

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Todesfälle

Im Zeitraum März 2001 bis März 2002 gab es unter den habituierten Schimpansen des Tai-Nationalparks insgesamt sieben Todesfälle, die in Rahmen dieser Studie detailliert untersucht werden konnten. Auf diese sieben Fälle soll in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen werden. Die Laboranalysen bezogen zudem Proben von vor 2001 und nach März 2002 verstorbenen Schimpansen ein. Eine Übersicht der Todesursachen findet sich in Tabelle 25 (Ende Ergebnisteil).

#### 4.1.1 Kady

Die Schimpansin Kady (ca. 30 Jahre) zeigte im Laufe des Jahres 2001 drei klinische Phasen eines chronischen Krankheitsgeschehens. Die Phasen waren generell charakterisiert durch flache Atmung, trockenen Husten und allgemeine Schwäche. Zwischen den Krankheitsphasen war Kady in der Lage, der Gruppe zu folgen und nahm am sozialen Leben teil. Da sie gegen Ende der ersten Phase (ca. 11. bis 22. März 2001) so schwach wurde, dass sie abends nicht mehr in die Bäume klettern und ein Schlafnest bauen konnte, wurden 4 ml eines Langzeit-Antibiotikums (Extencilline) per Blasrohr und Injektionspfeil verabreicht. Bereits am folgenden Tag zeigte sie eine erhebliche Besserung und baute wieder Schlafnester in die Bäume. Auch die vor Verabreichung zahlreich aufgetretenen Fliegen, die das Tier umschwirrten, waren verschwunden. Fliegen scheinen schon vor Verenden von Lebewesen durch bestimmte Duftstoffe angezogen zu werden und können sich in großer Zahl um die betroffenen Tiere herum sammeln (Lang und Löscher, 2000).

Die zweite Phase (4. bis 19. Juli 2001) verlief mit vergleichsweise milden Symptomen, wobei Kady sich ohne medizinische Hilfe nach 15 Tagen erholte.

Die letzte Phase begann am 13. November und endete mit dem Tode des Tieres am 11. Dezember 2001. Während der letzten 10 Tage ihres Lebens zeigte Kady zunehmend Anzeichen von Schwäche, wobei sie die letzten 5 Tage auf dem Waldboden schlief und zunehmend eher auf den Handgelenken statt den Fingerknöcheln lief. Die Anzeichen peripherer Ödeme wurden durch ein zunehmend dickes Abdomen bestätigt, welches sich in der Autopsie als durch Aszites-Flüssigkeit verursacht erwies. Ebenfalls ab dem 5. Tag vor Eintritt des Todes waren erneut zahlreiche Fliegen um das Tier herum zu beobachten.

Kady starb am Morgen des 11. Dezember 2001, die **Autopsie** wurde im so genannten „Südcamp“ durchgeführt und dauerte ca. 6 Stunden. Sie wog zum Todeszeitpunkt 29 kg und war

## Ergebnisse

in einem hochgradig kachektischen Zustand. Hauptbefunde der pathologischen Untersuchung waren ein hochgradiger Aszites mit ca. 2 Liter einer klaren, gelben, schäumenden Flüssigkeit. Die Unterhaut der Arme und Beine war hochgradig ödematisiert. Weitere Hauptbefunde ließen sich im Brustraum erheben; hier wurden großflächige Verwachsungen des Herzbeutels mit der Serosa der Lungen und des Zwerchfells sichtbar. Weitere fibrinöse Verwachsungen waren zwischen der Serosa der Lungen und dem Brustfell vorhanden. Die Herzwände wiesen einen Durchmesser von 1,5 cm für die linke Kammer, 1,0 cm für das Septum und 0,5 cm für die rechte Herzkammerwand auf. Die Leber war stark blutgefüllt. Auch die Gallenblase war hochgradig gestaut, so dass auch die Gallengänge im Portalbereich mit Galle angefüllt waren. Die Milzkapsel war punktuell mit der Bauchdecke verwachsen und zeigte stellenweise eine leicht getrübe, verdickte Kapsel. Alle weiteren Organe waren ohne besonderen pathologischen Befund. Von allen Organen wurden Proben genommen und in Flüssigstickstoff, 4%igem bzw. 10%igem Formalin sowie teilweise auch in RNA-later (Qiagen®) und 90%igem Alkohol konserviert (siehe Material und Methoden, Tabelle 4).

### 4.1.2 Leo und Noah

Leo war zum Zeitpunkt seines Todes ca. 29 Jahre alt und das höchstrangige Männchen der Mittel-Gruppe, Noah ein juveniles Männchen, 7 Jahre alt.

Am Morgen des 13. Februar 2002 wurde Noah tot auf einem Baumstamm liegend aufgefunden, nicht weit von dem Ort entfernt, an dem die Gruppe am Abend vorher die Schlafnester gemacht hatte. Noahs Mutter, aber auch alle anderen Schimpansen der Gruppe berührten den Kadaver und sammelten von Zeit zu Zeit die reichlich vorhandenen Fliegeneier vom Körper ab und fraßen diese. Nachdem sich die Mitglieder der Gruppe entfernt hatten, wurde der Kadaver in mehrere Müllsäcke verpackt zum Süd-Camp transportiert und dort autopsiert (Dauer ca. 4 Stunden).

Noah wog zum Zeitpunkt des Todes 12,4 kg. Eine Totenstarre konnte nicht festgestellt werden. Eine fehlende Totenstarre ist entweder auf einen sehr frischen Kadaver oder aber auf eine inzwischen durch Autolyse wieder aufgehobene Totenstarre zurückzuführen. Auch bei Tod durch bestimmte Erreger wie *B. anthracis* fehlt eine Totenstarre. Äußerlich war die lilafarbene Gesichtsfärbung auffällig, und es waren keine Anzeichen einer Verletzung zu sehen. Erste Befunde ließen sich nach Eröffnung der Bauchhöhle erheben; hier war eine auffällig starke Blutfülle der Gefäße des Netzes sowie der verschiedenen Darmabschnitte zu sehen. Vor allem der Dünndarm und die Bauchspeicheldrüse waren zusätzlich von einer kräftig dunkelroten Grundfärbung. Die Darmlymphknoten waren teilweise schwarz gefärbt und wie alle übrigen Lymphknoten vergrößert (bis zu 2 cm Länge und 1 cm Breite). Leber und Milz waren beide stark blutgefüllt und die Leber zeigte eine deutliche Läppchenzeichnung. Kleinere Blutungen waren zu sehen, die sich fingerförmig auf dem Zwerchfell darstellten. Blutungen wa-

ren auch auf und in der Lunge als diffus rote Bereiche sichtbar, wobei hier auch weiße diffus-emphysematöse Veränderungen festzustellen waren. Das Blut im Herzen war geronnen. Die übrigen Organe einschließlich Klein- und Großhirn waren unauffällig, wobei eine genauere Beurteilung aufgrund des autolytischen Zustandes des Tieres nicht möglich war. Eine Liste der gewonnenen Gewebeproben ist oben in Tabelle 4 (S. 16) aufgeführt.

Am nächsten Vormittag (14. Februar 2002) verstarb Leo. Er würgte, setzte und legte sich häufig hin, fraß einige Früchte, die er jedoch kurz darauf wieder erbrach. Dies ging im Wechsel über ca. 3 Stunden, wobei er gegen Ende noch einmal einen kleinen Baum erkletterte, kurz darauf jedoch zu Boden fiel und starb. Bob und Nadesh, zwei weitere Mitglieder der Gruppe, berührten den toten Leo und fraßen die inzwischen auf seinem Fell abgelegten Fliegenier; auch Yessika, das zweite Weibchen der Gruppe, war zugegen.

Die **Autopsie** von Leo wurde an dem Ort durchgeführt, an dem er verstorben war. Aufgrund des hochgradig akuten Krankheitsbildes und des Versterbens von Noah am Vortag und der Tatsache, dass an Noah eine detaillierte Autopsie und Probensammlung durchgeführt wurde, wurden von Leo nur die wichtigsten Organe beurteilt und Proben genommen (Tabelle 4), da von einem Infektionsgeschehen ausgegangen werden musste, dessen Ursache unbekannt war. Das pathologische Bild entsprach demjenigen, das bei Noah beobachtet wurde. Auch bei Leo waren eine starke Blutfülle der Gefäße des Netzes und der verschiedenen Darmabschnitte sowie eine starke Rötung der Dünndarmabschnitte auffällig. Alle untersuchten Lymphknoten (Darmlymphknoten, Leistenlymphknoten, Unterarmlymphknoten) waren vergrößert und Milz sowie Leber stark blutgefüllt. Lunge und Zwerchfell zeigten stellenweise Blutungen und weiße Bereiche.

