

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Pathologie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Herbert Weissenböck, Dipl.ECPHM)

Retrospektivuntersuchung zum Vorkommen von Rustrelavirus bei nicht-eitrigen
Meningoenzephalitiden bei Katzen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Viktoria Weiß

Wien, im August 2023

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr.med.vet. Herbert Weissenböck, Dipl.ECPHM

Für
Mama, Papa und Florian

Ich kann euch nicht genug danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract.....	1
1.1. Abstract in deutscher Sprache	1
1.2. Abstract in englischer Sprache.....	1
2. Einleitung	3
2.1. Staggering disease	3
2.2. Rustrelavirus	4
2.3. Fragestellung.....	5
2.4. Durchführung der Studie und Verfassen der Publikation	6
3. Publikation	8
4. Diskussion	18
5. Literaturverzeichnis	21

1. Abstract

1.1. Abstract in deutscher Sprache

Klinische Fälle von "Staggering disease", einer nicht-eitrigen Enzephalomyelitis, die bei Katzen mit Gangstörungen einhergeht, werden in Schweden seit Jahrzehnten dokumentiert. In Österreich konnte in den 1990er Jahren eine erhöhte Inzidenz beobachtet werden. Erst kürzlich ist es gelungen, das Rustrelavirus (RusV) als Erreger dieser klinisch-pathologischen Krankheitsentität zu identifizieren. In vorliegender retrospektiven Studie haben wir insgesamt 23 Gehirn- und Rückenmarkspalten von österreichischen Katzen mit der pathohistologischen Diagnose einer nicht-eitrigen Enzephalomyelitis und klinischen Symptomen, die mit "Staggering disease" kompatibel sind, analysiert. Die Proben stammten aus den Jahren 1994 bis 2016 und wurden mittels real-time Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) und *in-situ* Hybridisierung untersucht. In sieben der untersuchten Proben konnten wir RusV-Nukleinsäuren nachweisen. Bornavirus 1 (BoDV-1) konnte in allen Fällen durch Immunhistochemie und RT-qPCR eindeutig als Ursache der „Staggering disease“ ausgeschlossen werden. Diese Studie bestätigt, dass RusV ein relevanter Erreger der nicht-eitrigen Enzephalomyelitis bei Katzen in einem geographisch und zeitlich begrenzten Krankheitscluster in Österreich war, hauptsächlich in den 1990er Jahren. Die geografische Verteilung der positiven Proben in dieser Studie deckt sich mit früheren Berichten über die "Staggering disease" in Österreich. Weitere Studien sind notwendig, um den Reservoirwirt dieser Erkrankung in Österreich zu identifizieren, sowie das plötzliche Verschwinden dieser Erkrankung in Österreich und ihr mögliches zoonotisches Potenzial zu eruieren.

1.2. Abstract in englischer Sprache

Clinical cases of "staggering disease", a nonsuppurative encephalomyelitis associated with gait abnormalities in cats, have been recorded in Sweden for decades. In the 1990s an increase in incidence could be observed in Austria. RusV, the causative agent of this clinicopathological entity, has only recently been identified. In this retrospective study, we analyzed a total of 23

brain and spinal cord samples from Austrian cats with a pathohistological diagnosis of nonsuppurative encephalomyelitis and clinical signs compatible with "staggering disease". The samples were collected between 1994 and 2016 and analyzed using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) and *in-situ*-hybridization. RusV nucleic acids could be detected in seven of the samples tested. Immunohistochemistry and RT-qPCR allowed the complete exclusion of Borna disease virus 1 (BoDV-1) in all cases. This study suggests that RusV was a significant etiological agent in a geographically and temporally restricted cluster of cases of feline non-purulent encephalomyelitis in Austria, mainly in the 1990s. The geographical distribution of positive samples in this study is consistent with previous reports of the 'staggering disease' in Austria. Further research is needed to confirm the reservoir host of 'staggering disease' in Austria and to investigate the sudden disappearance of this disease and its possible zoonotic potential.

2. Einleitung

2.1. Staggering disease

Das Krankheitsbild der sogenannten „Staggering disease“ wurde erstmalig in den 1970er Jahren in Schweden beschrieben [1]. Der ursprünglich schwedische Name „vingelsjuka“, welcher von Ström 1992 geprägt wurde, bedeutet übersetzt „Taumelkrankheit“ und bezieht sich auf das Kardinalsymptom der Erkrankung, Hinterhandschwäche, welche bei den betroffenen Katzen zu einem ataktischen Gangbild führt [2]. 1994 wurde das Krankheitsbild erstmalig von Weissenböck et al. bei österreichischen Katzen beschrieben [3]. Die schwedischen und österreichischen Katzen zeigten das typische ataktische Gangbild, meist mit progressiver Parese/Paralyse der Hinterextremitäten. Weitere Symptome waren Wesensänderungen (z.B. massives Vokalisieren, vermehrte Zugewandtheit, selten Aggressivität), Inappetenz, Tremor, Fieber, Unfähigkeit die Krallen einzuziehen, Hyperästhesie und selten epileptiforme Anfälle. Bis auf wenige Katzen in Schweden verstarben die betroffenen Tiere im Verlauf der Erkrankung oder wurden aufgrund des schlechten Zustandes und des Nichtansprechens auf Therapie euthanasiert. Bei allen Katzen konnte histologisch eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis mit massiven perivaskulären Zellinfiltraten festgestellt werden. Die Lokalisationen der Veränderungen (Großhirnrinde, Stammhirn, Hippocampus, Rückenmark) deckten sich bei den untersuchten Katzen stark [1–3]. Eine Ursache konnte damals nicht festgestellt werden, es wurde aufgrund des histologischen Bildes jedoch ein Virus als auslösendes Agens vermutet [3].

Bornaviren wurden von einer schwedischen Forschungsgruppe über Jahre hinweg als Erreger der „Staggering disease“ vermutet [4–6]. Die Ergebnisse der schwedischen Forschungsgruppe konnten jedoch nicht in anderen Publikationen bestätigt werden. So gelang bei österreichischen Proben nie ein direkter Erregernachweis von Bornaviren in Gehirn- oder Rückenmarksproben von „Staggering disease“ verdächtigen Katzen, sondern lediglich der unspezifische serologische Nachweis von Bornavirus-Antikörpern [7].

2.2. Rustrelavirus

Das Rustrelavirus (RusV) sowie das Ruhuguvirus (RuhV) gehören zu den ersten bekannten Verwandten des Rubellavirus (RuV), dem Erreger der humanen Röteln. RusV konnte 2020 in einem deutschen Zoo im Hirngewebe von drei akut neurologisch auffälligen Plazenta- und Beuteltieren, nämlich einem Esel (*Equus asinus*), einem Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) und einem Bennett-Baumkänguru (*Dendrolagus bennettianus*), sowie bei acht wilden Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*) am Zoogelände und in der Nähe des Zoos nachgewiesen werden. Bei allen drei Zootieren konnte histologisch eine nicht-eitrige Meningoenzephalitis festgestellt werden [8]. Neben den bereits erwähnten drei Fällen von RusV-assoziierten Meningoenzephalitiden gelang es kurz darauf, RusV in weiteren Fällen mittels *in-situ*-Hybridisierung und RT-qPCR nachzuweisen. Es handelte sich hierbei um einen erkrankten südamerikanischen Nasenbären (*Nasua nasua*) aus einem norddeutschen Zoo sowie einem eurasischen Fischotter (*Lutra lutra*), welcher in unmittelbarer Nähe des Zoos gefunden wurde. Darüber hinaus konnte RusV im Hirngewebe von drei Rothalswallabys (*Notamacropus rufogriseus*) nachgewiesen werden. Das klinische Bild der erkrankten Zootiere erinnerte stark an die in den 1970ern und 1990ern beschriebene „Staggering disease“ [9,10].

