aus dem Jahr 2019, die hohe WNV-AK-Titer, jedoch keine mit WNV-assoziierten Symptome aufwiesen. Auch bei einem Habicht dieser Studie wurden nur milde histopathologische Befunde in Kombination mit einem hohen AK-Titer nachgewiesen. Diese Befunde sprechen bei diesen drei Habichten dafür, dass die Tiere die Infektion fast oder vollständig überstanden hatten. Daher erscheint für eine Diagnose einer WNV-Infektion bei lebenden Habichten die Kombination aus einer Untersuchung auf WNV-spezifische AK und Nukleinsäuren aus Serum und Blutkuchen sinnvoll.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Beide Studien hatten das übergeordnete Ziel die klinische Untersuchung und Diagnosestellung von Erkrankungen mit neurologischen Symptomen bei Vögeln zu verbessern. Es wurde erstmals die Anwendbarkeit des neurologischen Untersuchungsganges bei gesunden Individuen aus insgesamt fünf verschiedenen Vogelarten untersucht. Dabei wurden geeignete neurologische Tests identifiziert, die sich jedoch zwischen den einzelnen Vogelarten unterschieden. Dies sollte bei der Anwendung des Untersuchungsganges bei anderen Vogelspezies bedacht werden und verdeutlicht auch die Notwendigkeit von zukünftigen Untersuchungen zur Anwendbarkeit der neurologischen Untersuchung bei weiteren Vogelspezies. Weitere Untersuchungen sind zudem nötig, um den neurologischen Untersuchungsgang als Diagnostikum für bestimmte neurologische Erkrankungen bei Vögeln zu validieren. Aufgrund der multifokalen Verteilung der Läsionen innerhalb des Nervensystems und Involvierung multipler Organsysteme erscheint eine WNV-Infektion bei Vögeln nicht als geeignete „Modellerkrankung“ für eine derartige Validierung. Jedoch konnte demonstriert werden, dass eine neuroanatomische Lokalisation des Krankheitsprozesses bei allen untersuchten Tieren möglich war. In Kombination mit allen anderen klinischen Befunden lieferte diese Lokalisation die Basis für eine Diagnose einer WNV-Infektion bei zehn freilebenden Habichten – einer Viruserkrankung, die erstmals im Vorjahr in Deutschland aufgetreten und bis dahin bei Habichten nicht ausführlicher klinisch charakterisiert war. Da Habichte eine Indikatorspezies für das WNV-Vorkommen in einer Region sind, ist die Kenntnis der klinischen Befunde bei dieser Vogelart für eine möglichst frühe Diagnose wichtig und auch als Monitoring-Maßnahme anzusehen (Alba et al. 2017). Es ist nicht vorherzusehen, wie sich das WNV-Infektionsgeschehen in den nächsten Jahren in Deutschland verhält, jedoch ist mit Erkrankungen bei Menschen und anderen Tierarten zu rechnen (Friedrich-Loeffler-Institut 2023, November 29). Bei Habichten mit entsprechenden neurologischen Symptomen sollte, insbesondere im Sommer, eine WNV-Infektion als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden.

5. Zusammenfassung

Untersuchungen zur Anwendbarkeit der neurologischen Untersuchung bei ausgewählten Vogelspezies und Charakterisierung einer Erkrankung mit neurologischen Symptomen durch das West-Nil-Virus bei Habichten (*Accipiter gentilis*)

Sina Feyer

Die Diagnose neurologischer Erkrankungen bei Vögeln ist oft herausfordernd. Die neurologische Untersuchung stellt einen wesentlichen diagnostischen Schritt dar, der zur Lokalisation der symptomauslösenden Läsion innerhalb des Nervensystems führt und damit die Basis für die Einschätzung möglicher Differenzialdiagnosen bildet. Allerdings sind Daten bezüglich der Anwendbarkeit neurologischer Tests bei Vogelarten nur sehr begrenzt in der Fachliteratur verfügbar. Darüber hinaus sind klinische Beschreibungen von Krankheitsbildern bei Wildvögeln oft nur spärlich vorhanden. Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die neurologische Untersuchung sowie die Diagnosestellung von Erkrankungen mit neurologischen Symptomen bei Vögeln zu verbessern.

In der ersten Studie wurden physiologische Reflexantworten und Reaktionen im Rahmen der neurologischen Untersuchung klinisch gesunder Individuen verschiedener Vogelarten ermittelt. Bei 42 Tauben (*Columba livia domestica*), 42 Höckerschwänen (*Cygnus olor*) und 42 Greifvögeln, darunter zwölf Mäusebussarde (*Buteo buteo*), 24 Turmfalken (*Falco tinnunculus*) und sechs Habichte (*Accipiter gentilis*), wurde eine neurologische Untersuchung durchgeführt. Eine Reihe von neurologischen Tests konnte artenunterschiedlich als geeignet für die untersuchten Spezies identifiziert werden. Bei Tauben und Höckerschwänen wurden bei fast allen Haltungs- und Stellreaktionen reproduzierbar zuverlässige Reaktionen beobachtet. Im Gegensatz dazu waren die Haltungs- und Stellreaktionen der Hintergliedmaßen bei Greifvögeln aufgrund von Abwehrverhalten oft nicht durchführbar. Die Überprüfung der Kopfnerven und der meisten spinalen Reflexe ergaben artspezifisch variable Ergebnisse. Insbesondere der Gastrocnemiusreflex war bei keinem Individuum der Studie auslösbar. Die Ergebnisse deuten darauf, dass es vogelartspezifisch sowohl Unterschiede in der Durchführbarkeit der neurologischen Untersuchung als auch in der Auslösbarkeit und Ausprägung der Antworten im Rahmen der verschiedenen Tests gibt.

In einer weiteren Studie wurden die klinischen, pathologischen und virologischen Aspekte von Infektionen mit dem West-Nil-Virus (WNV) bei zehn freilebenden Habichten aus Deutschland beschrieben. Das WNV ist ein zoonotisches Arbovirus, das erstmals 2018 in Deutschland nachgewiesen wurde und zu einer neuroinvasiven Erkrankung mit erhöhter Mortalität bei Vögeln, Menschen und anderen Säugetieren führen kann.