#### **4.1.3 Dorry, Gargantuan, Gisèle und Goma**

Dorry, Gargantuan, Gisèle und Goma hatten sich am 15. Oktober 2001 von der Hauptgruppe getrennt und waren ohne menschliche Beobachtung. Am 20. Oktober 2001 wurde zunächst der Kadaver von Dorry gefunden, kurz darauf die Arme und Beine von Gisèle und Gargantuan, von letzterem Tier konnte auch der Schädel gefunden werden. Das Skelett von Goma wurde sechs Wochen später ca. 200 m vom Fundort der übrigen drei Tiere entfernt entdeckt. Alle vier Schimpansen waren zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung augenscheinlich gesund und zeigten weder Anzeichen von Schwäche noch sonstige Symptome.

Eine pathologische Beurteilung der Kadaver war nicht möglich, da die Tiere seit ca. 2 Tagen tot waren, als sie aufgefunden wurden. Zusätzlich hatten vermutlich ein oder mehrere Leoparden die Schimpansen angefressen, so dass von Gargantuan und Gisèle nur noch Arme und Beine gefunden wurden. Der einzige relativ vollständige Kadaver war der von Dorry; bei ihr fehlten nur der Hals und Teile des Gesichts.

## Ergebnisse

Trotz fortgeschrittener Autolyse (Abbildung 5) wurde eine komplette Autopsie des Tieres Dorry im Nord-Camp durchgeführt und Proben von allen Organen entnommen. Von Gargantuan und Gisèle war nur eine Probennahme von peripheren Geweben möglich (Tabelle 4).

Abbildung 5:  
Kopf und Oberkörper der Schimpansin Dorry, ca. 2 Tage *post mortem*. Hals und Teile der rechten Gesichtshälfte fehlen, andere Bereiche sind durch Fliegenmaden und Autolyse bloßgelegt.  
Foto: F.H. Leendertz



### 4.2 Histologische Untersuchung

Die histologische Beurteilung der Gewebeschnitte wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Mätz-Rensing, Abteilung Infektionspathologie des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) in Göttingen, durchgeführt. Die Dünnschnitte und Färbungen wurden von Mitarbeitern des DPZ angefertigt und anschließend unter Anleitung von Frau Dr. Mätz-Rensing begutachtet.

#### 4.2.1 Kady

Die histologische Beurteilung der **Leber** zeigte eine hochgradige Dilatation der Zentralvenen, eine beginnende Fibrosierung der Parenchymzellen im Randbereich der Zentralvenenanteile, eine hochgradige Ablagerung von Gallezylindern im Bereich der dilatierten Sinusoiden, fokale Blutungen und eine multifokal herdförmig beginnende Ausbildung von Nekroseherden, in denen sich kleinere Blutseen bildeten, diffus im gesamten Leberparenchym verteilt. Außerdem kamen Einzelzellnekrosen vor sowie geringgradige lymphozytäre Entzündungszellinfiltrate im Bereich der Portalfelder.

Die **Milz** zeigte eine geringgradige Kapsel­fibrose und war inaktiv (keine Follikelbildung).

In Gewebeschnitten der **Lunge** war eine geringgradige interstitielle Pneumonie unter Ausbildung einer gemischtzelligen Entzündungszellinfiltration aus Lymphozyten, Plasmazellen und einzelnen eosinophilen Granulozyten sowie eine hochgradige Alveolarhistiozytose unter Ansammlung von teilweise mehrkernigen Makrophagen mit hochgradigen Pigmentakkumulatio-

nen zu sehen. Die Berliner-Blau-Färbung zum Nachweis von Eisen war positiv (Herzfehlerzellen), wobei eine geringgradige Arteriopathie kleiner und mittlerer Lungengefäße sichtbar war, charakterisiert durch Media- und Intimahyperplasie, teilweise mit beetartiger Intimavorwölbung (Abbildungen 6–9). Fokal konnten geringgradige alveoläre Blutungen und ein fokal geringgradiges alveoläres Ödem nachgewiesen werden. Das Gesamtbild entsprach dem einer chronischen Stauungslunge.

Das **Herz** zeigte eine fokal herdförmig geringgradig interstitielle fibrosierende Myokarddegeneration. Fokal herdförmig konnten einzelne lymphozytäre Entzündungszellen (Ausdruck einer geringgradigen reaktiven Myokarditis) sowie fokal herdförmig frische Blutungen beobachtet werden.

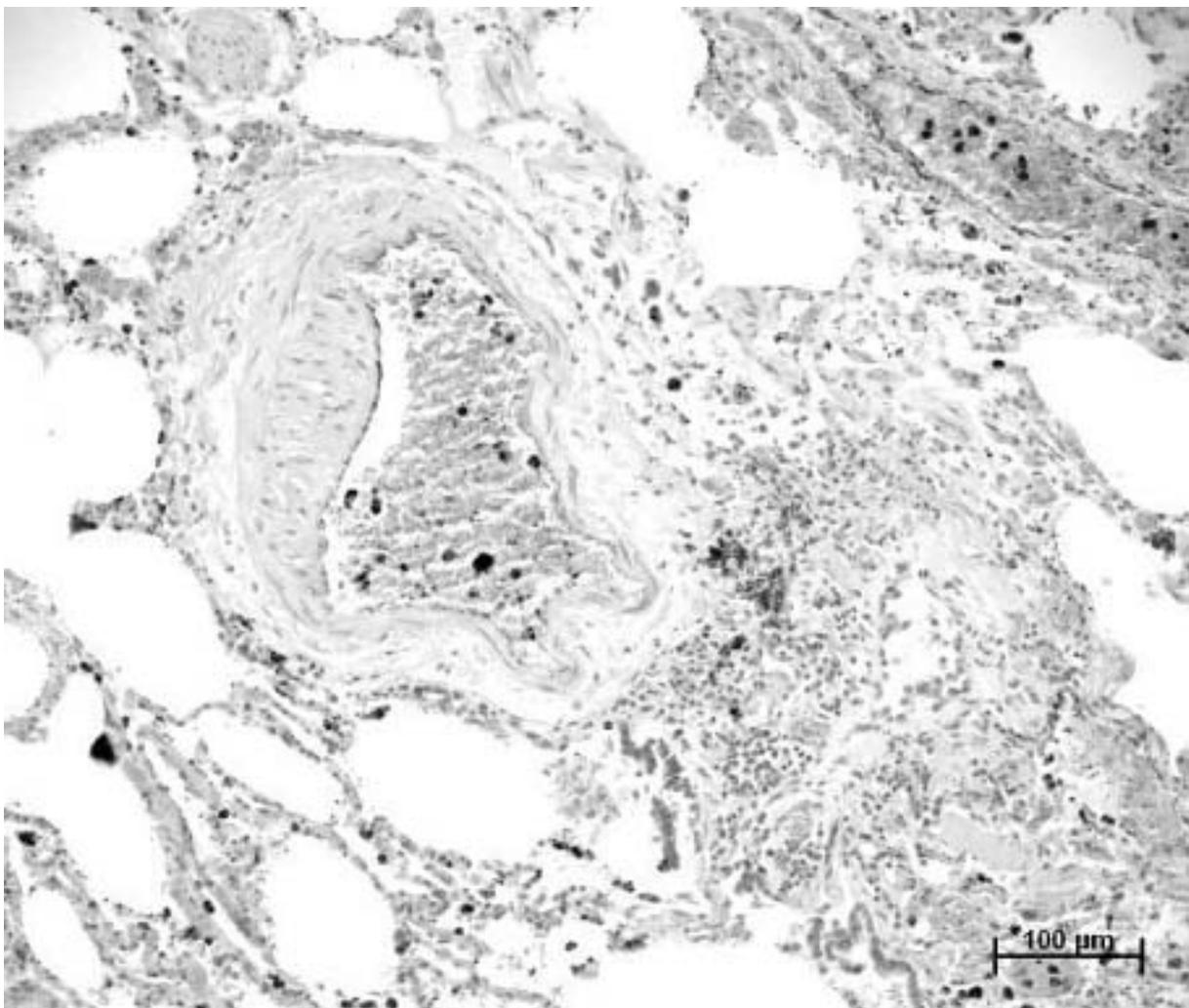


Abbildung 6: Lunge des Tieres Kady. Positiver Eisennachweis in Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelien. Berliner-Blau-Färbung. (Foto: K. Mätz-Rensing)