Kürzlich gelang es schließlich, RusV auch in Gehirn- und Rückenmarksproben von Katzen aus Schweden, Deutschland und Österreich nachzuweisen. Untersucht wurden Proben von neun österreichischen Katzen aus den 1990ern, welche ident waren mit jenen aus den Publikationen von 1994 und 1995 [3,7], 15 schwedischen Katzen aus den Jahren 2017 bis 2021 und 5 deutschen Katzen aus den Jahren 2017 bis 2022. Diese insgesamt 29 Katzen hatten histologisch alle eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis und zeigten zu Lebzeiten klinische Symptome, welche überwiegend mit jenen der „Staggering disease“ übereinstimmten. Zusätzlich wurden als Kontrollgruppe aus allen drei Ländern insgesamt 29 Proben von Katzen mit anderen Enzephalitiden beziehungsweise ohne Enzephalitis untersucht. Die verwendeten Verfahren waren Hochdurchsatz-Sequenzierung, RT-qPCR, *in-situ*-Hybridisierung (ISH) und Immunhistochemie (IHC). Es gelang, RusV bei 27 von 29 „Staggering disease“-verdächtigen Katzen nachzuweisen. Die Proben aus der Kontrollgruppe erwiesen sich hingegen alle als RusV-negativ. Darüber hinaus wurden Hirngewebsproben von 116 schwedischen Waldmäusen

(*Apodemus sylvaticus*) mittels RT-qPCR untersucht. Bei 8 von 106 Waldmäusen konnte RusV nachgewiesen werden, jedoch bei keiner der 10 untersuchten Gelbhalsmäuse [11].

In einer im Mai 2023 veröffentlichten Studie konnte RusV schließlich auch bei Löwen als Auslöser nicht-eitriger Meningoenzephalitis bestätigt werden. Es handelte sich um eine retrospektive Untersuchung von Gehirnproben von Löwen, welche in den 1980ern in zwei deutschen Zoos an Symptomen der „Staggering disease“ verstarben beziehungsweise euthanasiert wurden [12].

2.3. Fragestellung

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Retrospektivuntersuchung zum Vorkommen von Rustrelavirus bei Katzen mit nicht-eitrigen Meningoenzephalitiden in Österreich im Zeitraum 1994 bis 2016.

Untersucht wurden Gehirn- und Rückenmarkspalten von insgesamt 23 Katzen. Die Katzen wiesen vorberichtlich klinische Symptome und histologische Veränderungen, welche an „Staggering disease“ denken lassen, auf. Von allen untersuchten Katzen standen archivierte Paraffinblöckchen von Gehirn und Rückenmark zur Verfügung. Von einer Probe (2003/94) hatten wir zusätzlich tiefgefrorenes Material. Zum Nachweis von RusV wurde eine RT-qPCR, eine Routine-HE-Färbung und eine *in-situ*-Hybridisierung mittels RNAScope durchgeführt [13]. Zum Ausschluss von Bornaviren (BoDV-1) als ursächlichem Erreger wurde zusätzlich zu einer RT-qPCR noch eine Immunhistochemie durchgeführt.

Die Fragestellung der Arbeit lautete, ob in den untersuchten Proben das kürzlich entdeckte RusV nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus war es unser Ziel zu evaluieren, ob sich das Verbreitungsmuster der „Staggering disease“ aus den 1990ern (Marchfeld, nordöstlich von Wien) bestätigt oder dieses unter Umständen ausgeweitet werden muss [3].

2.4. Durchführung der Studie und Verfassen der Publikation

Im Folgenden werde ich auf meinen Beitrag als Erstautorin zu der Publikation „Rustrela Virus-Associated Encephalomyelitis (‘Staggering Disease’) in Cats from Eastern Austria, 1994–2016“ näher eingehen.

Zunächst habe ich damit begonnen, die Sektionsbefunde der Pathologie Datenbank der Veterinärmedizinischen Universität Wien der Jahre 1994 bis 2022 nach folgenden Stichwörtern zu durchsuchen:

„Katze + Enzephalitis/Meningoenzephalitis/Meningoenzephalomyelitis“

Die Vorberichte zu den einzelnen Befunden (sofern vorhanden) habe ich anschließend nach Fällen durchsucht, welche auch aufgrund der Symptomatik verdächtig für „Staggering disease“ erschienen. Nach Rücksprache mit Prof. Weissenböck haben wir uns schließlich auf 23 Fälle, welche den genannten Kriterien entsprachen, für unsere Studie geeinigt.

Der nächste Schritt war das Heraussuchen der alten Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Probenblöcke aus dem Archiv der Pathologie. Sobald ich zu unseren Fällen die relevanten Hirngewebe- und Rückenmarksproben herausgesucht hatte, wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und zunächst eine Routine Hämatoxylin-Eosin (HE) – Färbung durchgeführt. Ich habe im Folgenden alle HE-Schnitte mikroskopisch untersucht und den Grad der perivaskulären Entzündung beurteilt. Dabei habe ich das vor kurzem von Matiassek et al. beschriebene Graduierungsschema anhand der Zellschichten der perivaskulären Entzündungszellen angewandt und die Enzephalitiden in „mild“, „moderate“ und „severe“ eingeteilt [11].

Die *in-situ*-Hybridisierung mittels RNAscope habe ich gemeinsam mit Julia Matt, PhD. (Institut für Pathologie) anhand der Herstellerangaben durchgeführt [13]. Im Anschluss habe ich diese Schnitte mikroskopisch auf das Vorhandensein von RusV-Signalen untersucht beziehungsweise deren Lokalisation und Intensität beurteilt. Das endgültige Grading (1-3), wie von Matiassek et al. beschrieben, erfolgte gemeinsam mit Prof. Weissenböck [11].

Sobald wir die PCR Ergebnisse vom Institut für Virologie erhalten hatten sowie die Ergebnisse der Immunhistochemie auf Bornaviren vorlagen, konnte ich mit dem Verfassen des Manuskripts beginnen. Nach Absprache des allgemeinen Konzepts mit Prof. Weissenböck habe ich im Speziellen, den ersten Entwurf des Abstracts, der Einführung, des Material und

Methoden Teils, des Ergebnisteils und der Diskussion verfasst. Die Virologie Abschnitte im Material und Methoden Teil sowie Ergebnisteil wurden von den Kolleg:innen der Virologie, im Speziellen Pia Weidinger, Msc., verfasst.

Die Überprüfung und Bearbeitung erfolgte von Prof. Weissenböck. Schließlich wurde das Manuskript von allen Co-AutorInnen korrekturgelesen. Das Manuskript wurde von Prof. Weissenböck beim Journal „viruses“ eingereicht. Sobald die überwiegend sehr positiven reviews vorlagen, haben wir anhand dieser noch kleine Änderungen vorgenommen, woraufhin das Manuskript am 21.07.2023 zur Publikation akzeptiert und am 25.07.2023 schließlich publiziert wurde.

3. Publikation



Article

Rustrela Virus-Associated Encephalomyelitis ('Staggering Disease') in Cats from Eastern Austria, 1994–2016

Viktoria Weiss ¹, Pia Weidinger ² , Julia Matt ¹, Christiane Weissenbacher-Lang ¹ , Norbert Nowotny ^{2,3} and Herbert Weissenböck ^{1,*}

¹ Institute of Pathology, University of Veterinary Medicine, 1210 Vienna, Austria; 01051128@students.vetmeduni.ac.at (V.W.); julia.matt@vetmeduni.ac.at (J.M.); christiane.weissenbacher-lang@vetmeduni.ac.at (C.W.-L.)

² Viral Zoonoses, Emerging and Vector-Borne Infections Group, Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, 1210 Vienna, Austria; pia.weidinger@vetmeduni.ac.at (P.W.); norbert.nowotny@vetmeduni.ac.at (N.N.)