Habichte sind besonders empfänglich für eine klinische Erkrankung und gelten als Indikatorart für das Auftreten des WNV in Europa. Aus diesem Grund sind Daten über das klinische Erscheinungsbild von großer Bedeutung für die frühzeitige Identifizierung von Verdachtsfällen. Zwischen Juli und September 2019 wurden insgesamt zehn freilebende Habichte (8/10 waren juvenil und 9/10 weiblich) in die Klein- und Heimtierklinik der Freien Universität Berlin verbracht und umfassend untersucht. Die klinischen Befunde, die im Laufe des stationären Aufenthaltes erhoben wurden, waren Apathie und Inappetenz (10/10), ein schlechter Ernährungszustand (10/10), eingeschränkter Visus ohne okuläre Befunde (4/7), Uveitis (3/7), Hyphäma (1/7) und eine Hornhauterosion (1/7). Alle Tiere entwickelten im Verlauf neurologische Symptome, darunter Stupor (3/10), Krampfanfälle (3/10), Kopftremor (2/10), Kopfschiefhaltung (2/10), Monoplegie eines Beines (2/10) und Ataxie (2/10) und eine neurologische Untersuchung ergab eine multifokale neuroanatomische Lokalisation (8/9) oder eine fokale Lokalisation auf das Großhirn (1/9). Zusätzlich wurden Aerosacculitiden oder Pneumonien (7/10), traumatische Verletzungen (3/10) wie z.B. Frakturen der Carina sterni, klinisch apparente Infektionen mit *Eucoleus* spp. und *Trichomonas* spp. (3/10) sowie Myiasis (2/10) festgestellt. Trotz symptomatischer Behandlung verschlechterte sich der Zustand der Vögel, was zum Tod oder zur Euthanasie bei einer medianen Überlebenszeit von zwei Tagen führte. Die häufigsten histopathologischen Befunde waren eine Meningoenzephalitis (9/10), Myokarditis (8/10), Iridozyklitis (8/8) und Myositis (7/10). Die WNV-Infektion wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription (RT-qPCR) in Organproben (10/10) und Blut (6/8) diagnostiziert und durch serologische und immunhistochemische Untersuchungen bestätigt.

Die Ergebnisse dieser kumulativen Dissertation beschreiben artspezifische, physiologische Reflexantworten und Reaktionen im Rahmen der neurologischen Untersuchung bei verschiedenen Vogelarten. Diese sollten bei der Interpretation neurologischer Tests bei den entsprechenden Spezies beachtet werden, um die Untersuchung möglichst aussagekräftig und stressarm für den Patienten zu gestalten. Dieser Untersuchungsgang konnte in einem weiteren Teil der kumulativen Dissertation bei Habichten mit neurologischen Symptomen ebenfalls angewendet und eine, in Deutschland relativ neue, Infektionserkrankung durch das WNV bei zehn freilebenden Habichten umfassend klinisch, pathologisch und virologisch charakterisiert werden. Diese Erkrankung sollte bei Habichten mit entsprechenden neurologischen Symptomen, insbesondere im Sommer, als wichtige Differenzialdiagnose Berücksichtigung finden. Insgesamt tragen diese Untersuchungen zur besseren Diagnosestellung neurologischer Erkrankungen bei Vögeln bei.

6. Summary

Investigations on the applicability of the neurological examination in selected bird species and characterization of a disease with neurological symptoms caused by West Nile virus in goshawks (*Accipiter gentilis*)

Sina Feyer

The diagnosis of neurological diseases in birds is often challenging. A neurological examination is essential for determining the localization of neurological lesions and for the assessment of possible differential diagnoses. However, quantitative data on the feasibility of neurological tests are very limited for avian species. Additionally, an understanding of the clinical presentation and underlying pathology is crucial for accurate diagnosis of a neurological disease, but clinical descriptions of disease presentation in free-ranging birds are often scarce. The aim of these investigations was to improve the neurological examination and diagnosis of diseases with neurological signs in birds.

One study aimed to establish normative data for the neurological examination obtained from clinically healthy individuals of various bird species. A total of 42 domestic and feral pigeons (*Columba livia domestica*), 42 mute swans (*Cygnus olor*), and 42 raptors including twelve common buzzards (*Buteo buteo*), 24 common kestrels (*Falco tinnunculus*), and six northern goshawks (*Accipiter gentilis*) underwent a prior defined neurological examination. A number of suitable neurological tests were identified for the examined species. In pigeons and mute swans, consistent responses were observed in nearly all postural reaction tests. In contrast, postural reaction tests of the legs in raptors were often not feasible due to defensive behavior. Cranial nerve tests and most spinal reflexes revealed variable results depending on the species. Notably, the gastrocnemius reflex was not provokable in any of the individuals in the study. The results indicate species-specific differences in the feasibility of the neurological examination and consistency of responses.

In a further study, the clinical, pathological, and virological aspects of West Nile virus (WNV) infections in ten free-ranging northern goshawks from Germany were described in detail. WNV is a zoonotic arbovirus that was first detected in Germany in 2018 and can lead to a neuroinvasive disease with increased mortality in birds, humans and other mammals. Goshawks are particularly susceptible to clinical disease and are therefore considered an indicator species for the occurrence of WNV in Europe. Data on clinical presentation is therefore of great importance for the early identification of suspected cases. Between July and September 2019, ten free-ranging goshawks (8/10 were juvenile and 9/10 were female) were brought to the Small Animal Clinic of the Freie Universität Berlin. The clinical findings recorded during hospitalization included obtundation and inappetence (10/10), poor body condition

(10/10), impaired vision without ocular abnormalities (4/7), uveitis (3/7), hyphema (1/7) and corneal erosion (1/7). All animals developed neurological signs including stupor (3/10), seizures (3/10), head tremor (2/10), head tilt (2/10), monoplegia of a leg (2/10) and ataxia (2/10). Neurological examination revealed a multifocal localization (8/9) or a focal localization to the forebrain (1/9). Furthermore, the following conditions were identified: Aerosacculitis or pneumonia (7/10), traumatic injuries (3/10) such as fractures of the carina sterni, clinically apparent infections with *Eucoleus* spp. and *Trichomonas* spp. (3/10) and myiasis (2/10). Despite symptomatic treatment, the condition of the birds deteriorated, leading to death or euthanasia with a median survival time of two days. The most frequent histopathological findings were meningoencephalitis (9/10), myocarditis (8/10), iridocyclitis (8/8) and myositis (7/10). WNV infection was diagnosed by real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) in organ samples (10/10) and blood (6/8), with further confirmation by serological and immunohistochemical examinations.