## Ergebnisse

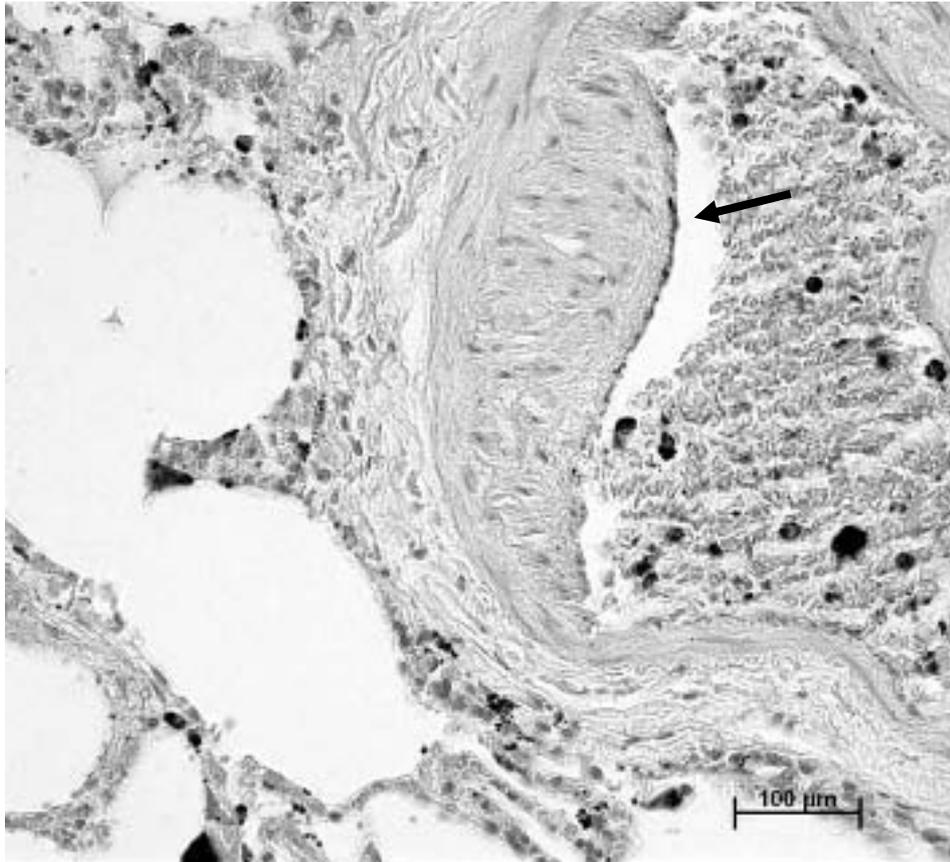


Abbildung 7: Lunge des Tieres Kady. Positiver Eisennachweis in Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelien. Der Pfeil zeigt auf die Gefäßsklerose mit beetartiger Vorwölbung der Gefäßwand (Hinweis auf Hypertonie des kleinen Kreislaufes infolge Herzinsuffizienz). Berliner-Blau-Färbung. (Foto: K. Mätz-Rensing)

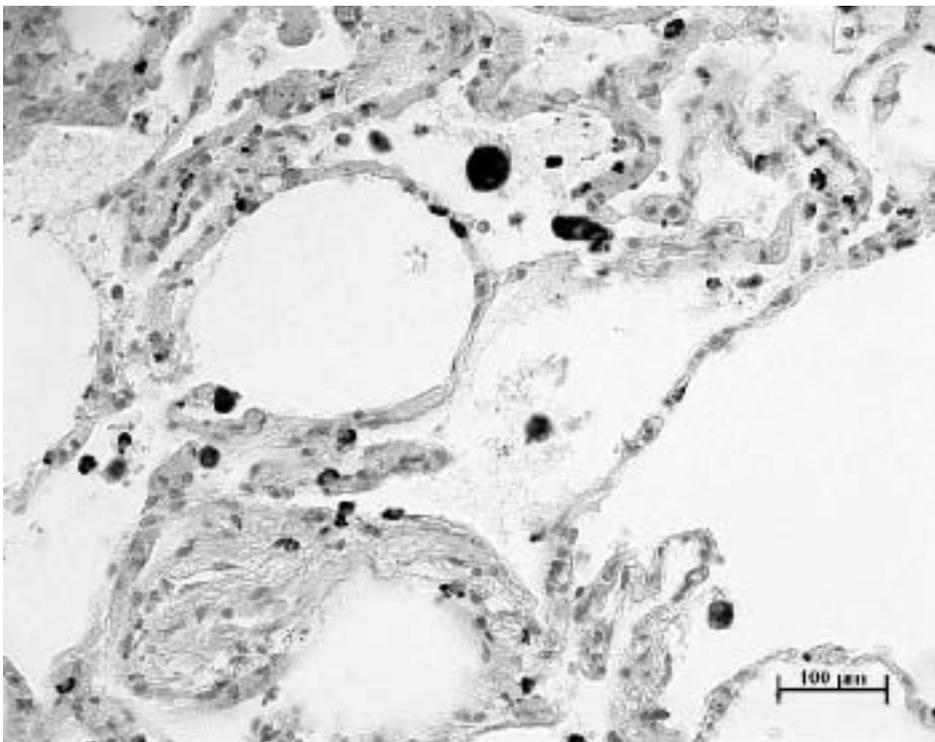


Abbildung 8: Lunge des Tieres Kady. Positiver Eisennachweis in Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelien. Berliner-Blau-Färbung. (Foto: K. Mätz-Rensing)