³ Department of Basic Medical Sciences, College of Medicine, Mohammed Bin Rashid University of Medicine and Health Sciences, Dubai P.O. Box 505055, United Arab Emirates

* Correspondence: herbert.weissenboeck@vetmeduni.ac.at



Citation: Weiss, V.; Weidinger, P.; Matt, J.; Weissenbacher-Lang, C.; Nowotny, N.; Weissenböck, H. Rustrela Virus-Associated Encephalomyelitis ('Staggering Disease') in Cats from Eastern Austria, 1994–2016. *Viruses* **2023**, *15*, 1621. <https://doi.org/10.3390/v15081621>

Academic Editor: Regina Hofmann-Lehmann

Received: 21 June 2023
Revised: 18 July 2023
Accepted: 21 July 2023
Published: 25 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Clinical cases of 'staggering disease', a nonsuppurative encephalomyelitis associated with gait abnormalities in cats, have been documented for decades in Sweden. In Austria, an increased incidence was observed in the 1990s. Only recently, rustrela virus (RusV) was identified as the causative agent of this clinicopathologic disease entity. In this retrospective study, we analyzed a total of 23 brain and spinal cord samples from Austrian cats with the pathohistological diagnosis of nonsuppurative encephalomyelitis and clinical signs consistent with staggering disease from 1994 to 2016 using reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and in situ hybridization. We were able to detect RusV nucleic acids in seven of the examined samples. Borna disease virus 1 (BoDV-1) could be excluded in all cases via immunohistochemistry and RT-qPCR. This study confirms that RusV has been a relevant etiological agent of nonsuppurative encephalomyelitis of cats in a geographically and temporally limited disease cluster in Austria, mainly in the 1990s. The geographic distribution of the positive samples in this study is consistent with earlier reports on 'staggering disease' in Austria. Further studies are necessary to confirm the reservoir host of 'staggering disease' in Austria, as well as investigations on the disappearance of this disease and its possible zoonotic potential.

Keywords: cat; rustrela virus; encephalomyelitis; staggering disease; Austria

1. Introduction

After first being described in domestic cats (*Felis catus*) in Sweden in the 1970s, so-called 'staggering disease' was also recorded in Austria in the 1990s [1–3]. The name of the disease is a translation of the original Swedish designation 'vingelsjuka' and refers to its most prominent clinical manifestation, hind-leg ataxia [4].

Clinically, the affected cats had a variety of neurological signs, e.g., hind-leg ataxia due to a spastic paresis/paralysis, inability to retract their claws, change in behavior, and in some cases hyperesthesia and seizures [1,2,4,5]. Histologically, all cases showed mild-to-severe non-purulent meningoencephalomyelitis. A viral cause was suspected, but the pathogen responsible for the disease remained unknown for decades [1,2,5].

In a recent study by Matiassek et al., rustrela virus (RusV, *Rubivirus strelnense*, family *Matonaviridae*) was identified as the causative agent of 'staggering disease' in cats in Sweden, Germany, and Austria [6]. The same virus was also found retrospectively in tissue samples from lions which had been affected by non-purulent meningoencephalitis in the 1980s in two zoos in Germany [7].

RusV, first described by Bennett et al. in 2020, is closely related to rubella virus, which causes human measles [8]. RusV was detected in the brain tissues of a donkey (*Equus asinus*), a capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), and a Bennett's tree kangaroo (*Dendrolagus bennettianus*). These animals were all located in the same zoo in northern Germany, and all showed neurological signs before they died. Bennett et al. were also able to detect RusV in brain samples from yellow-necked field mice (*Apodemus flavicollis*), which were caught either on the zoo grounds or within a 10 km radius around the zoo. Therefore, the yellow-necked field mouse was suspected to be the reservoir host of RusV [8]. In addition, fatal RusV infections were also identified in red-necked wallabies (*Notamacropus rufogriseus*), a ring-tailed coati (*Nasua nasua*), and a Eurasian river otter (*Lutra lutra*) [9,10].

In this retrospective study, we analyzed archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from 23 cats diagnosed with nonsuppurative encephalitis between 1994 and 2016 for the presence of RusV genetic material using reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and in situ hybridization (RNA scope assay) [11]. The major aim was to find out whether RusV-associated encephalitis cases had been present throughout the entire sampling period and if the distribution area was larger than originally described [2,6].

2. Materials and Methods

2.1. Database Search

First, the database of necropsy reports of the Institute of Pathology, University of Veterinary Medicine, Vienna, including the years 1994 through 2022, was searched for the following keywords: cat + encephalitis/meningoencephalitis/meningoencephalomyelitis.

Subsequently, the archived files of the retrieved cases (accompanying letters, necropsy notes, and necropsy reports) were studied thoroughly. Our intention was to identify cases with matching clinical signs (e.g., ataxia, hind leg weakness, change in behavior, seizures) and/or histological findings (non-purulent encephalitis/meningoencephalitis/meningoencephalomyelitis of unclear etiology). Some of the accompanying letters from the 1990s already mentioned 'staggering disease' as the suspected diagnosis.

Based on the criteria mentioned above, we identified 23 cases, of which brain and spinal cord (if available) samples were retrieved from the archive for further analyses.

2.2. Selected Samples

Of these 23 cats, FFPE blocks were available from the brain tissues of all cases and from the spinal cord samples of eight cases. In one case, a freshly taken brain sample had been stored at -80°C . All samples originated from domestic cats with 'staggering disease'-like signs and were collected between 1994 and 2016. The majority lived in Vienna and the surrounding Lower Austria, but single cases were from the federal states of Upper Austria, Styria, and Salzburg.

2.3. Nucleic Acid Extraction

Of the FFPE specimens, three brain sections $10\text{ }\mu\text{m}$ in thickness were transferred to 2 mL safe-lock tubes together with 1 mL xylol, briefly vortexed, and incubated at 37°C for 20 min in a thermal shaker at 800 rpm. Thereafter, the samples were centrifuged at $16,200\times g$ for 5 min, and the supernatant was carefully removed via pipetting. Then the samples were washed twice: 1 mL EtOH was added and the samples were vortexed and further solubilized in a TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Germany), incubated for 5 min at room temperature (RT), and centrifuged for 5 min at $16,200\times g$; the supernatant was cautiously removed, and the procedure was repeated. Finally, the tubes were opened and the pellet dried for 1 min at RT. For the lysis of the pellets, 30 μL proteinase K and 300 μL ATL tissue lysis buffer (both QIAGEN) were added, and the samples were vortexed and incubated at 55°C in a thermal shaker at 800 rpm for 1 h. Subsequently, the samples were cooled to RT and centrifuged at $16,200\times g$ for 1 min.

For one case (2003/94), a native frozen brain tissue sample was available. It was homogenized in 1 mL phosphate-buffered saline with two 2.8-mm ceramic beads (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) in a TissueLyser II, frozen at -80°C for one hour, thawed, and then centrifuged at $16,200\times g$ for 1 min. A 200 μL quantity of each sample's supernatant was used for automated total nucleic acid extraction via QIAamp Viral RNA Mini Kit in a QIAcube extraction robot (both QIAGEN), according to the manufacturer's instructions.

2.4. PCR Analysis

All nucleic acid extracts were subjected to several PCR assays. In order to verify that the previous processing steps were successful, a beta-actin mRNA qPCR was performed using a previously published set of primers and probe [12]. For the detection of RusV RNA, all extracts were initially screened using the recently established RT-qPCR assay panRusV-2 [6]. To exclude Borna disease virus 1 (BoDV-1) as the causative agent of the disease, all samples were additionally screened using a RT-qPCR assay established in-house, targeting the RNA-dependent RNA polymerase (*L*) gene of BoDV-1 (Table 1). RT-qPCRs were performed with Quantabio qScript XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix (Quantabio, Beverly, MA, USA), using primers and probes at concentrations of 0.5 μM each, 2.5 μL extract, and the following conditions: 50°C for 15 min, 95°C for 2 min, and 45 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 30 s. All RT-qPCRs were performed on an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), qTOWER³ G (Analytik Jena, Jena, Germany), or Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Table 1. Primer/probe sets used for RusV and BoDV-1 RNA detection.