In conclusion, the results of this research provide normative data for the neurological examination in different bird species, thereby improving the interpretation of the neurological examination in the respective bird species. Furthermore, this examination protocol was also applied to goshawks with neurological signs due to WNV infection, a recently emerged infectious disease in Germany. This study provides a detailed description of the clinical, pathological, and virological characteristics of the WNV infections in ten free-ranging goshawks in Germany. This disease should be considered as an important differential diagnosis in goshawks presenting with corresponding neurological signs, particularly during the summer months. In conclusion, these studies contribute to the improvement of diagnostic accuracy for birds with neurological conditions.

7. Literaturverzeichnis

Abdelwhab E, Beer M (2024):

Panzootic HPAIV H5 and risks to novel mammalian hosts.

npj Viruses 2: 22.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s44298-024-00039-z>.

Abdelwhab E M, Mettenleiter T C (2023):

Zoonotic animal influenza virus and potential mixing vessel hosts.

Viruses 15: 980.

DOI: <https://doi.org/10.3390/v15040980>.

Alba A, Perez Andrés M, Ponder J, Puig P, Wünschmann A, Vander Waal K, Alvarez J, Willette M (2017):

Syndromic surveillance for West Nile virus using raptors in rehabilitation.

BMC Vet. Res. 13: 1-10.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1292-0>.

Allison A B, Mead D G, Gibbs S E J, Hoffman D M, Stallknecht D E (2004):

West Nile virus viremia in wild rock pigeons.

Emerg. Infect. Dis. 10: 2252.

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1012.040511>.

Ansari Mood M, Rajaei S M, Ghazanfari Hashemi S, Williams D L, Sadjadi R (2017):

Measurement of tear production and intraocular pressure in ducks and geese.

Vet. Ophthalmol. 20: 53-57.

DOI: <https://doi.org/10.1111/vop.1235>.

Bakonyi T, Ferenczi E, Erdelyi K, Kutasi O, Csorgo T, Seidel B, Weissenbock H, Brugger K, Ban E, Nowotny N (2013):

Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009.

Vet Microbiol 165: 61-70.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>.

Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenbock H, Nowotny N (2006):

Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe.

Emerg. Infect. Dis. 12: 618-623.

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1204.051379>.

Bamac O E, Rogers K H, Arranz-Solís D, Saeij J P, Lewis S, Duerr R, Skoglund J, Peronne L, Mete A (2020):

Protozoal encephalitis associated with *Sarcocystis calchasi* and *S. falcatula* during an epizootic involving Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in coastal Southern California, USA.

Int J Parasitol Parasites Wildl 12: 185-191.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.06.005>.

Benskin C M H, Wilson K, Jones K, Hartley I R (2009):

Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection.

Biol. Rev. 84: 349-373.

DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x>.

Berg C C, Doss G A, Guevar J (2021):
Neurologic examination of healthy adult African pygmy hedgehogs (*Atelerix albiventris*).
J. Am. Vet. Med. Assoc. 258: 971-976.
DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.258.9.971>.

BMEL (2011):
Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen.
Bundesgesetzblatt Jahrgang 2011 Teil I Nr. 37, S. 1404

Bongartz U, Nessler J, Maiolini A, Stein V M, Tipold A, Bathen-Nöthen A (2020):
Vestibular disease in dogs: Association between neurological examination, MRI lesion
localisation and outcome.
J. Small Anim. Pract. 61: 57-63.
DOI: <https://doi.org/10.1111/jsap.13070>.

Boudreau C E, Dominguez C E, Levine J M, Mankin J, Anderson K M, Voges A K, Fosgate G
T (2018):
Reliability of interpretation of neurologic examination findings for the localization of vestibular
dysfunction in dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 252: 830-838.
DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.252.7.830>.

Busquets N, Laranjo-González M, Soler M, Nicolás O, Rivas R, Talavera S, Villalba R, San
Miguel E, Torner N, Aranda C (2019):
Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia).
Transbound. Emerg. Dis. 66: 617-621.
DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>.

Camp J V, Nowotny N (2020):
The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018
outbreak?
Expert Rev. Anti Infect. Ther. 18: 145-154.
DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1713751>.

Centers for Disease Control and Prevention (1999-2016):
Species of dead birds in which West Nile virus has been detected, United States, 1999-2016.
https://www.cdc.gov/mosquitoes/media/pdfs/2024/04/birdspecies1999-2016.pdf?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/BirdSpecies1999-2016.pdf
Abgerufen am: 09.06.2024, 20:58 Uhr.

Chandler K, Volk H (2008):
Seizures: intracranial or extracranial disease?
In Pract. 30: 366-373.
DOI: <https://doi.org/10.1136/inpract.30.7.366>.

Chrisman C L, Walsh M, Meeks J C, Zurawka H, LaRock R, Herbst L, Schumacher J (1997):
Neurologic examination of sea turtles.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 211: 1043-1047.

Clippinger T L, Bennett R A, Platt S R (1996):
The avian neurologic examination and ancillary neurodiagnostic techniques.
J. Avian Med. Surg. 10: 221-247.

Clippinger T L, Bennett R A, Platt S R (2007):
The avian neurologic examination and ancillary neurodiagnostic techniques: a review update.
Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. 10: 803-836.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2007.04.006>.

Cococchetta C, Coutant T, Collarile T, Vetere A, Di Ianni F, Huynh M (2022):
Causes of raptor admission to the wildlife rehabilitation centre in Abruzzo (central Italy) from
2005–2016.
Animals 12: 1916.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12151916>.

Coulmance M, Gahery Y, Massion J, Swett J (1979):
The placing reaction in the standing cat: a model for the study of posture and movement.
Exp. Brain Res. 37: 265-281.