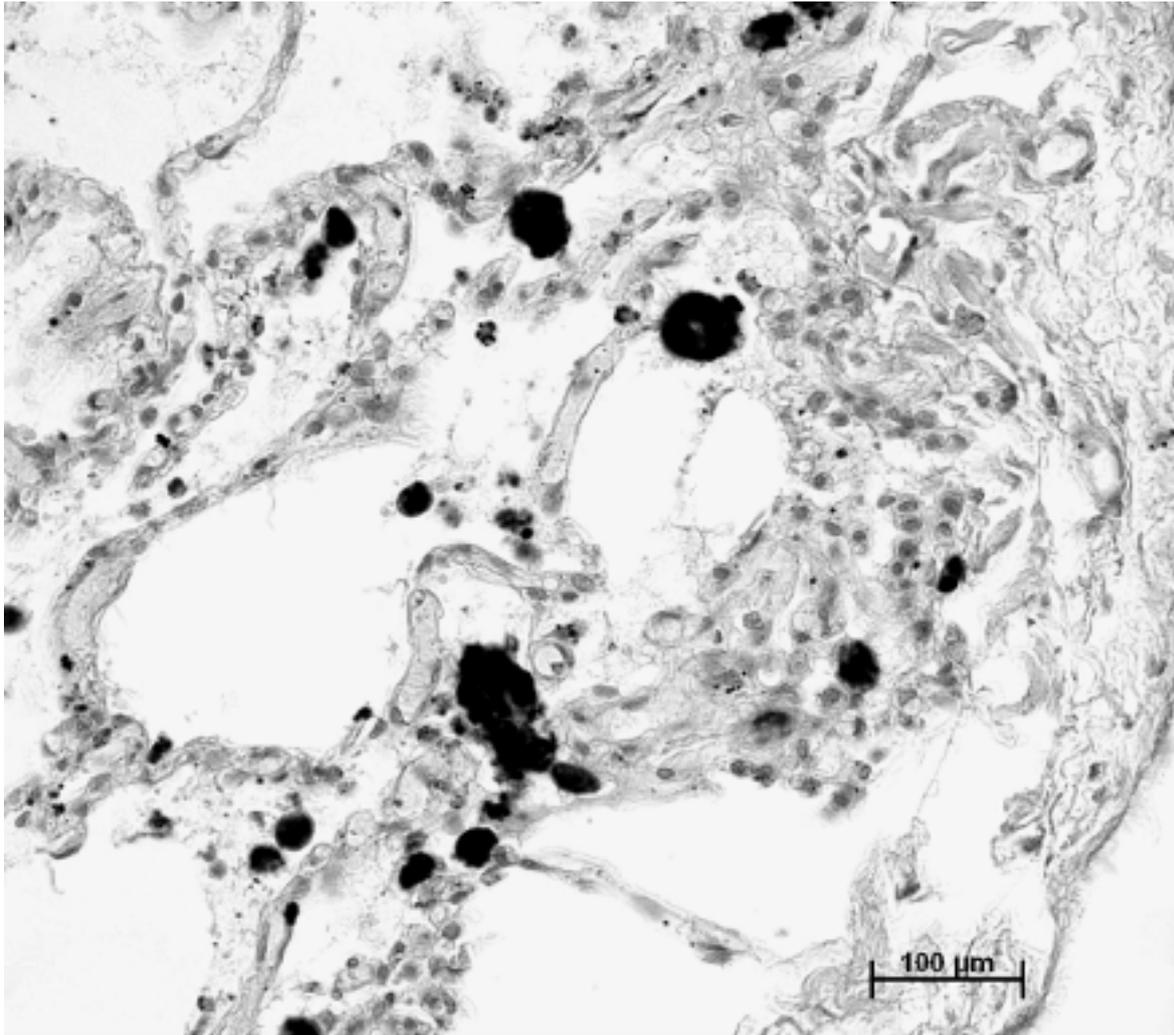


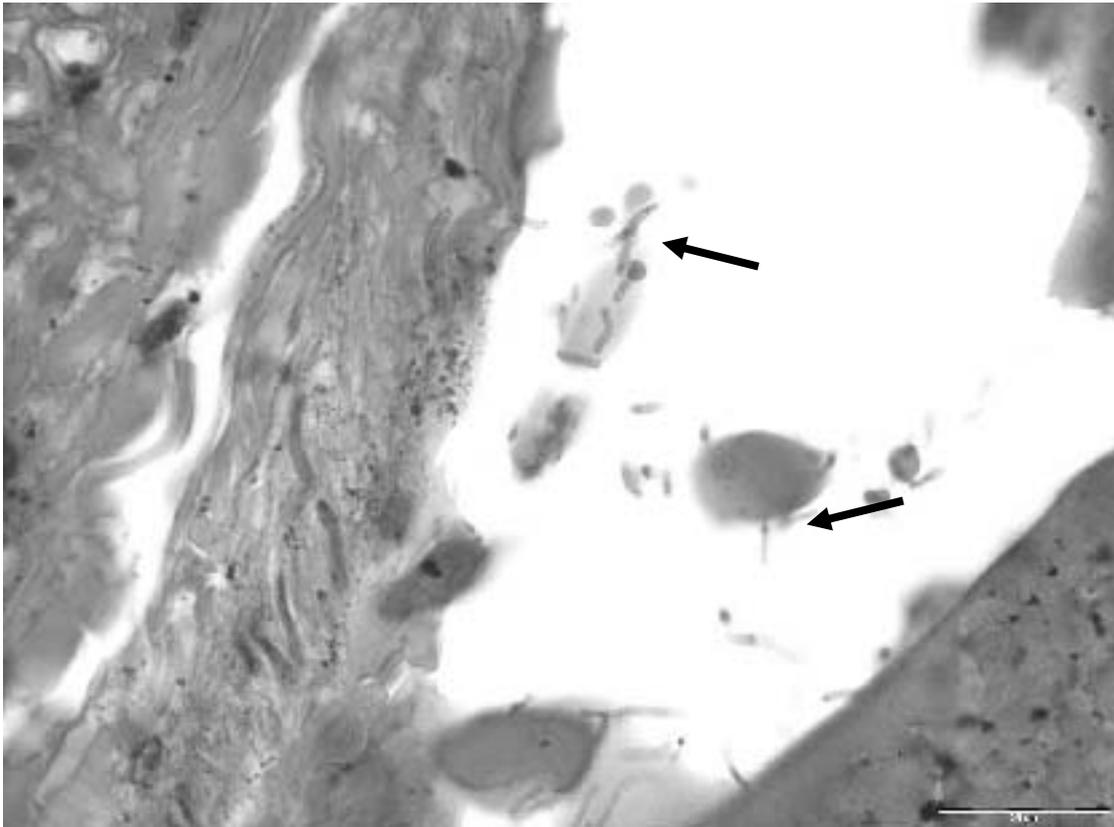
Abbildung 9: Lunge des Tieres Kady. Positiver Eisennachweis in Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelien. Berliner-Blau-Färbung. (Foto: K. Mätz-Rensing)

#### 4.2.2 Leo und Noah

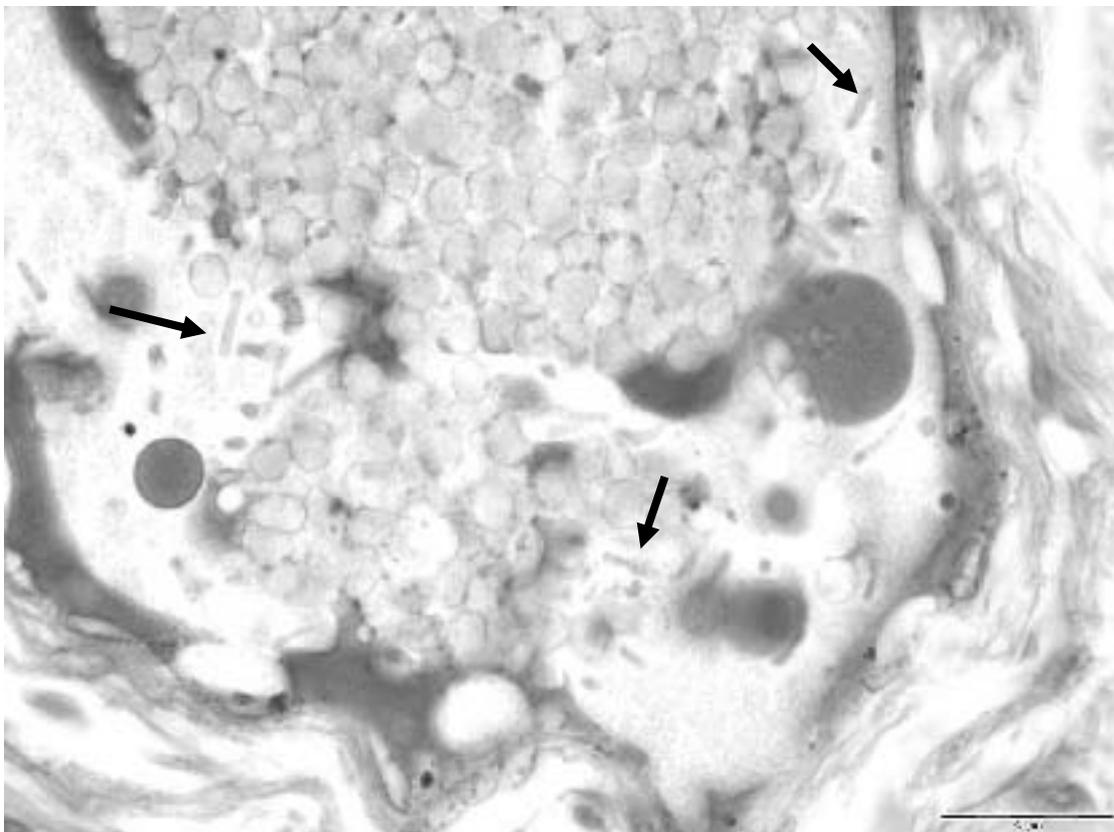
Aufgrund des geringeren Autolysegrades des Tieres Leo beziehen sich die hier gezeigten Befunde vor allem auf Proben von diesem Individuum, wobei alle beobachteten Veränderungen prinzipiell auch in den Proben des Tieres Noah gesehen werden konnten.

**Allgemein:** In allen Organen sowie intravasal war eine hochgradige Besiedlung mit stäbchenförmigen Bakterien zu beobachten (Abbildungen 10 und 11). Diese wurden zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung als postmortale Kontamination mit Fäulnis- oder Umweltkeimen angesehen.

## Ergebnisse



**Abbildung 10:** Lungengewebe des Tieres Leo. Die Pfeile zeigen auf die stäbchenförmigen Bakterien. HE-Färbung.



**Abbildung 11:** Lungengewebe des Tieres Leo: Die Pfeile zeigen auf die intravaskulär vorhandenen stäbchenförmigen Bakterien. HE-Färbung.

Die **Leber** war geprägt durch eine hochgradige Dissoziation der Leberzellbalken, Dilatation der Gefäße und diffuse Hyperämie. Fokal wurden Einzelzellnekrosen und herdförmig geringgradige interstitielle Blutungen nachgewiesen.

Die **Milz** war hochgradig diffus hyperämisch und zeigte fokal herdförmig geringgradige Blutungen.

In der **Lunge** konnte eine hochgradige diffuse Hyperämie, fokal herdförmig hochgradige interstitielle und intraalveoläre Blutungen sowie ein multifokal herdförmiges alveoläres Emphysem und eine fokal herdförmig geringgradige chronische fibroblastische Pleuritis nachgewiesen werden.