Virus	PCR Set	Primer/Probe Name	Sequence (5' to 3')
RusV	5F/5R	5F	GTCGAGGAGCAGATAAGCCC
	(1st round)	5R	GTAACATAGTCGGGCTGGGG
	203Fn/349Rn	203Fn	TGCAGTCCAAGCGGTGATAC
	(2nd round)	349Rn	CTGGGRITCACGAGGCAATG
RusV	5113F/5681R	5113F	CACCGAGTTGACATGAATC
	(1st round)	5681R	ATGTGGCGTTCACAGCTAGA
	5242Fn/5449Rn	5242Fn	GTGARCCCGCGACAYTACTC
	(2nd round)	5449Rn	GTTGCCACCCGCTTGATAGG
BoDV-1	BoDV-1 L1 RT-qPCR	202F	AGCTGCCTAATGACCTACAA
		323R	TGATCAAGAAATGACCTTG
		236P	CAGCAGACACAGCCAAGAGCAG

Subsequently, cDNA was synthesized from all RusV RT-qPCR-positive as well as questionable samples using Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and random primers (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. From this cDNA, 2.5 μL were used for the following conventional RusV PCRs. Due to the lack of amplicons generated from the first-round PCRs, two nested PCR sets were designed with partly degenerated primers, especially targeting the Austrian samples according to the sequences established by Matiassek et al. [6] as well as other sequences generated in-house (see Table 1). Primers were designed using Clone Manager 9 Professional (Scientific & Educational Software, Westminster, CO, USA). Names of second-round primers indicate their respective positions within the complete genome sequence of RusV derived from cat AUT_02/1992 (acc. no. ON641041), the original tissue extract of which also served as a positive control for all RusV PCR assays [6].

All conventional PCRs were performed using QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN). The following conditions were used for the first round of PCRs: 95°C for 15 min, 50 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by a final elongation step at 72°C for 7 min. The second round of PCRs was performed using the following settings: 95°C for 5 min, 50 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 30 s,

and a final elongation at 72 °C for 7 min. All PCR results were examined via automatic gel electrophoresis on the QIAxcel Advanced System (QIAGEN). Nested PCR products (amplicon lengths 146 and 207 bp, respectively) were subjected to Sanger sequencing using Mix2Seq kits (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany), aligned with other RusV sequences using Clone Manager 9 Professional, and additionally subjected to BLAST search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 17 January 2023).

2.5. Hematoxylin-Eosin (H.E.) Staining of the FFPE Samples

All available FFPE brain and spinal cord samples from the 23 selected cases were cut into 3 µm thin slices, mounted on glass slides, and stained with hematoxylin-eosin. The slides were microscopically examined for the presence and amount of non-purulent encephalitis, meningoencephalitis, or meningoencephalomyelitis. The samples in which perivascular inflammation was detected were graded as mild, moderate, or severe, based on the extent of inflammatory cell infiltration according to a previously described scoring scheme by Matiassek et al. [6].

2.6. Immunohistochemistry

For each case, one brain section (level of thalamus including hippocampus) was subjected to immunohistochemistry with the anti-BoDV-antibody Bo18 (kindly provided by Dr. Sibylle Herzog, University of Gießen, Germany). The staining procedure was performed with an automated immunostainer (Thermo Autostainer 360-2D System) using the Ultravision LP Detection System (both Thermo Fisher Scientific) as previously described [13]. The dilution of the primary antibody was 1:30,000. A BoDV-1-positive horse brain served as positive control, and replacement of the primary antibody by an irrelevant mouse monoclonal antibody (FIP 1CD7, Ingenasa, Madrid, Spain) was used as negative control.

2.7. In Situ Hybridization (ISH)

The probe used in this study was the RNAscope probe V-RusV-NP-O1 (cat. no. 1173021-C1) produced by Advanced Cell Diagnostics (Newark, NJ, USA) based on a consensus sequence of RusV from Austria designed in the highly conserved region of the 5' end of the RusV genome. A probe designed for the mRNA of the housekeeping gene peptidyl-prolyl isomerase-B (*Felis catus*-PPIB; cat. no. 455011) served as a technical positive control. As negative control, a probe designed for bacterial dihydropicolinate reductase (DapB; cat. no. 310043) was used. In situ hybridization was performed manually using the RNAscope 2.5 High Definition RED Assay (Advanced Cell Diagnostics) according to the manufacturer's instructions [11]. From each of the 23 cases, two brain sections (level of thalamus or midbrain, hippocampus, and cerebral cortex or level of cerebellum and medulla oblongata, respectively), and from four cases one section of spinal cord was deparaffinized and pre-treated with 1× Targeted Retrieval Solution and RNAscope Protease Plus Solution (Advanced Cell Diagnostics) before hybridization [11]. The tissues were then treated with a series of pre-amplifier and amplifier solutions as well as chromogen solution (Advanced Cell Diagnostics) and counterstained with Hematoxylin Gill No. 2 (Merck, Darmstadt, Germany). In each run, a brain section from an Austrian cat previously diagnosed with RusV infection was used as a positive control. The signals were scored according to a previously established scheme [6].

3. Results

3.1. PCR and Sequencing Results

In total, six of the 23 FFPE samples, as well as the one frozen sample, tested positive in a RusV RT-qPCR [Ct (cycle threshold) 34.0 to 44.0 and 26.1 to 30.9, respectively]. However, from the six FFPE samples, only two could be confirmed via conventional nested PCR, resulting in one specific sequence for each: from sample 214-97, a 144 bp-long sequence could be established from PCR 203Fn/349Rn and from sample 142-98, a 189 bp-long sequence was generated from PCR 5242Fn/5449Rn. BLAST search revealed a relationship

only to other RusV sequences and showed for the first sequence 93.9% identity to AUT_09 and for the second 96.5% identity to AUT_06 (both from 1993 and first described by Matiassek et al. [6]). In addition, from the native brain tissue sample, sequences could be established from both nested PCRs, resulting in a 160 bp-long sequence from PCR 203Fn/349Rn and a 180 bp-long sequence from PCR 5242Fn/5449Rn. BLAST search revealed the closest relationship to AUT_06 (97.4–98.3%), and alignment of all generated sequences showed several nucleotide differences between all of them as well as the positive control, thereby eliminating the possibility of laboratory contamination. Furthermore, all samples tested negative in the BoDV-1 RT-qPCR. All cats diagnosed with RusV infection originated from the same geographic region of eastern Austria in which all previous cases of ‘staggering disease’ had occurred (Figure 1).

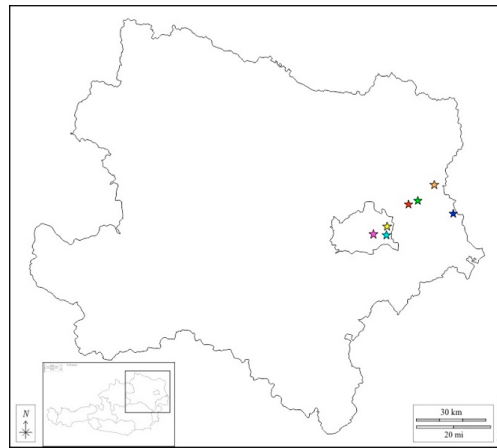


Figure 1. Map of Lower Austria (insert: geographical location of Lower Austria within Austria) showing the origin of the rustrela virus-infected cats (cyan: 826/94; orange: 2003/94; green: 984/96; blue: 214/97; magenta: 215/97; red: 142/98; yellow: 57/10).

3.2. Histological Analysis and Immunohistochemistry

In all 23 examined samples, non-purulent perivascular inflammation could be detected (Figure 2). The histological features (perivascular lymphohistiocytic cell infiltrates) as well as the distribution pattern (brain stem, hippocampus formation, neocortex) were consistent with the recently published study by Matiassek et al. [6]. The severity score of inflammation is shown in Table 2. In none of the cases was BoDV antigen detected via immunohistochemistry.