Csank T, Bhide K, Bencurova E, Dolinska S, Drzewniokova P, Major P, Korytar L, Bockova
E, Bhide M, Pistl J (2016):
Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a
universal primer set.
Arch Virol 161: 1679-1683.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2828-5>.

Czarkowska-Bauch J (1990):
Movement and muscle activity during contact placing of the forelimb and their relations to
other postural reactions in the cat.
Exp. Brain Res. 79: 373-382.

David S, Abraham A M (2016):
Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen.
Infect. Dis. 48: 571-586.
DOI: <https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1164890>.

de Lahunta A, Glass E, Kent M (2021):
The Neurologic Examination.
In: de Lahunta's Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology (Fifth Edition)/Hrsg.: A. de
Lahunta, E. Glass and M. Kent: 531-546.
Philadelphia, W.B. Saunders. 978-0-323-69611-1

Dewey C W, da Costa R C (2015):
Practical Guide to Canine and Feline Neurology. John Wiley & Sons. 1119946115

Dietzel J, Grochow T, Böttcher I C (2024):
Evaluation of neurologic testing in guinea pigs (*Cavia porcellus*).
J. Exot. Pet Med. 48: 31-36.
DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2023.12.002>.

Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Szeredi L, Ratz F, Skare J, Bakonyi T (2007):
Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in
Hungary.
Vector Borne Zoonotic Dis. 7: 181-188.
DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0586>.

Feyer S, Loderstedt S, Halter-Gölkel L, Merle R, Zein S, Müller K (2024):
Neurological examination of clinically healthy pigeons (*Columba livia domestica*), mute
swans (*Cygnus olor*), common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*)
and northern goshawks (*Accipiter gentilis*).

Vet Rec. 194: e3828.

DOI: <https://doi.org/10.1002/vetr.3828>.

Feyer S, Bartenschlager F, Bertram CA, Ziegler U, Fast C, Klopffleisch R, Müller K (2021): Clinical, pathological and virological aspects of fatal West Nile virus infections in ten free-ranging goshawks (*Accipiter gentilis*) in Germany.

Transbound Emerg Dis. 68: 907-919.

DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13759>.

Fischer D, Oberländer B, Peters M, Eley N, Pantchev N, Bangoura B, Lierz M (2020): Central nervous signs, blindness and cerebral vermicosis in free-ranging peregrine falcons (*Falco peregrinus*) associated with aberrant larval migrations.

Vet, Parasitol. (Amst.) 20: 100410.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100410>.

Forterre F, Konar M, Tomek A, Doherr M, Howard J, Spreng D, Vandeveld M, Jaggy A (2008):

Accuracy of the withdrawal reflex for localization of the site of cervical disk herniation in dogs: 35 cases (2004–2007).

J. Am. Vet. Med. Assoc. 232: 559-563.

DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.232.4.559>

Foss K D, Hague D W, Selmic L (2021):

Assessment of the cutaneous trunci reflex in neurologically healthy cats.

J. Feline Med. Surg. 23: 287-292.

DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X20944643>.

Frewein J, Sinowatz F (2004):

Sinnesorgane.

In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere/Hrsg.: R. Nickel, A. Schummer and E. Seiferle. 5: 365-386.

Stuttgart, Parey. 3830441533

Friedrich-Loeffler-Institut (2022):

Infektion mit dem West-Nil-Virus bei einem Vogel oder Pferd: Amtliche Methode und Falldefinition.

In: Amtliche Methodensammlung und Falldefinitionen : Anzeigepflichtige Tierseuchen/Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut.

Greifswald - Insel Riems. https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00054077

Friedrich-Loeffler-Institut (2023, November 29):

Überblick: West-Nil-Virus im Jahr 2023.

<https://www.fli.de/de/aktuelles/kurznachrichten/neues-einzelansicht/ueberblick-west-nil-virus-im-jahr-2023/>

Abgerufen am: 10.6.2024, 10:53 Uhr.

Gamino V, Höfle U (2013):

Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review.

Vet Res 44: 39.

DOI: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-39>.

Gandini G, Jaggy A, Kathmann I, Bilzer T, Lombard C (2007):

Großhirn.

In: Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie/Hrsg.: A. Jaggy. 2. Auflage: S. 428-464.

Hannover, Schlütersche. ISBN 978-3-89993-035-1

- Garosi L (2009):
Neurological examination of the cat. How to get started.
J. Feline Med. Surg. 11: 340-348.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.03.002>.
- Garosi L (2013):
Lesion localization and differential diagnosis.
In: BSAVA manual of canine and feline neurology/Hrsg.: S. Platt and N. Olby: 25-35.
Gloucester, British Small Animal Veterinary Association. 1910443123
- Garosi L, Lowrie M (2013):
The neurological examination.
In: BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology/Hrsg.: S. Platt and N. Olby: 1-24.
Gloucester, British Small Animal Veterinary Association. 1910443123
- Giebels F, Kohn B, Shihab N, Volk H A, Loderstedt S (2014):
Evaluation of the biceps tendon reflex in dogs.
J Vet Med Res 1: 1013.
DOI: <https://doi.org/10.47739/2378-931X/1013>
- Giebels F, Pieper L, Kohn B, Volk H A, Shihab N, Loderstedt S (2019):
Comparison of interobserver agreement between the evaluation of bicipital and the patellar tendon reflex in healthy dogs.
PLoS One 14: e0219171.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219171>.
- Glutz von Blotzheim U N, Bauer K M (2001a):
Handbuch der Vögel Mitteleuropas, Band 2: Anseriformes (1. Teil) – Entenvögel. Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft.978-3-89104-501-5
- Glutz von Blotzheim U N, Bauer K M (2001b):
Handbuch der Vögel Mitteleuropas, Band 9: Columbiformes – Piciformes.
Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft.978-3400004526
- Glutz von Blotzheim U N, Bauer K M, Bezzel E (2001):
Handbuch der Vögel Mitteleuropas, Band 4: Falconiformes – Greifvögel.
Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft.3400000698
- Grüneberg C, Bauer H-G, Haupt H, Hüppop O, Ryslavy T, Südbeck P (2015):
Rote Liste der Brutvögel Deutschlands, 5. Fassung.
Ber Vogelschutz 52: 19-67.
- Gutiérrez-Arnal J, Marín C (2024):
The latent threat in wild birds: *Clostridium botulinum*.
J. Vet. Sci. 11: 36.
DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci11010036>.
- Halter-Gölkel L (2022):
Bleiintoxikationen bei freilebenden Seeadlern (*Haliaeetus albicilla*).
Dissertation, Freie Universität Berlin.
DOI: <http://dx.doi.org/10.17169/refubium-36344>.
- Hamdy M, Katayama M, Saleh A, Youssef H, Okamura Y, Uzuka Y (2016): Determination of the accuracy of neurological data, survey radiography, computed tomography (CT), myelography and CT myelography for detection of the seat of intervertebral disc herniation in dogs.
J. Adv. Vet. Res. 6: 44-52.