In den **Magenproben zeigte sich** eine geringgradige chronisch-aktive Gastritis unter Ausbildung einer gemischtzelligen Entzündungszellinfiltration mit Beteiligung von eosinophilen Granulozyten und eine mittelgradige gemischtzellige Perivaskulitis im Bereich der *Lamina muscularis* unter Beteiligung von zahlreichen eosinophilen Granulozyten.

Eine hochgradige diffuse Hyperämie und eine geringgradige chronisch-aktive Enteritis unter Ausbildung eines gemischtzelligen Entzündungszellinfiltrates mit Beteiligung von eosinophilen Granulozyten waren im **Dünndarm** zu sehen.

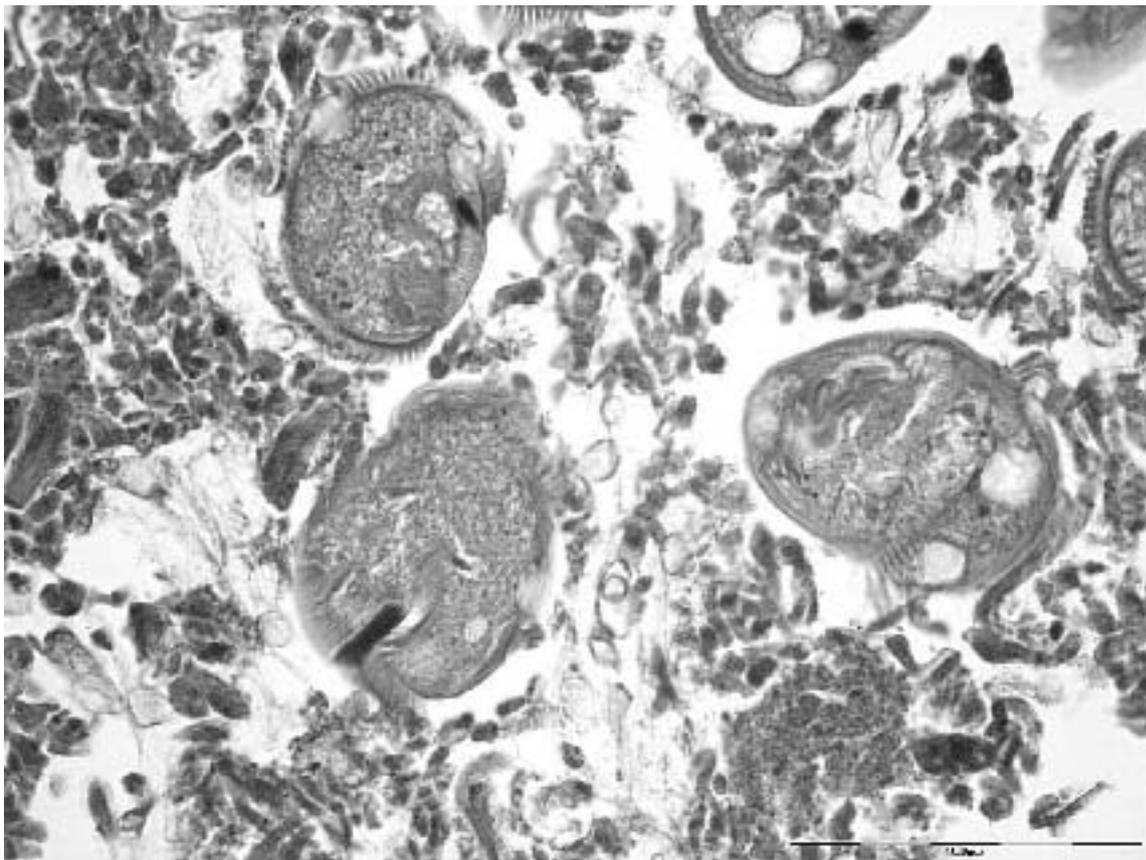


Abbildung 12: Parasitenanschnitte (Balantidien) und gemischtzelliges Entzündungsinfiltrat im oberflächlichen Epithel des Dickdarms von Leo. HE-Färbung.

## Ergebnisse

Im Bereich des **Dickdarms** war die Enteritis hochgradig und chronisch aktiv. Gemischtzellige Entzündungszellinfiltrate waren in der *Lamina mucosa* und *Lamina muscularis* zu sehen. Im oberflächlichen Epithel konnten zahlreiche Protozoenstadien (Balantidien, Amöben) (Abbildung 12) sowie einige Helminthenanschnitte nachgewiesen werden.

Der **Pankreas** zeigte eine fokal herdförmig beginnende nekrotisierende Pankreatitis mit einer geringgradigen bis mittelgradigen perivaskulär lymphozytären bis lymphoplasmazellulären Entzündungszellinfiltration, sowie hochgradige Hyperämie und fokale geringgradige Blutungen.

Alle untersuchten **Lymphknoten** zeigten eine mittelgradige bis teilweise hochgradige folliculäre Hyperplasie.

### 4.2.3 Dorry, Gargantuan und Gisèle

Eine histologische Beurteilung der Gewebeproben war aufgrund des stark autolytischen Zustandes der Kadaver nicht möglich.

## 4.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Die molekularbiologischen Untersuchungen befassten sich sowohl mit dem Vorkommen von chronischen oder latenten Krankheitserregern bei den Schimpansen als auch mit Erregern, die akute oder perakute Krankheiten hervorrufen können.

### 4.3.1 Chronische Krankheitserreger

Chronische oder auch latente Krankheitserreger wirken permanent auf den Organismus ein und können eine Schwächung des betroffenen Tieres bewirken. Die Erreger können sowohl einen negativen Einfluss auf die Widerstandskraft gegenüber Sekundärinfektionen als auch auf die Schwere der Symptomatik haben. Die Untersuchung von latent bzw. chronisch vorkommenden Erregern kann dazu beitragen, Erkrankungen und Krankheitsverläufe besser zu verstehen.

#### 4.3.1.1 Simianes T-Zell-lymphotropes Virus Typ 1 (STLV-1) und Simianes Immundefizienz-Virus (SIV)

Das Vorkommen von STLV und SIV bei wild lebenden oder aus der freien Wildbahn stammenden Schimpansen ist in der Literatur beschrieben (u.a. Seiki et al., 1984; Saksena et al., 1994; Chen et al., 1995; Gao et al., 1999; Slattery et al., 1999; Salemi et al., 2000; Mahieux et al., 2000; Nerrienet et al., 2001; Peeters et al., 2002; Santiago et al., 2002; Bailes et al., 2003). Obwohl weder eine Infektion mit STLV noch mit SIV einen direkten Einfluss auf die Gesundheit von Schimpansen zu haben scheint, ist eine Rolle dieser Erreger in einem mul-

tifaktoriellen Krankheitsgeschehen nicht auszuschließen, zumal STLV-spezifische Symptomatiken bei Pavianen, Makaken und grünen Meerkatzen beschrieben wurden (Gleiser et al., 1984; McCarthy et al., 1990; Jayo et al., 1990; Voevodin et al., 1996; McGinn et al., 2002). STLV<sub>sm</sub> wurde bei Rauchmangaben nachgewiesen (Fultz et al., 1986, 1990, 1997, 1999), von denen jedoch nicht bekannt ist, woher sie stammen. Rauchmangaben gibt es auch im Tai-Nationalpark. Bei nachweislich direkt aus dem Forschungsgebiet stammenden Roten Stummelaffen wurde das SIV<sub>wrc</sub> und bei Olivgrünen Stummelaffen das SIV<sub>olic</sub> beschrieben (Cournaud et al., 2003).

#### 4.3.1.1.1 Nachweis von STLV-1/2- und SIV-Antikörpern in Blutproben

Die Möglichkeit, mit Hilfe serologischer Teste, die für die Diagnostik beim Menschen etabliert sind, Antikörper auch in Blutproben von Schimpansen nachzuweisen, ist in der Literatur sowohl für SIV als auch für STLV beschrieben (z.B. Saksena et al., 1994; Georges-Courbot et al., 1996; Cournaud et al., 2003).