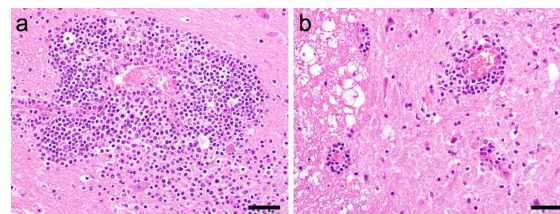


Figure 2. Histological features of rustrela virus-associated encephalomyelitis in cats. Large polio-predominant lymphohistiocytic perivascular cuffs in cerebral cortex (a) and spinal cord (b). Occasionally, inflammatory cells have migrated into the adjacent neuropil (a). Hematoxylin-eosin staining; case 984/96; bars = 40 μ m.

3.3. In Situ Hybridization (ISH)

We were able to detect a RusV-specific signal in seven of the 23 samples, while 16 samples were ISH-negative. All six RT-qPCR-positive samples tested positive via ISH as well (Figure S1). Interestingly, one RT-qPCR-negative sample from 1994 showed a positive ISH reaction (case 826/94).

The RusV signals were predominantly located in the perikarya of neurons of the cerebral cortices (mainly neocortex) (Figure 3a–f), as well as in the brain stem, the hippocampus formation (Figure 4), the cerebellum (Figure 3g–i), and in ventral horn neurons of the spinal cord (Figure 3j–l). The intensities of the signals are shown in Table 2.

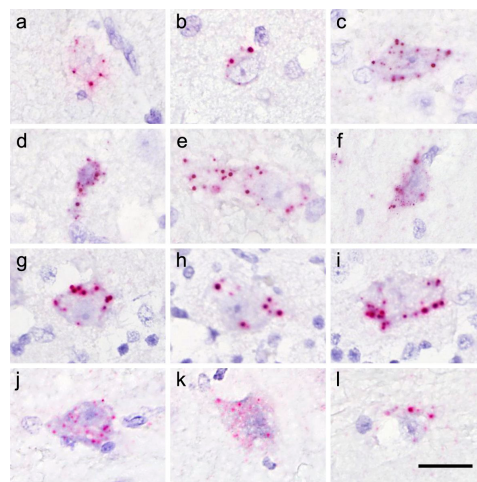


Figure 3. Detection of rustrela virus RNA via RNAscope in situ hybridization. Examples of staining patterns in the cytoplasm of neurons; cerebral cortex: case 57/10 (a,b), case 214/97 (c–e) and case 2003/94 (f); Purkinje cells: case 2003/94 (g–i); ventral horn neurons of spinal cord: case 2003/94 (j–l); bar = 10 μ m.

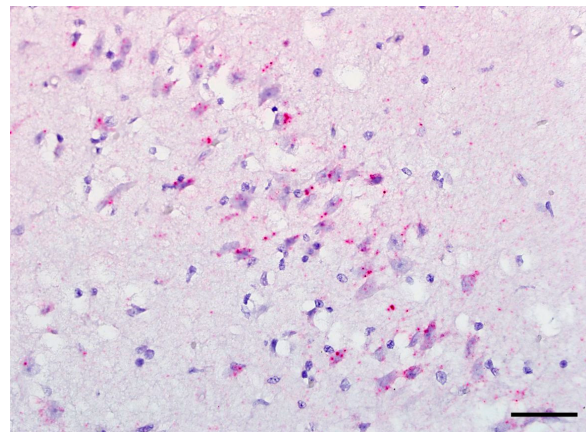


Figure 4. Detection of rustrela virus RNA via RNAscope in situ hybridization. Virus RNA located in the cytoplasm of numerous neurons in the pyramidal cell layer of the hippocampus; typical spherical reaction products; case 2003/94; bar = 40 μ m.

Table 2. Geographic, demographic and clinical data of the investigated cats. Cats in which rustrela virus-associated encephalomyelitis was diagnosed are printed in bold letters.

Sample ID	Geographic Origin	Sex	Age	Month of Euthanasia/Death	Reported Anamnesis	Severity of Inflammation	RusV RT-qPCR (Ct)	RusV ISH Score
826/94	1220 Wien	fn	adult	June 1994	CNS signs, blindness, deterioration despite therapy; euthanasia	moderate	-	1
1942/94	3920 Hopfenleiten	mn	adult	November 1994	Aujeszký's disease or toxicosis suspected	severe	-	-
2003/94	2252 Ollersdorf	fn	3 y	November 1994	'staggering disease' suspected	severe	26.1–30.9 (frozen) 38.5–44.0 (PET)	3
2250/94	1120 Wien	m	juvenile	December 1994	ataxia, weak hind extremities; euthanasia	moderate	-	-
2272/94	1040 Wien	m	1 y	December 1994	seizures with salivation, tonic-clonic convulsions for 3 days, brief improvement after administration of diazepam; animal died during seizure	mild	-	-
984/96	2230 Gänserndorf	mn	adult	May 1996	'staggering disease' suspected	severe	35.2–40.5	1
2325/96	1220 Wien	mn	5 y	December 1996	ataxia and constipation, short-term improvement with treatment; relapse with high-grade ataxia, intestinal atony; cardiovascular failure; euthanasia	severe	-	-
214/97	2293 Marchegg	mn	7 y	January 1997	for 2–3 months, signs of 'staggering disease' which improved briefly; for 1 month, extensor cramps of all 4 extremities, uncoordinated movements	moderate	35.1–40.2	2
215/97	1020 Wien	fn	6 y	January 1997	for 2 months, only able to stand in a sawhorse stance, hyperesthesia to manipulation of the head	severe	38.6–43.4	1
2175/97	1220 Wien	fn	10 y	October 1997	impaired balance, tonic-clonic convulsions	moderate	-	-
142/98	2231 Straßhof	mn	7 y	January 1998	progressive paralysis beginning in posterior extremities, no fever; 'staggering disease' suspected	mild	34.0–38.2	2
638/00	4722 Peuerbach	fn	2 y	March 2000	abnormal movement pattern, fever	mild	-	-
209/02	1220 Wien	mn	7 y	February 2002	epileptic seizures	severe	-	-
1114/02	2732 Willendorf	f	juvenile	June 2002	progressive central nervous signs; euthanasia	severe	-	-
2498/02	4203 Altenberg	m	6 y	December 2002	CNS signs, anorexia	mild	-	-
2026/04	1210 Wien	mn	10 y	December 2004	sudden paraparesis on the right side, loss of sensitivity on the left side of the face	moderate	-	-
1283/05	8130 Frohnleiten	fn	1 y	July 2005	salivation and vocalization, seizures, increasing weakness, unsteady gait, inappetence; euthanasia	mild	-	-
1191/06	1210 Wien	m	juvenile	July 2006	fever, anisocoria, disorientation, blindness, ataxia, tremor, inappetence; euthanasia	mild	-	-
1263/08	1210 Wien	fn	9 y	August 2008	CNS deficits, seizures, ataxia	severe	-	-
57/10	1220 Wien	mn	8 y	January 2010	inappetence, apathy, exsiccosis, rhinitis	moderate	41.1–42.0	1
816/13	3002 Purkersdorf	fn	6 y	July 2013	2x generalized epileptic seizures, head tremor, therapy-resistant convulsions	moderate	-	-
200/16	5721 Piesendorf	mn	juvenile	March 2016	epileptic seizures; euthanasia	moderate	-	-
490/16	3160 Traisen	mn	17 y	June 2016	acute tetraparesis, progressive blindness	severe	-	-

f: female; fn: female neutered; m: male; mn: male neutered; y: years; the RusV ISH has been scored according to Matiassek et al. [6].

4. Discussion

The first documented and etiologically confirmed case of RusV-associated meningoencephalitis in Austria dates back to late 1991, followed by a series of cases in 1992 and 1993 [2,3,6]. Thereafter, diseases clinically and morphologically consistent with ‘staggering disease’ have been sporadically observed but never systematically investigated.