- Harris M, Schorling J, Herring I, Elvinger F, Bright P, Pickett J (2008):
Ophthalmic examination findings in a colony of screech owls (*Megascops asio*).
Vet. Ophthalmol. 11: 186-192.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00618.x>.
- Hedley J, MacHale J, Rendle M, Crawford A (2021):
Neurological examinations in healthy juvenile bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*).
J. Herpetol. Med. Surg. 31: 141-146.
DOI: <https://doi.org/10.5818/JHMS-D-20-00006>.
- Heidecke J, Lavarello Schettini A, Rocklöv J (2023):
West Nile virus eco-epidemiology and climate change.
PLOS Climate 2: e0000129.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pclm.0000129>.
- Höfle U, Blanco J M, Crespo E, Naranjo V, Jiménez-Clavero M A, Sanchez A, de La Fuente J, Gortazar C (2008):
West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle.
Vet Microbiol 129: 171-178.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.006>.
- Hubálek Z, Halouzka J (1999):
West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe.
Emerg. Infect. Dis. 5: 643.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>.
- Hubalek Z, Kosina M, Rudolf I, Mendel J, Strakova P, Tomesek M (2018):
Mortality of goshawks (*Accipiter gentilis*) due to West Nile virus lineage 2.
Vector-Borne Zoonotic Dis. 18: 624-627.
DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2289>.
- Hubálek Z, Tomešek M, Kosina M, Šikutová S, Straková P, Rudolf I (2019):
West Nile virus outbreak in captive and wild raptors, Czech Republic, 2018.
Zoonoses Public Health.
DOI: <https://doi.org/10.1111/zph.12638>.
- Hunt C (2015):
Neurological examination and diagnostic testing in birds and reptiles.
J. Exotic Pet Med. 24: 34-51.
DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.12.005>.
- Hwang J, Kang S, Seok S, Ahmed S, Yeon S (2020):
Ophthalmic findings in cinereous vultures (*Aegypius monachus*).
Vet. Ophthalmol. 23: 314-324.
DOI: <https://doi.org/10.1111/vop.12728>.
- Johnson N, Fernández de Marco M, Giovannini A, Ippoliti C, Danzetta M, Svartz G, Erster O, Groschup M, Ziegler U, Mirazimi A (2018):
Emerging mosquito-borne threats and the response from European and Eastern Mediterranean Countries.
Int. J. Environ. Res. Public Health 15: 2775.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15122775>.

- Jolly M (2015):
Treatment of traumatic brain injury in Morepork owls: A review of diagnostic and treatment options.
ExoticsCon, San Antonio, Texas, USA.9781510814257
- Jones M, Orosz S (1996):
Overview of avian neurology and neurological diseases.
Semin Avian Exot Pet Med 5: 150-164.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1055-937X\(96\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S1055-937X(96)80004-1).
- Joyner P H, Kelly S, Shreve A A, Snead S E, Sleeman J M, Pettit D A (2006):
West Nile virus in raptors from Virginia during 2003: Clinical, diagnostic, and epidemiologic findings.
J. Wildl. Dis. 42: 335-344.
DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.335>.
- Kenntner N, Krone O, Altenkamp R, Tataruch F (2003):
Environmental contaminants in liver and kidney of free-ranging northern goshawks (*Accipiter gentilis*) from three regions of Germany.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45: 0128-0135.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-002-2100-8>.
- Kenward R, Marcström V, Karlbom M (1999):
Demographic estimates from radio-tagging: models of age-specific survival and breeding in the goshawk.
J. Anim. Ecol. 68: 1020-1033.
DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00347.x>.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M (2003):
Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus.
Emerg. Infect. Dis. 9: 311.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0903.020628>.
- Kramer L D, Ciota A T, Kilpatrick A M (2019):
Introduction, spread, and establishment of West Nile virus in the Americas.
J. Med. Entomol. 56: 1448-1455.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz151>.
- Kuhn S E, Jones M P, Hendrix D V, Ward D A, Baine K H (2013):
Normal ocular parameters and characterization of ophthalmic lesions in a group of captive bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*).
J. Avian Med. Surg. 27: 90-98.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1647/2012-032>.
- Le Souëf A, Holyoake C, Vitali S, Warren K (2015):
Presentation and prognostic indicators for free-living black cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.) admitted to an Australian zoo veterinary hospital over 10 years.
J. Wildl. Dis. 51: 380-388.
DOI: <https://doi.org/10.7589/2014-08-203>.
- Levine J M, Hillman R B, Erb H N, de Lahunta A (2002):
The influence of age on patellar reflex response in the dog.
J. Vet. Intern. Med. 16: 244-246.
DOI: [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2002\)016<0244:tioaop>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2002)016<0244:tioaop>2.3.co;2)