Die serologischen Untersuchungen auf STLV wurden mit Hilfe des HTLV-1/2 ELISA (HTLV-1/2 ELISA, Murex® Biotech Ltd., Dartford, UK) und des Bestätigungstests HTLV-1/2 Western Blot (HTLV-1/2 Western Blot Version 2.4; Genelabs Diagnostics® PTE Ltd, Singapore) durchgeführt. Zur Feststellung des Vorkommens von Antikörpern gegen SIV kamen die Antikörper-Suchteste HIV-1/2-ELISA (BioRad) und HIV-1/2-ELISA (Murex) sowie zur Bestätigung die Western Blots New LAV-Blot II (Sanofi) und HIV-Blot 2.2 (Genelabs) zum Einsatz. Für alle Nachweisverfahren wurde Vollblut bzw. Leichenblut von den Schimpansen und Roten Stummelaffen in Anlehnung an die Anweisungen des Herstellers eingesetzt und ausgewertet. Die einzigen Blutproben von zum Zeitpunkt der Probensammlung noch lebenden Schimpansen wurden von Bob und Zora gesammelt (siehe Material und Methoden). Sera von drei weiteren Roten Stummelaffen wurden am *Institut de Recherche pour le Developpement* (IRD) in Montpellier auf STLV getestet und in die Analysen mit einbezogen. Sieben der zwölf Schimpansen und vier Rote Stummelaffen wiesen Antikörper gegen STLV-1 auf. Obwohl mit Hilfe des HIV-1/2-ELISA von Murex drei Proben von Schimpansen als reaktiv und drei weitere Proben als fraglich befunden wurden, konnte dies weder im HIV-1/2-ELISA von Biorad noch den beiden verwendeten Western Blots bestätigt werden. Unter den untersuchten Roten Stummelaffen waren Proben des Tieres 2/02 fraglich reaktiv im HIV-1/2-ELISA von Murex. Die Ergebnisse im Einzelnen sind in Tabelle 14 zusammengefasst; weitere Details zu den Reaktivitäten finden sich im Anhang 8.1 und 8.2.

#### 4.3.1.1.2 Nachweis von STLV-1/2-Antikörpern in Urinproben

Da 10 der 12 Schimpansenproben von Tieren stammten, die in freier Wildbahn verstarben, und bei 7 von 8 der erwachsenen Schimpansen STLV-Antikörper nachgewiesen wurden,

## Ergebnisse

stellte sich die Frage, ob das Vorkommen von STLV bei den verstorbenen Tieren ungewöhnlich häufig ist oder ob auch klinisch unauffällige Tiere mit STLV infiziert sind. Die Gruppenmitglieder zu narkotisieren, um Blutproben nehmen zu können, würde jedoch das natürliche Verhalten und die Unbefangenheit Menschen gegenüber und damit die Verhaltensforschung gefährden und zudem ein großes Risiko für die Tiere bedeuten. Um dies zu vermeiden, musste ein so genannter nicht-invasiver Test zum Nachweis von Antikörpern gegen STLV in Urinproben etabliert werden. Die Möglichkeit des Nachweises von Antikörpern in Urinproben wurde bereits für SIV bei Schimpansen beschrieben (Santiago et al., 2002).

Zum Nachweis von Antikörpern gegen STLV in Urinproben wurde der HTLV-1/2-Blot Version 2.4 eingesetzt. Mit Hilfe von Urinproben von serologisch positiven und negativen Tieren wurde der Test validiert. Zur Validierung des Tests standen sowohl Proben von wilden Schimpansen als auch solche von in Zoos lebenden Schimpansen zur Verfügung.

Der Infektionsstatus der Tiere, deren Seren zur Testetablierung und Validierung eingesetzt wurden, wurde entweder serologisch oder mit Hilfe des STLV-1-Genomnachweises (PCR) bestimmt. Insgesamt standen 21 Urinproben von Tieren mit bekanntem Infektionsstatus zur Verfügung, bei den Zootieren war nur DNS (und von einem Tier auch Serum) zur Ermittlung des STLV-1-Infektionsstatus vorhanden. Tabelle 15 fasst die untersuchten Proben zusammen.

**Tabelle 14:** Zusammenfassung der serologischen Untersuchungen auf SIV und STLV

Primaten	HIV-ELISA		HIV Western Blot		Bewertung	STLV-ELISA	STLV Western Blot	Bewertung
	HIV-1/2 Biorad	HIV-1/2 Murex	NewLav Sanofi	HIV-1/2 Genelabs		STLV-1/2 Murex	STLV-1/2 Genelabs	
Kady	neg	neg	neg	neg	neg	reaktiv	reaktiv	pos
Leo	neg	neg	neg	neg	neg	reaktiv	reaktiv	pos
Noah	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg
Bob*	neg	reaktiv		neg	neg	reaktiv	reaktiv	pos
Dorry	neg	(reaktiv)	neg		neg	reaktiv	reaktiv	pos
Loukoum			neg	neg	neg	reaktiv	reaktiv	pos
Leonardo			neg	neg	neg	neg	neg	neg
Lefkas	neg	reaktiv		neg	neg	neg	neg	neg
Rafiki	neg	(reaktiv)		neg	neg	reaktiv	reaktiv	pos
Tita	neg	reaktiv		neg	neg	negativ	negativ	neg
Olduvai			neg	neg	neg	neg	neg	neg
Zora*				neg	neg	reaktiv	reaktiv	pos
2/02	neg	(reaktiv)		neg	neg	reaktiv	reaktiv	pos
3/02		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9/96**							reaktiv	pos
14/97**							reaktiv	pos
4/98**							reaktiv	pos

pos = positiv, neg = negativ, (reaktiv) = schwach reaktiv; \* Blutproben von lebenden Tieren.

\*\* Proben serologisch getestet von M. Peeters, IRD, Montpellier; Tiere mit Namen sind Schimpansen, Tiere mit Nummern Rote Stummelaffen; ist kein Testergebnis angegeben, so wurde die entsprechende Untersuchung nicht durchgeführt

**Tabelle 15:** Vorhandene Proben zur Etablierung des Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern gegen STLV-1 in Urinproben

Anzahl und Herkunft der Schimpansen	Ermittlung des Infektionsstatus		Anzahl
	DNS (PCR)	Blutproben (Serologie)	Urinproben
5 wild <sup>1</sup> positiv	4/4 positiv	5/5 positiv	14
1 wild negativ	1/1 negativ	1/1 negativ	1
5 Gefangenschaft <sup>2</sup>	5/5 negativ	1/1 negativ	6

<sup>1</sup> Drei Wild-Schimpansen, die in den Jahren 2001–2002 im Tai-Nationalpark verstorben sind, sowie 2 Schimpansen, die nach Kämpfen geblutet haben

<sup>2</sup> Schimpansen in deutschen Zoos.

Zur Feststellung des optimalen Verhältnisses von Urin zu Blotpuffer wurde der Urin zuerst in verschiedenen Konzentrationen, d.h. unverdünnt, 1 : 2 und 1 : 100 in Blotpuffer verdünnt und auf die Teststreifen gegeben. Bei unverdünntem Urin waren viele „unspezifische“ Bindungsreaktionen zu beobachten (teilweise schwarze Blotstreifen), bei der Verdünnung 1 : 100 war die Reaktion sehr schwach. Bei der Verdünnung 1 : 2 waren bei den Urinproben von seropositiven Tieren distinkte Banden zu erkennen und die Hintergrundreaktion war weniger stark ausgeprägt. Aus diesem Grund wurden die Urinproben in dieser Verdünnung zur Untersuchung eingesetzt. Aufgrund der begrenzten Menge an Urin pro Individuum und Sammelzeitpunkt wurde anders als im Standard-Protokoll ein Endvolumen von 1 ml eingesetzt (0,5 ml Urin + 0,5 ml Blotpuffer), wobei durch im RKI vorhandene, speziell angefertigte engere Inkubationsgefäße eine vollständige Bedeckung der Teststreifen mit dem reduzierten Flüssigkeitsvolumen erreicht wurde. Die Inkubationsschalen wurden mit selbstklebender Folie verschlossen, über Nacht auf einem Kippschüttler inkubiert und anschließend entsprechend der Anweisungen des Herstellers gewaschen und mit dem zweiten Peroxidase-markierten Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Antikörperbindung durch die Enzymreaktion. Die Dauer der Substratinkubation wurde jedoch auf eine Stunde verlängert.

Als positiv wurden Proben bewertet, die auf dem Teststreifen Banden gegen die zwei Hüllproteine rgp-46-I und GD21 sowie mindestens einem internen Protein (p19 und/oder p24) aufwiesen. Teststreifen, die ausschließlich Reaktionen gegen Hüll- oder interne Proteine aufwiesen, wurden als fraglich, solche mit Reaktionen nur gegen die Serum-Kontrollbande als negativ gewertet. Dieser Algorithmus entspricht den Empfehlungen des HTLV European Research Network (HERN) for Seroepidemiological Studies (Goubau et al., 1996).