In this retrospective study, we were able to confirm the presence of RusV in brain and spinal cord samples in seven out of 23 Austrian cats with nonsuppurative meningoencephalitis using PCR and in situ hybridization. The present survey spanned the time period between 1994 and 2016. Interestingly, six of the seven RusV-positive cases were collected during the first five years of the survey, between 1994 and 1998. Twelve years later—in 2010—a single additional positive case could be verified. After 2010, we were not able to find RusV genetic material in any of our samples. In addition, no further cases clinically suspected of being ‘staggering disease’ have been reported in Austria since. These observations raise the question of why the clinicopathologic entity ‘staggering disease’ seems to have gradually declined and finally disappeared in Austria. The situation in Sweden, the only other country with a documented endemic area with RusV infections in cats, is entirely different, because ‘staggering disease’ has never disappeared or markedly changed its incidence since the first occurrence [6].

Previous work has strongly suggested the involvement of rodent reservoir hosts in virus transmission [6,8]. Although screening of various rodent species for the presence of RusV has just started [14] and there are no data of RusV infections from Austrian rodents, it is very likely that European wood mice (*Apodemus sylvaticus*) or yellow-necked field mice (*A. flavicollis*) have also served as reservoir hosts in the endemic area in eastern Austria. These species have been hypothesized to be plausible reservoir hosts and have been found to harbor RusV without obvious clinical signs and pathological tissue lesions. Moreover, both *Apodemus* species are quite abundant in Lower Austria, albeit in geographic areas much wider than the distribution range of ‘staggering disease’ cases [15]. Based on these data, it is not very likely that the disappearance of ‘staggering disease’ in cats is related to a marked decline in the reservoir host population. Alternatively, RusV-infected individuals might have decreased in number and finally virus circulation entirely ceased. Although no histological changes could be found in brain samples of the suspected reservoir hosts in Germany [8] and Sweden [6], a connection between the presence of RusV and decreased overall fitness in the reservoir host population should be investigated. As there are no data on RusV infections of reservoir hosts in Austria, these assumptions are highly speculative to date. Further studies should be conducted to identify the responsible host and to investigate the reason for the sudden disappearance of ‘staggering disease’ in Austria.

According to current knowledge, RusV fulfills the criteria of a reservoir host-transmitted infection. The patient histories of the cats included in this study are not indicative of direct cat-to-cat transmission. Although we assume that all RusV-positive cats included in this study had outdoor access, it needs to be mentioned that we do not have solid data from all cats.

The geographic area of ‘staggering disease’ found in this study is highly consistent with the distribution pattern mentioned by Weissenböck et al. and Matiassek et al. [2,6]. This confirms the previously assumed highly sedentary nature of the involved, probably persistently infected reservoir hosts, leading to locally restricted endemic pockets in which spill-over infections in cats (and other mammals) occurred. This phenomenon is reminiscent of the geographic distribution of another infection transmitted by a small mammal reservoir host, Borna disease [13,16,17].

The majority of cases with histopathologically diagnosed nonsuppurative encephalomyelitis (69.6%) did not reveal a RusV infection. Because the selection criteria were not very stringent in order to also allow for discovery of atypical cases of ‘staggering disease’ (similar to some recent cases from Germany) [6], cats with encephalitis due to other unidentified etiologies were included. It can also not be completely excluded that samples of single cases which contained low amounts of virus were erroneously diagnosed as negative, due to the age of the samples and—with a single exception—the availabil-

ity of FFPE samples only, which leads to a loss of sensitivity of PCR assays and other molecular techniques. However, it is quite evident that not all cases of nonsuppurative encephalomyelitis in cats can be attributed to RusV. RusV infections were more likely in cats originating from the defined endemic geographic area, when ataxia, paresis, or movement disorders were prominent clinical signs, and when the disease occurred during the 1990s. However, single cases (such as 57/10) presented with atypical clinical signs and outside the peak time of infections.

With this study, we were able to further substantiate RusV as the causative agent of ‘staggering disease’ and prove that sporadic cases of RusV-infected cats were common in the already described endemic area in eastern Austria during the entire decade of the 1990s. BoDV-1, which has been claimed to be the putative etiologic agent of ‘staggering disease’ in cats in Sweden, has been excluded in all cases via PCR and immunohistochemistry.

As far as we know today, RusV is able to infect a variety of different species [8] belonging to entirely unrelated orders (Carnivora, Diprotodontia, Perissodactyla, Rodentia) [8,10]. By analogy to BoDV, a possible zoonotic potential should be investigated [18,19], and it might be of interest to test non-purulent meningoencephalitides of unknown etiology in humans for the presence of RusV.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15081621/s1>, Figure S1: RNAscope in situ hybridization detects rustrela virus RNA in neurons of all cases diagnosed as positive. These neurons are either located in the cerebral cortex (826/94, 214/94, 215/94, 57/10), the Purkinje cell layer of the cerebellum (2003/94, 984/96), or in brain stem nuclei (142/98).

Author Contributions: Conceptualization, H.W. and N.N.; methodology, V.W., P.W. and J.M.; software, P.W.; validation, P.W., J.M., C.W.-L., N.N. and H.W.; formal analysis, V.W. and P.W.; investigation, V.W., P.W. and H.W.; resources, H.W. and N.N.; data curation, V.W., P.W. and H.W.; writing—original draft preparation, V.W. and P.W.; writing—review and editing, V.W., P.W., C.W.-L., N.N. and H.W.; visualization, V.W. and H.W.; supervision, H.W. and N.N.; project administration, H.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Open Access Funding by the University of Veterinary Medicine Vienna.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted on archived tissue samples from cats which had been forwarded to the Institute of Pathology for the purpose of diagnostic investigations by the animal owners or by the attending veterinarian at the owners’ request.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data are available in electronic laboratory protocols of the participating institutions and can be made available upon request.

Acknowledgments: The authors thank Nora Nedorost, Madeleine Lunardi and Klaus Bittermann for their technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kronevi, T.; Nordström, M.; Moreno, W.; Nilsson, P.O. Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nord. Veterinärmedicin* **1974**, *26*, 720–725.
2. Weissenböck, H.; Nowotny, N.; Zohar, J. Feline Meningoencephalomyelitis (“Staggering Disease”) in Österreich. *Wien. Tierärztl. Mon.* **1994**, *81*, 195–201.
3. Nowotny, N.; Weissenböck, H. Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis (“staggering disease”) and studies of its etiology. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 1668–1669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ström, B. Vingelsjuka hos katt. *Sven. Veterinärtidning* **1992**, *44*, 19–24.
5. Lundgren, A.-L. Feline non-suppurative meningoencephalomyelitis. A clinical and pathological study. *J. Comp. Pathol.* **1992**, *107*, 411–425. [[CrossRef](#)]
6. Matiasek, K.; Pfaff, F.; Weissenböck, H.; Wylezich, C.; Kolodziejek, J.; Tengstrand, S.; Ecker, F.; Nippert, S.; Starcky, P.; Litz, B.; et al. Mystery of fatal ‘staggering disease’ unravelled: Novel rustrela virus causes severe meningoencephalomyelitis in domestic cats. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 624. [[CrossRef](#)]