- Loderstedt S (2019):
Neuroanatomische Lokalisation – Nur eine akademische Übung?
kleintier konkret 22: 13-20.
DOI: <https://doi.org/10.1055/a-0671-6367>.
- Lopes H, Redig P, Glaser A, Armien A, Wünschmann A (2007):
Clinical findings, lesions, and viral antigen distribution in great gray owls (*Strix nebulosa*) and barred owls (*Strix varia*) with spontaneous West Nile virus infection.
Avian Dis. 51: 140-145.
DOI: [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2007\)051\[0140:CFLAVA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2007)051[0140:CFLAVA]2.0.CO;2).
- Lorenz M D, Coates J R, Kent M (2011):
Neurologic History, Neuroanatomy, and Neurologic Examination.
In: Handbook of Veterinary Neurology/Hrsg.: J. E. Oliver, M. D. Lorenz and J. N. Kornegay:
2-36.
Philadelphia, WB Saunders Company. 978-1-4377-0651
- Manning L K, Wünschmann A, Armien A G, Willette M, MacAulay K, Bender J B, Buchweitz J P, Redig P (2019):
Lead intoxication in free-ranging bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*).
Vet. Pathol. 56: 289-299.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985818813099>.
- Meekins J M, Stuckey J A, Carpenter J W, Armbrust L, Higbie C, Rankin A J (2015):
Ophthalmic diagnostic tests and ocular findings in a flock of captive American flamingos (*Phoenicopterus ruber ruber*).
J. Avian Med. Surg. 29: 95-105.
DOI: <https://doi.org/10.1647/2014-021>.
- Merling de Chapa M, Courtiol A, Engler M, Giese L, Rutz C, Lakermann M, Müskens G, Van Der Horst Y, Zollinger R, Wirth H (2020):
Phantom of the forest or successful citizen? Analysing how Northern Goshawks (*Accipiter gentilis*) cope with the urban environment.
R. Soc. Open Sci. 7: 201356.
DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.201356>.
- Mete A, Rogers K H, Woods L (2017):
Tyzzer's disease in free-ranging passerine birds in California, USA.
J. Wildl. Dis. 53: 938-941.
DOI: <https://doi.org/10.7589/2017-02-041>.
- Michel F, Sieg M, Fischer D, Keller M, Eiden M, Reuschel M, Schmidt V, Schwehn R, Rinder M, Urbaniak S, Muller K, Schmoock M, Luhken R, Wysocki P, Fast C, Lierz M, Korbel R, Vahlenkamp T W, Groschup M H, Ziegler U (2019):
Evidence for West Nile virus and Usutu virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018.
Viruses 11: 674.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v11070674>.
- Morishita T Y, Fullerton A T, Lowenstine L J, Gardner I A, Brooks D L (1998):
Morbidity and mortality in free-living raptorial birds of northern California: a retrospective study, 1983-1994.
J. Avian Med. Surg. 12: 78-81.
- Morris J G, Parsons J J (2023):
The Various Ways in Which Birds Blink.

Animals 13: 3656.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13233656>.

Muguet-Chanoit A C, Olby N J, Babb K M, Lim J H, Gallagher R, Niman Z, Dillard S, Campbell J (2011):

The sensory field and repeatability of the cutaneous trunci muscle reflex of the dog.

Vet. Surg. 40: 781-785.

DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2011.00888.x>.

Müller K, Altenkamp R, Brunnberg L (2007):

Morbidity of free-ranging white-tailed sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) in Germany.

J. Avian Med. Surg. 21: 265-274.

DOI: <https://doi.org/10.1647/2007-001R.1>.

Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N (2006):

Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species.

J. Wildl. Dis. 42: 1-13.

DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.1>.

O'Connell K M, Michau T M, Stine J M, Reid A T (2017):

Ophthalmic diagnostic testing and examination findings in a colony of captive brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*).

Vet. Ophthalmol. 20: 196-204.

DOI: <https://doi.org/10.1111/vop.12389>.

Olias P, Olias L, Lierz M, Mehlhorn H, Gruber A D (2010):

Sarcocystis calchasi is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*).

Vet. Parasitol. 171: 7-14.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.021>.

Orosz S E (1996):

Principles of avian clinical neuroanatomy.

Semin Avian Exot Pet Med 5: 127-139.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S1055-937X\(96\)80002-8](https://doi.org/10.1016/S1055-937X(96)80002-8).

Orosz S E, Antinoff N (2016):

Clinical avian neurology and neuroanatomy.

In: Current therapy in avian medicine and surgery/Hrsg.: B. Speer. 1: 363-377.

St. Louis, Missouri, Saunders. 978-1-4557-4671-2

Pacenti M, Sinigaglia A, Franchin E, Pagni S, Lavezzo E, Montarsi F, Capelli G, Barzon L (2020):

Human West Nile virus lineage 2 infection: Epidemiological, clinical, and virological findings.

Viruses 12: 458.

DOI: <https://doi.org/10.3390/v12040458>.

Pain D J, Amiardtriquet C (1993):

Lead poisoning of raptors in France and elsewhere.

Ecotoxicol. Environ. Contam. 25: 183-192.

DOI: <https://doi.org/10.1006/eesa.1993.1017>.

Park S, Kang S, Lim J, Park E, Nam T, Jeong S, Seo K (2017):

Ultrasound biomicroscopy and tonometry in ophthalmologically normal pigeon eyes.

Vet. Ophthalmol. 20: 468-471.

DOI: <https://doi.org/10.1111/vop.12450>.

Perez-Ramirez E, Llorente F, Jimenez-Clavero M A (2014):
Experimental infections of wild birds with West Nile virus.
Viruses 6: 752-781.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v6020752>.

Petrovic T, Blazquez A B, Lupulovic D, Lazic G, Escribano-Romero E, Fabijan D, Kapetanov M, Lazic S, Saiz J (2013):
Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: First isolation and characterisation of WNV strains from Serbia.
Eurosurveillance 18.
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.44.20622>.

Platt S (2006):
Evaluating and treating the nervous system.
In: Clinical avian medicine/Hrsg.: G. Harrison and T. Lightfoot. 2: 493-515.
Palm beach, FL, Spix Publishing, Inc. 978-0975499405

Quitt P R, Reese S, Fischer A, Bertram S, Tauber C, Matiasek L (2019):
Assessment of menace response in neurologically and ophthalmologically healthy cats.
J. Feline Med. Surg. 21: 537-543.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X18788890>.

Root J J, Bosco-Lauth A M (2019):
West Nile virus associations in wild mammals: An update.
Viruses 11: 459.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v11050459>.

Rutz C, Bijlsma R G, Marquiss M, Kenward R E (2006):
Population limitation in the Northern Goshawk in Europe: A review with case studies.
Stud. Avian Biol. 31: 158.

Saito E K, Sileo L, Green D E, Meteyer C U, McLaughlin G S, Converse K A, Docherty D E (2007):
Raptor mortality due to West Nile virus in the United States, 2002.
J. Wildl. Dis. 43: 206-213.
DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.2.206>.