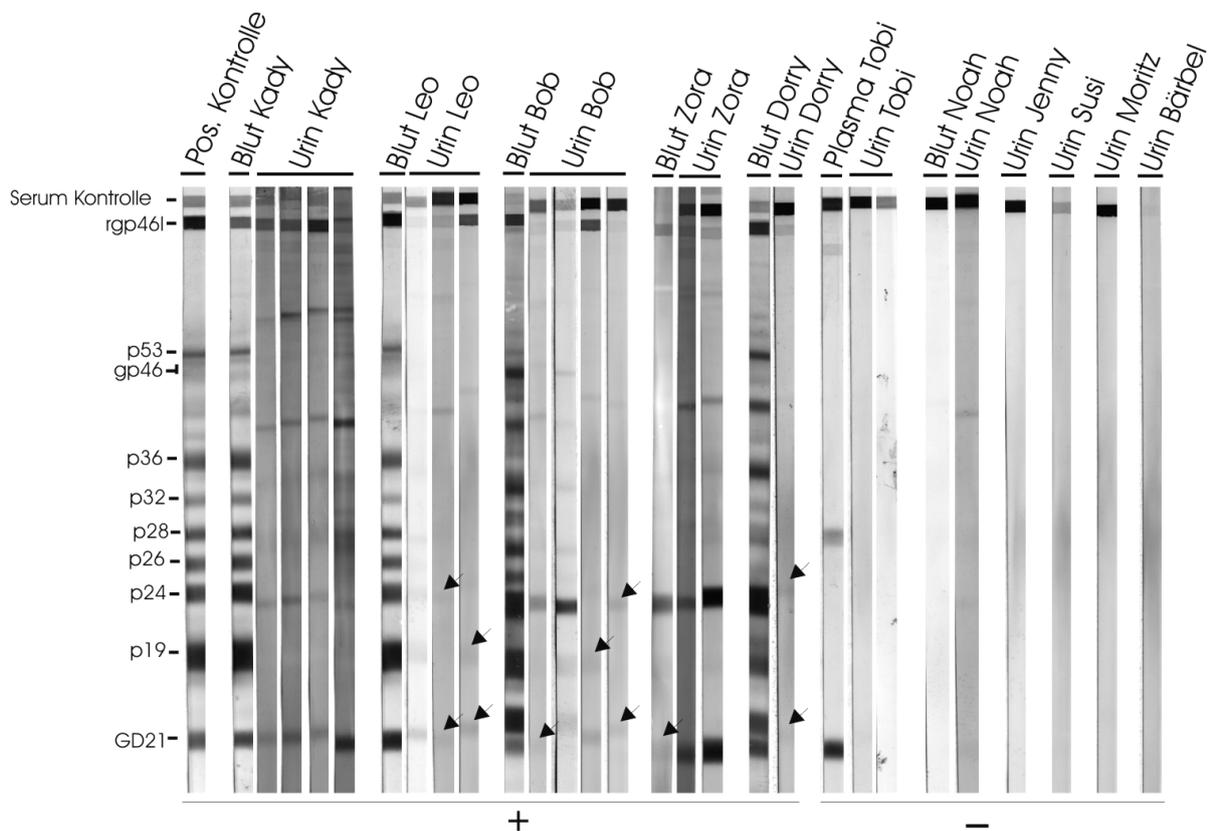
Die Sensitivität und Spezifität des Testverfahrens wurde anhand der Anzahl an positiven Testergebnissen pro insgesamt getesteter Urinproben (nicht der Anzahl getesteter Individuen) ermittelt (Santiago et al., 2002; Ling et al., 2003). Unter der Annahme, dass einzelne Proben von einem Individuum nicht miteinander in Verbindung stehen, wurde ein Verfahren

## Ergebnisse

zur Etablierung von diagnostischen Tests (Galen und Gambino, 1979; Abel, 1993) angewandt.

Ein Vergleich der Prävalenzen in verschiedenen gebildeten Kategorien von Schimpansen (Alter, Geschlecht, sozialer Rang) wurde mit Hilfe des Exakt  $\chi^2$ -Tests durchgeführt.

Alle 21 Urinproben von Schimpansen mit bekanntem STLV-1-Antikörperstatus zeigten im Western Blot die dem STLV-1-Infektionsstatus entsprechenden Reaktivitäten. Die Urinproben von bekannt positiven Tieren (PCR und/oder Serologie) zeigten auf den Blotstreifen zwar eine unterschiedliche Intensität der Banden, entsprachen jedoch stets den Kriterien für eine positive Befundung (rgp46-I, GD21, p19 und/oder p24). Alle Proben von bekannt STLV-negativen Tieren zeigten ausschließlich Reaktivitäten mit der Serum-Kontrollbande, was belegt, dass Antikörper (IgG) in der Probe vorhanden waren (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Etablierung des Nachweises von STLV-Antikörpern in Urinproben. Kady, Leo, Bob, Zora, Dorry und Noah waren wild lebende Schimpansen, alle anderen Tiere leben in Zoos. Von Tieren, bei denen nur ein Urin-Western Blot-Streifen dargestellt ist, war weder Serum noch Plasma vorhanden; hier erfolgte der Nachweis des Infektionsstatus mittels Real-time PCR. Die Pfeile weisen auf schwach sichtbare Banden.

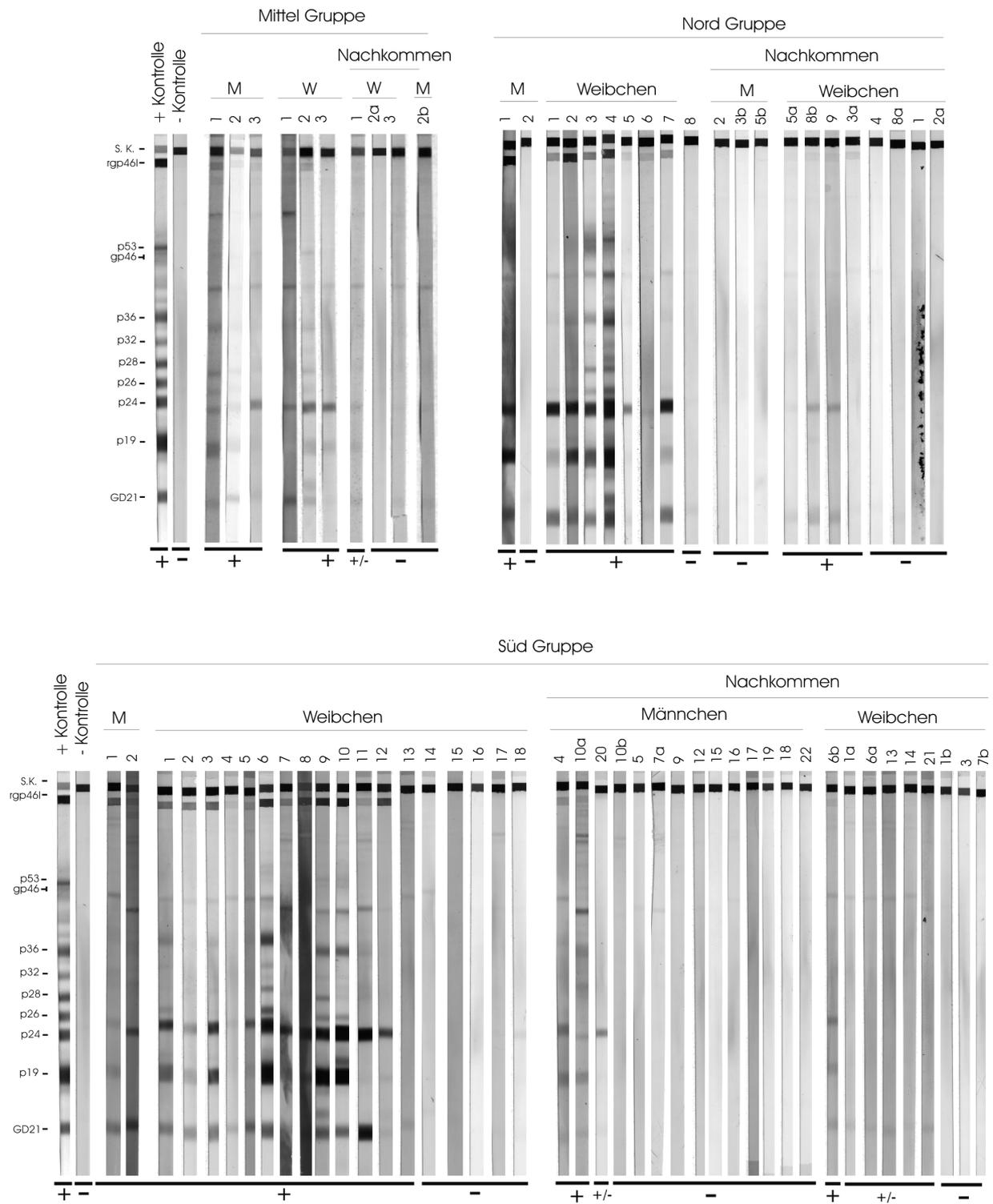
Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität des Verfahrens (alle Urinproben wurden richtig eingruppiert), kann wegen der relativ geringen Probenzahl, die zur Etablierung dieses Testverfahrens zur Verfügung stand, bei Annahme eines Konfidenzintervalls von 95% rechnerisch jedoch nur von Toleranzgrenzen von 77–100% für die Sensitivität und 58–100% für die Spezifität ausgegangen werden (Galen und Gambino, 1979; Abel, 1993). Mit diesem Verfahren wurde anschließend von den 74 Schimpansen, für die weder Serum noch Blutproben zur Verfügung standen, jeweils eine Urinprobe in den Western Blot eingesetzt (Abbildung 14).