7. De Le Roi, M.; Puff, C.; Wohlsein, P.; Pfaff, F.; Beer, M.; Baumgärtner, W.; Rubbenstroth, D. Rustrela virus as putative cause of nonsuppurative meningoencephalitis in lions. *Emerg. Infect. Dis.* **2023**, *29*, 1042. [\[CrossRef\]](#)
8. Bennett, A.J.; Paskey, A.C.; Ebinger, A.; Pfaff, F.; Priemer, G.; Höper, D.; Breithaupt, A.; Heuser, E.; Ulrich, R.G.; Kuhn, J.H.; et al. Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature* **2020**, *586*, 424–428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Voss, A.; Schlieben, P.; Gerst, S.; Wylezich, C.; Pfaff, F.; Langner, C.; Niesler, M.; Schad, P.; Beer, M.; Rubbenstroth, D.; et al. Rustrela virus infection—An emerging neuropathogen of red-necked wallabies (*Macropus rufogriseus*). *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 4016–4021. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Pfaff, F.; Breithaupt, A.; Rubbenstroth, D.; Nippert, S.; Baumbach, C.; Gerst, S.; Langner, C.; Wylezich, C.; Ebinger, A.; Höper, D.; et al. Revisiting rustrela virus—New cases of encephalitis and a solution to the capsid enigma. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *10*, e0010322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Wang, F.; Flanagan, J.; Su, N.; Wang, L.-C.; Bui, S.; Nielson, A.; Wu, X.; Vo, H.-T.; Ma, X.-J.; Luo, Y. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14*, 22–29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Toussaint, J.F.; Sailleau, C.; Breard, E.; Zientara, S.; De Clercq, K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Meth.* **2007**, *140*, 115–123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Weissenböck, H.; Bagó, Z.; Kolodziejek, J.; Hager, B.; Palmetzhofer, G.; Dürrwald, R.; Nowotny, N. Infections of horses and shrews with Bornaviruses in Upper Austria: A novel endemic area of Borna disease. *Emerg. Microb. Infect.* **2017**, *6*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
14. Weidinger, P.; Kolodziejek, J.; Khafaga, T.; Loney, T.; Howarth, B.; Sher Shah, M.; Abou Tayoun, A.; Alsheikh-Ali, A.; Camp, J.V.; Nowotny, N. Potentially zoonotic viruses in wild rodents, United Arab Emirates, 2019—A pilot study. *Viruses* **2023**, *15*, 695. [\[CrossRef\]](#)
15. Schmidt, S.; Essbauer, S.S.; Mayer-Scholl, A.; Poppert, S.; Schmidt-Chanasit, J.; Klempa, B.; Henning, K.; Schares, G.; Groschup, M.H.; Spitzenberger, F.; et al. Multiple infections of rodents with zoonotic pathogens in Austria. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* **2014**, *14*, 467–475. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Dürrwald, R.; Kolodziejek, J.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. The bicolored white-toothed shrew *Crocidura leucodon* (HERMANN 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93659. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Hilbe, M.; Herrsche, R.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Zlinszky, K.; Ehrensperger, F. Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 675–677. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Schlottau, K.; Forth, L.; Angstwurm, K.; Höper, D.; Zecher, D.; Liesche, F.; Hoffmann, B.; Kegel, V.; Seehofer, D.; Platen, S.; et al. Fatal encephalitic Borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1377–1379. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Niller, H.H.; Angstwurm, K.; Rubbenstroth, D.; Schlottau, K.; Ebinger, A.; Giese, S.; Wunderlich, S.; Banas, B.; Forth, L.F.; Hoffmann, D.; et al. Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999–2019: An epidemiological investigation. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 467–477. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4. Diskussion

Der erste dokumentierte und ätiologisch bestätigte Fall von RusV-assoziiierter Meningoenzephalitis in Österreich geht auf Ende 1991 zurück, gefolgt von einer Reihe von Fällen in den Jahren 1992 und 1993 [3,7,11]. Danach wurden sporadisch Erkrankungen beobachtet, die klinisch und morphologisch mit der „Staggering disease“ übereinstimmten, jedoch nie systematisch untersucht wurden.

In dieser retrospektiven Studie konnten wir das Vorhandensein von RusV in Gehirn- und Rückenmarkspalten bei sieben von 23 österreichischen Katzen mit nicht-eitriger Meningoenzephalitis mittels PCR und *in-situ*-Hybridisierung nachweisen. Die Proben unserer Untersuchung wurden im Zeitraum zwischen 1994 und 2016 gewonnen. Interessanterweise stammten sechs der sieben RusV-positiven Fälle aus den ersten fünf Jahren der Erhebung, also 1994 bis 1998. Zwölf Jahre später, 2010, konnte ein einziger weiterer positiver Fall nachgewiesen werden. Nach 2010 konnten wir in keiner unserer Proben mehr genetisches Material von RusV finden. Darüber hinaus wurden in Österreich seither keine weiteren Fälle mit klinischem Verdacht auf „Staggering disease“ gemeldet. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, warum die klinisch-pathologische Entität „Staggering disease“ in Österreich allmählich zurückgegangen und schließlich verschwunden ist. Die Situation in Schweden, dem einzigen anderen Land mit einem dokumentierten endemischen Gebiet mit RusV-Infektionen bei Katzen, stellt sich völlig anders dar, da die „Staggering disease“ seit ihrem ersten Auftreten in den 1970ern weder verschwunden ist noch sich ihr Auftreten wesentlich verändert hat [11].

Frühere Publikationen deuten stark darauf hin, dass Mäuse als Reservoirwirte an der Virusübertragung beteiligt sind [8,11]. Obwohl das Screening verschiedener Mäusearten auf das Vorhandensein von RusV gerade erst begonnen hat [14] und es keine Daten über RusV-Infektionen bei österreichischen Mäusen gibt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Europäische Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) oder die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) ebenfalls als Reservoirwirte im endemischen Gebiet in Ostösterreich gedient haben. Bei beiden Arten wurde RusV ohne offensichtliche klinische Anzeichen und pathologische Gewebeläsionen nachgewiesen, womit sie als plausible Reservoirwirte angesprochen werden können [8,11]. Darüber hinaus sind beide Mäusearten in Niederösterreich häufig anzutreffen, wenn auch in

geografischen Gebieten, die weit über das Verbreitungsgebiet der „Staggering disease“ hinausgehen [15]. Aufgrund dieser Daten ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass das Verschwinden der „Staggering disease“ bei Katzen mit einem deutlichen Rückgang der Reservoirwirtpopulation zusammenhängt. Es könnte sein, dass die Zahl der RusV-infizierten Individuen abgenommen hat und die Viruszirkulation schließlich ganz zum Erliegen kam. Obwohl in den Gehirnproben der mutmaßlichen Reservoirwirte in Deutschland [8] und Schweden [11] keine histologischen Veränderungen festgestellt werden konnten, sollte ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von RusV und einer verringerten Fitness in der Reservoirwirtpopulation untersucht werden. Da es keine Daten über RusV-Infektionen von Reservoirwirten in Österreich gibt, sind diese Annahmen bisher spekulativer Natur. Weitere Studien sind wünschenswert, um den verantwortlichen Wirt zu identifizieren und den Grund für das plötzliche Verschwinden der „Staggering disease“ in Österreich zu untersuchen.

Nach derzeitigem Kenntnisstand erfüllt RusV die Kriterien einer durch einen Reservoirwirt übertragenen Infektion. Die Vorberichte der in diese Studie einbezogenen Katzen deuten nicht auf eine direkte Übertragung von Katze zu Katze hin. Obwohl wir davon ausgehen, dass alle in diese Studie einbezogenen RusV-positiven Katzen Freigang hatten, muss erwähnt werden, dass wir nicht über solide Daten von allen Katzen verfügen.

Das in dieser Studie festgestellte geografische Verbreitungsgebiet der „Staggering disease“ stimmt mit jenem von Weissenböck et al. und Matiassek et al. beschriebenen Gebiet überein [3,11]. Dies bestätigt die zuvor angenommene lokal sesshafte Natur der betroffenen, wahrscheinlich persistent infizierten Reservoirwirte, welche in den betroffenen endemischen Gebieten gelegentlich zu Spillover-Infektionen bei Katzen (und anderen Säugetieren) führt. Dieses Phänomen erinnert an die geografische Verteilung einer anderen Infektionskrankheit, die durch einen Reservoirwirt von Kleinsäugetieren übertragen wird, der Bornaschen Krankheit [16–18].