Sandercock D A, Auckburally A, Flaherty D, Sandilands V, McKeegan D E (2014):
Avian reflex and electroencephalogram responses in different states of consciousness.
Physiol. Behav. 133: 252-259.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.030>.

Savini G, Puggioni G, A D I G, G D I F, Rocchigiani A M, Polci A, Marini V, Pinoni C, Rolesu S, Marruchella G, Lorusso A, Monaco F (2013):
West Nile virus lineage 2 in Sardinian wild birds in 2012: a further threat to public health.
Epidemiol. Infect. 141: 2313-2316.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268812003147>.

Seguel M, Moroni M, Gomez M, Hernández C, Paredes E (2012):
Bacterial meningoencephalitis in a free Chimango Caracara (*Milvago chimango temucoensis*).
Braz. J. Vet. Pathol. 5: 16-19.

Seidowski D, Ziegler U, Von Rönn J A, Müller K, Hüppop K, Müller T, Freuling C, Mühle R-U, Nowotny N, Ulrich R G (2010):
West Nile virus monitoring of migratory and resident birds in Germany.

Vector Borne Zoonotic Dis. 10: 639-647.
DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0236>.

Simonin Y (2024):
Circulation of West Nile Virus and Usutu Virus in Europe: Overview and Challenges.
Viruses 16: 599.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v16040599>.

Smith K A, Campbell G D, Pearl D L, Jardine C M, Salgado-Bierman F, Nemeth N M (2018):
A retrospective summary of raptor mortality in Ontario, Canada (1991–2014), including the effects of West Nile virus.
J. Wildl. Dis. 54: 261-271.
DOI: <https://doi.org/10.7589/2017-07-157>.

Smithburn K, Hughes T, Burke A, Paul J (1940):
A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda.
Am J Trop Med Hyg 20: 471-472.

Snow R, Mans C, Rylander H (2017):
Neurological examination in healthy chinchillas (*Chinchilla lanigera*).
Lab. Anim. 51: 629-635.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0023677217698000>.

Spedicato M, Carmine I, Bellacicco A L, Marruchella G, Marini V, Piscicella M, Di Francesco G, Lorusso A, Monaco F, Savini G (2016):
Experimental infection of rock pigeons (*Columba livia*) with three West Nile virus lineage 1 strains isolated in Italy between 2009 and 2012.
Epidemiol. Infect. 144: 1301-1311.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268815002642>.

Stauber E, Holmes S, DeGhetto D L, Finch N (2007):
Magnetic resonance imaging is superior to radiography in evaluating spinal cord trauma in three bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*).
J. Avian Med. Surg. 21: 196-200.
DOI: [https://doi.org/10.1647/1082-6742\(2007\)21\[196:MRIIST\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1647/1082-6742(2007)21[196:MRIIST]2.0.CO;2).

Straub J, Pohl A, Enders F, Will H, Ziegler U, Fischer D (2021):
Beschreibung nicht-letaler, klinischer Fälle von Usutu- und West-Nil-Virus-Infektionen bei Greifvögeln und Eulen.
4. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Zier-, Zoo- und Wildvögel, Reptilien, Amphibien und Fische, online

Struthers J D, Schmidt R E (2024):
Nervous System.
In: Pathology of Pet and Aviary Birds. J. D. Struthers, R. E. Schmidt and D. N. Phalen: 373-404.978-1-119-65048-5
DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119650522.ch11>.

Talbott R E (1974):
Modification of the postural response of the normal dog by blindfolding.
J. Physiol. (Lond.) 243: 309-320.

Tarbert D K, Murthy V D, Guzman D S (2022):
Neurological examination in healthy adult inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*).
J. Am. Vet. Med. Assoc.: 1-11.
DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.20.12.0706>.

- Tipold A (1995):
Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study.
J. Vet. Intern. Med. 9: 304-314.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1995.tb01089.x>.
- Tsai C-Y, Yu P-H, Huang W-H, Chang Y-P (2023):
Feasibility and Validity of Postural Reaction Tests in the Neurological Examination in Healthy Rabbits.
J. Vet. Sci. 10: 176.
DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci10030176>
- Vidaña B, Busquets N, Napp S, Pérez-Ramírez E, Jiménez-Clavero M Á, Johnson N (2020):
The role of birds of prey in West Nile virus epidemiology.
Vaccines 8: 550.
DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030550>.
- Warnefors E, Rueløkke M L, Gredal H (2019):
Results of a modified neurological examination in 26 healthy rabbits.
J Exot Pet Med 30: 54-59.
DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2018.01.010>.
- Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N (2010):
Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases.
Vet Microbiol 140: 271-280.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.025>.
- Wiens J D, Noon B R, Reynolds R T (2006):
Post-fledging survival of northern goshawks: the importance of prey abundance, weather, and dispersal.
Ecol. Appl. 16: 406-418.
DOI: <https://doi.org/10.1890/04-1915>.
- Willems A, Paepe D, Marynissen S, Smets P, Van de Maele I, Picavet P, Duchateau L, Daminet S (2017):
Results of screening of apparently healthy senior and geriatric dogs.
J. Vet. Intern. Med. 31: 81-92.
DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.14587>.
- Wills S, Pinard C, Nykamp S, Beaufrère H (2016):
Ophthalmic reference values and lesions in two captive populations of northern owls: Great grey owls (*Strix nebulosa*) and snowy owls (*Bubo scandiacus*).
J. Zoo Wildl. Med. 47: 244-255.
DOI: <https://doi.org/10.1638/2015-0009.1>.
- Wodak E, Richter S, Bago Z, Revilla-Fernandez S, Weissenböck H, Nowotny N, Winter P (2011):
Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009.
Vet Microbiol 149: 358-366.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.012>.

Wünschmann A, Shivers J, Bender J, Carroll L, Fuller S, Saggese M, Van Wettere A, Redig P (2005):

Pathologic and immunohistochemical findings in goshawks (*Accipiter gentilis*) and great horned owls (*Bubo virginianus*) naturally infected with West Nile virus.

Avian Dis. 49: 252-259.

DOI: <https://doi.org/10.1637/7297-103104R>.

Ziegler L, Parmentier S L, Fischer D, Heckmann J, Klopfleisch R, Kershaw O, Ziegler U, Neurath H, Schmidt V, Lierz M (2018):

Investigations into causes of neurologic signs and mortality and the first identification of *Sarcocystis calchasi* in free-ranging woodpeckers in Germany.

J. Zoo Wildl. Med. 49: 247-251.

DOI: <https://doi.org/10.1638/2017-0087R.1>.

Ziegler U, Angenvoort J, Fischer D, Fast C, Eiden M, Rodriguez A V, Revilla-Fernandez S, Nowotny N, de la Fuente J G, Lierz M, Groschup M H (2013):

Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons.

Vet Microbiol 161: 263-273.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.041>.

Ziegler U, Bergmann F, Fischer D, Müller K, Holicki C M, Sadeghi B, Sieg M, Keller M, Schwehn R, Reuschel M (2022):

Spread of West Nile virus and Usutu virus in the German bird population, 2019–2020.

Microorganisms 10: 807.

DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040807>

Ziegler U, Luhken R, Keller M, Cadar D, van der Grinten E, Michel F, Albrecht K, Eiden M, Rinder M, Lachmann L, Hoper D, Vina-Rodriguez A, Gaede W, Pohl A, Schmidt-Chanasit J, Groschup M H (2019a):

West Nile virus epizootic in Germany, 2018.

Antiviral Res. 162: 39-43.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.005>.

Ziegler U, Santos P, Groschup M H, Hattendorf C, Eiden M, Höper D, Eisermann P, Keller M, Michel F, Klopfleisch R, Müller K, Werner D, Kampen H, Frank C, Tews B A, Wylezich C, Rinder M, Lachmann L, Grünwald T, Szentiks C, Sieg M, Schmidt-Chanasit J, Cadar D, Lühken R (2020):

West Nile virus epidemic in Germany triggered by epizootic emergence, 2019.

Viruses 2020 12: 448.

DOI: <https://doi.org/10.3390/v12040448>.

Ziegler U, Schmidt-Chanasit J, Groschup M H (2019b):

A massive West Nile virus epizootic in Germany, 2018/2019.

Zoonoses 2019 - International Symposium on Zoonoses Research, Berlin

8. Publikationsverzeichnis

8.1 Eigene Untersuchungen

- Feyer S, Loderstedt S, Halter-Gölkel L, Merle R, Zein S, Müller K (2024): Neurological examination of clinically healthy pigeons (*Columba livia domestica*), mute swans (*Cygnus olor*), common buzzards (*Buteo buteo*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and northern goshawks (*Accipiter gentilis*).
Veterinary Record 194 (4): e3828.
DOI: <https://doi.org/10.1002/vetr.3828>
- Feyer S, Bartenschlager F, Bertram C A, Ziegler U, Fast C, Klopfleisch R and Müller K (2021): Clinical, pathological and virological aspects of fatal West Nile virus infections in ten free-ranging goshawks (*Accipiter gentilis*) in Germany.
Transboundary and Emerging Diseases 68 (2): 907-919.
DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13759>

8.2 Kongressbeiträge über die eigenen Untersuchungen

- Feyer S, L. Halter L, Zein S, Loderstedt S and Müller K (2019):
The neurological examination in different bird species.
12. Doktorandensymposium Fachbereich Veterinärmedizin FU Berlin. Berlin, 27.09.2019
 - Abstraktveröffentlichung im Tagungsband, S. 30, ISBN: 978-3-96729-006-6
- Feyer S, Bertram CA, Halter L, Zein S, Bartenschlager F, Loderstedt, S, Klopfleisch R, Müller K (2019):
Untersuchungen zum neurologischen Untersuchungsgang bei Vögeln - erste Ergebnisse.
27. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik“ der DVG (InnLab), München, 02./03.02.2019
 - Abstraktveröffentlichung in der Zeitschrift Tierärztl Prax K H 2019; 47: 1–8.
DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678439>
- Feyer S, Bartenschlager F, Bertram C, Ziegler U, Fast C, Klopfleisch R, Müller K (2021):
West-Nil-Virus-Infektion bei 10 freilebenden Habicht (*Accipiter gentilis*).
4. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Zier-, Zoo- und Wildvögel, Reptilien, Amphibien und Fische. 04.-06.03.2021, München (online)
 - Abstraktveröffentlichung im Tagungsband, S. 7-8.

- Feyer S, Halter-Gölkel L, Zein S, Merle R, Loderstedt S, Müller K (2022):
The neurological examination in different avian species.
5th International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine,
Budapest, 27.-30.3.2022, online
 - Abstraktveröffentlichung im Tagungsband, S.162

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Kerstin Müller für die Realisierung, wissenschaftliche Anleitung und intensive Betreuung bei der Erstellung dieser Dissertation sowie für meine klinische Ausbildung.

Des Weiteren danke ich Lesley Halter-Gölkel und Stephanie Zein für die tatkräftige Unterstützung bei den neurologischen Untersuchungen und Betreuung der Habichtpatienten, die gemeinsame Zeit als Kolleginnen in der Klinik und für die gute Freundschaft.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Shenja Loderstedt und PD Dr. Roswitha Merle für den wertvollen fachlichen Austausch im Rahmen der Studien.

Von Herzen danken möchte ich an dieser Stelle auch Florian Bartenschlager sowie Katharina Thieme, Michelle Imlau, Juliane Niemann, Jessica Gadinger und Anna-Lena Klatt für die immerwährende mentale Unterstützung und Ermutigung – während der Erstellung dieser Arbeit und in jeder Lebenslage – und für die Gewissheit, immer eine offene Tür vorzufinden.

Diese Arbeit widme ich meiner Familie – insbesondere meiner Schwester Maxi und meinen Eltern Christel und Michael. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und jeden Weg mit mir geht!

Finanzierungsquellen

Die „Open Access“-Veröffentlichung der Publikationen dieser Arbeit erfolgte im Rahmen des Projektes „DEAL“ der Freien Universität Berlin mit dem Wiley-Verlag.

Interessenskonflikte

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 06.09.2024

Sina Feyer