Bei der Mehrzahl der Fälle mit histopathologisch diagnostizierter nicht-eitriger Enzephalomyelitis (69,6 %) konnten wir keine RusV-Infektion nachweisen. Da die Auswahlkriterien nicht übermäßig streng waren, um auch die Entdeckung atypischer Fälle von „Staggering disease“ zu ermöglichen (ähnlich wie bei einigen kürzlich aufgetretenen Fällen aus

Deutschland) [11], wurden auch Katzen mit Enzephalitis aufgrund anderer nicht identifizierter Ätiologien eingeschlossen. Darüber hinaus kann aufgrund des Alters der Proben und der - mit einer Ausnahme - fehlenden Verfügbarkeit von frisch gefrorenen Gewebeproben nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Proben von Einzelfällen mit geringen Virusmengen fälschlicherweise als negativ beurteilt wurden. Die Verwendung von alten Paraffinblöcken kann zu einer Reduktion der Sensitivität von PCR-Assays und anderen molekularen Techniken führen. Es ist jedoch offensichtlich, dass nicht alle Fälle von nicht-eitriger Enzephalomyelitis bei Katzen auf RusV zurückzuführen sind. RusV-Infektionen waren bei jenen Katzen am wahrscheinlichsten, die aus dem definierten endemischen geografischen Gebiet stammten, die Ataxie, Parese oder Bewegungsstörungen als auffälligste klinische Symptome zeigten und wenn die Krankheit in den 1990er Jahren auftrat. Ein einzelner Fall (57/10) trat jedoch außerhalb dieser Zeitperiode und mit atypischen klinischen Symptomen auf.

Mit dieser Studie konnten wir RusV als Erreger der „Staggering disease“ weiter untermauern und nachweisen, dass sporadische Fälle von RusV-infizierten Katzen in dem bereits beschriebenen Endemiegebiet in Ostösterreich während des gesamten Jahrzehnts der 1990er Jahre auftraten.

Bornavirus 1, das als mutmaßlicher Erreger der „Staggering disease“ bei Katzen in Schweden postuliert wurde, konnte mittels PCR und Immunhistochemie in allen Fällen ausgeschlossen werden.

Soweit wir heute wissen, ist RusV in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Tierarten zu infizieren, welche zu völlig unterschiedlichen Ordnungen gehören (*Carnivora*, *Diprotodontia*, *Perissodactyla*, *Rodentia*) [8,9]. In Analogie zu Bornaviren sollte ein mögliches zoonotisches Potenzial untersucht werden [19,20]. Es könnte von Interesse sein, nicht-eitrige Meningoenzephalitiden unbekannter Ätiologie beim Menschen auf das Vorhandensein von RusV zu testen.

5. Literaturverzeichnis

1. Kronevi, T.; Nordström, M.; Moreno, W.; Nilsson, P.O. Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nord. Veterinärmedicin* **1974**, *26*, 720–725.
2. Ström, B. Vingelsjuka hos katt. *Svensk Veterinärtidning* **1992**, *44*, 19–24.
3. Weissenböck, H.; Nowotny, N.; Zoher, J. Feline Meningoencephalomyelitis (“Staggering Disease”) in Österreich. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **1994**, *81* 195–201.
4. Lundgren, A.-L.; Czech, G.; Bode, L.; Ludwig, H. Natural borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *J. of Vet. Med. B* **1993**, *40*, 298–303, doi:10.1111/j.1439-0450.1993.tb00142.x.
5. Lundgren, A.-L.; Zimmermann, W.; Bode, L.; Czech, G.; Gosztonyi, G.; Lindberg, R.; Ludwig, H. Staggering disease in cats: Isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 2215–2222, doi:10.1099/0022-1317-76-9-2215.
6. Lundgren, A.-L.; Johannisson, A.; Zimmermann, W.; Bode, L.; Rozell, B.; Muluneh, A.; Lindberg, R.; Ludwig, H. Neurological disease and encephalitis in cats experimentally infected with Borna disease virus. *Acta Neuropathol.* **1997**, *93*, 391–401, doi:10.1007/s004010050630.
7. Nowotny, N.; Weissenböck, H. Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis (“staggering disease”) and studies of its etiology. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 1668–1669, doi:10.1128/jcm.33.6.1668-1669.1995.
8. Bennett, A.J.; Paskey, A.C.; Ebinger, A.; Pfaff, F.; Priemer, G.; Höper, D.; Breithaupt, A.; Heuser, E.; Ulrich, R.G.; Kuhn, J.H.; et al. Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature* **2020**, *586*, 424–428, doi:10.1038/s41586-020-2812-9.
9. Pfaff, F.; Breithaupt, A.; Rubbenstroth, D.; Nippert, S.; Baumbach, C.; Gerst, S.; Langner, C.; Wylezich, C.; Ebinger, A.; Höper, D.; et al. Revisiting rustrela virus – New cases of encephalitis and a solution to the capsid enigma; *Microbiol. Spectr.* **2021**, *10*, e0010322, doi:10.1128/spectrum.00103-22.
10. Voss, A.; Schlieben, P.; Gerst, S.; Wylezich, C.; Pfaff, F.; Langner, C.; Niesler, M.; Schad, P.; Beer, M.; Rubbenstroth, D.; et al. Rustrela virus infection – An emerging neuropathogen of red-necked wallabies (*Macropus rufogriseus*). *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 4016–4021, doi:10.1111/tbed.14708.
11. Matiassek, K.; Pfaff, F.; Weissenböck, H.; Wylezich, C.; Kolodziejek, J.; Tengstrand, S.; Ecke, F.; Nippert, S.; Starcky, P.; Litz, B.; et al. Mystery of fatal ‘staggering disease’ unravelled: Novel rustrela virus causes severe meningoencephalomyelitis in domestic cats. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 624, doi:10.1038/s41467-023-36204-w.
12. De Le Roi, M.; Puff, C.; Wohlsein, P.; Pfaff, F.; Beer, M.; Baumgärtner, W.; Rubbenstroth, D. Rustrela virus as putative cause of nonsuppurative meningoencephalitis in lions. *Emerg. Infect. Dis.* **2023**, *29*, 1042–1045, doi:10.3201/eid2905.230172.
13. Wang, F.; Flanagan, J.; Su, N.; Wang, L.-C.; Bui, S.; Nielson, A.; Wu, X.; Vo, H.-T.; Ma, X.-J.; Luo, Y. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14*, 22–29, doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
14. Weidinger, P.; Kolodziejek, J.; Khafaga, T.; Loney, T.; Howarth, B.; Sher Shah, M.; Abou Tayoun, A.; Alsheikh-Ali, A.; Camp, J.V.; Nowotny, N. Potentially zoonotic viruses in wild rodents, United Arab Emirates, 2019—A pilot study. *Viruses* **2023**, *15*, 695,

doi:10.3390/v15030695.

15. Schmidt, S.; Essbauer, S.S.; Mayer-Scholl, A.; Poppert, S.; Schmidt-Chanasit, J.; Klempa, B.; Henning, K.; Schares, G.; Groschup, M.H.; Spitzenberger, F.; et al. Multiple infections of rodents with zoonotic pathogens in Austria. *Vector-borne Zoonot. Dis.* **2014**, *14*, 467–475, doi:10.1089/vbz.2013.1504.
16. Weissenböck, H.; Bagó, Z.; Kolodziejek, J.; Hager, B.; Palmetzhofer, G.; Dürrwald, R.; Nowotny, N. Infections of horses and shrews with bornaviruses in Upper Austria: A novel endemic area of Borna disease. *Emerg. Microb. Infect.* **2017**, *6*, 1–9, doi:10.1038/emi.2017.36.
17. Dürrwald, R.; Kolodziejek, J.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. The bicolored white-toothed shrew *Crocidura leucodon* (HERMANN 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93659, doi:10.1371/journal.pone.0093659.
18. Hilbe, M.; Herrsche, R.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Zlinszky, K.; Ehrensperger, F. Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 675–677, doi:10.3201/eid1204.051418.
19. Schlottau, K.; Forth, L.; Angstwurm, K.; Höper, D.; Zecher, D.; Liesche, F.; Hoffmann, B.; Kegel, V.; Seehofer, D.; Platen, S.; et al. Fatal encephalitic Borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1377–1379, doi:10.1056/NEJMc1803115.
20. Niller, H.H.; Angstwurm, K.; Rubbenstroth, D.; Schlottau, K.; Ebinger, A.; Giese, S.; Wunderlich, S.; Banas, B.; Forth, L.F.; Hoffmann, D.; et al. Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999–2019: An epidemiological investigation. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 467–477, doi:10.1016/S1473-3099(19)30546-8.