Insgesamt wurden mit diesem Verfahren in der Nord-Gruppe 12 von 21, in der Mittel-Gruppe 6 von 10 und in der Süd-Gruppe 18 von 43 Schimpansen als STLV-Antikörper-positiv gewertet. Die Ergebnisse von 7 Tieren wurden als fraglich eingestuft. In dieser Arbeit werden fragliche Ergebnisse als negative Ergebnisse gewertet, daher wird bei den hier vorliegenden Zahlen von Mindestwerten an STLV-positiven Schimpansen ausgegangen.

Des Weiteren sind Blutproben von sechs Tieren, die vor der routinemäßigen Sammlung von Urinproben verstorben waren, in den Ergebnissen berücksichtigt, so dass eine Gesamtzahl von 80 Tieren auf ihren Infektionsstatus (Urin bzw. Serum) untersucht werden konnte.

Zur Bewertung der epidemiologischen Situation wurden die Schimpansen in verschiedene Altersklassen eingeteilt: 0–5, 6–9, 10–15 und älter als 15 Jahre. Diese Einteilung beruht auf der Dauer des Säugens durch die Mutter (0–5), die Zeit vor der Geschlechtsreife (6–9) und dem Zeitraum bis zur Erlangung der vollen Körpergröße und des sozialen Rangs in der Gruppe (10–15) (Boesch & Boesch-Achermann, 2000). Bei 38 von 80 (47,5%) Schimpansen konnten Antikörper gegen STLV festgestellt werden (Tabelle 16). Auffallend war, dass junge Tiere sehr viel seltener STLV-spezifische Antikörper aufwiesen als ältere Individuen. Da in einer ersten Analyse kein signifikanter Unterschied in der Infektionsrate der Schimpansen im Alter von 0–5 Jahren (*infant*) und 6–9 Jahren (*juvenile*) festgestellt werden konnte (exact  $\chi^2 = 0.3$ ;  $p < 1$ ), und ebenfalls kein Unterschied zwischen Individuen im Alter zwischen 10–15 Jahren (*adolescent*) und älter als 15 Jahren (*adult*) zu erkennen war (exact  $\chi^2 = 1.335$ ;  $p = 0.285$ ), wurden sie in zwei Gruppen nach ihrem Alter von 0–9 und älter als 10 Jahre zusammengefasst (Tabelle 17). Eine Unterteilung in diese Kategorien schien sinnvoll, da Schimpansen in freier Wildbahn im Alter von etwa 10 Jahren die Geschlechtsreife erlangen. Die Weibchen verlassen dann die Gruppe und immigrieren in eine andere Gruppe. Auch die Teilnahme an der Jagd auf andere Affenarten wird häufiger und damit wird ein vermehrter Zugang zu Fleisch gewährleistet. Eine logistische Regressionsanalyse, welche die STLV-1-Antikörperprävalenz als abhängige binäre Variable und Altersklasse, Gruppenzugehörigkeit und Geschlecht als unabhängige Variablen annimmt, ergab, dass lediglich die Altersklasse einen signifikanten Einfluss auf die STLV-Antikörperprävalenz hatte (Tabelle 18). Schimpansen, die älter als 10 Jahre waren, hatten ein signifikant höheres Risiko, mit STLV infiziert zu sein als jüngere Tiere.

## Ergebnisse



**Abbildung 14:** Untersuchung von 74 Urinproben von Schimpansen mittels HTLV-1/2-Western Blot. Die Nummerierung der Nachkommen entspricht den Nummern der zugehörigen Mütter (W) der jeweiligen Gruppe; hat eine Mutter 2 Nachkommen, so werden diese mit den Buchstaben a und b bezeichnet. M = Männchen, W = Weibchen. + = reaktive Probe, - = nicht reaktive Probe, +/- = fragliches Ergebnis. Die Serumkontrollbande ist bei allen Urinproben mit vergleichbarer Stärke reaktiv. Dies zeigt, dass in allen Proben Immunglobuline vorhanden waren. Bei reaktiven Proben wurden in der Regel die beiden Glykoproteine (GD21, rgp46-I) sowie die internen Proteine (p19, p24) erkannt.

Tabelle 16 fasst die Ergebnisse entsprechend der ursprünglichen vier Altersgruppen der einzelnen Tiere zusammen und Tabelle 17 schlüsselt die Ergebnisse auf, entsprechend dem Geschlecht und unterteilt in Individuen jünger oder älter als 10 Jahre.

**Tabelle 16:** STLV-Antikörperstatus bestimmt anhand von 74 Urin- und 6 Blutproben von wild lebenden Schimpansen

Gruppe		n =	Altersgruppe (Jahre)			
			0–5	6–9	10–15	>15
<b>Nord</b>	Gesamtzahl	24	6	5	4	9
	positiv	13	0	2	4	7
	fraglich*	0	0	0	0	0
	% positiv	54,2	0	40	100	77,8
<b>Mitte</b>	Gesamtzahl	10	1	1	2	6
	positiv	6	0	0	1	5
	fraglich	1	0	0	0	1
	% positiv	60	0	0	50	83,3
<b>Süd</b>	<b>Gesamtzahl</b>	<b>46</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>22</b>
	positiv	19	1	0	2	16
	fraglich	6	1	4	1	0
	% positiv	41,3	12,5	0	33,3	72,7
<b>Alle Gruppen</b>	<b>Gesamtzahl</b>	<b>80</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>37</b>
	positiv	38	1	2	7	28
	fraglich	7	1	4	1	1
	% positiv	47,5	6,7	12,5	58,3	75,7

\* fragliche Ergebnisse wurden als STLV-1-Antikörper-negativ gewertet

**Tabelle 17:** Anzahl an STLV-1-Antikörper-positiven weiblichen und männlichen Schimpansen, zusammengefasst entsprechend der Altersklassen 0–9 und  $\geq 10$  Jahre

Gruppe		Weibchen		Männchen	
		0–9 Jahre	$\geq 10$ Jahre	0–9 Jahre	$\geq 10$ Jahre
<b>Nord</b>	Gesamtzahl	6	11	5	2
	positiv	2	10	0	1
	fraglich*	0	0	0	0
	% positiv	33,4	90,9	0	50
<b>Mitte</b>	<b>Gesamtzahl</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
	positiv	0	3	0	3
	fraglich	0	1	0	0
	% positiv	0	60	0	100
<b>Süd</b>	<b>Gesamtzahl</b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>8</b>
	positiv	1	13	0	5
	fraglich	4	1	1	0
	% positiv	12,5	65	0	62,5
<b>Alle Gruppen</b>	<b>Gesamtzahl</b>	<b>15</b>	<b>36</b>	<b>16</b>	<b>13</b>
	positiv	3	26	0	9
	fraglich	4	2	1	0
	% positiv	20	72,2	0	69,2

\* fragliche Ergebnisse wurden als STLV-1-Antikörper-negativ gewertet

**Tabelle 18:** Mögliche Einflussfaktoren auf das STLV-Antikörpervorkommen bei den Schimpansen der Studiengruppen

Kriterium	Wald $X^2$	df	p	Exp (B)
Gruppe	2.782	2	0.249	
Geschlecht	0.592	1	0.442	2.723
Altersklasse (<10 vs. >10 Jahre)	9.756	1	0.002	51.862

Wald  $X^2$  = Teststatistik für einzelne unabhängige Variablen (Gruppe, Geschlecht, Alter) bei der logistischen Regression; df = Freiheitsgrade; p = Wahrscheinlichkeit, einen gefundenen Unterschied wie den beobachteten durch Zufall zu bekommen. Exp (B) gibt an, wieviel mal wahrscheinlicher ein Ereignis zu beobachten als nicht zu beobachten ist, wenn die unabhängige Variable um 1 zunimmt. Exp (B) >1 = positiver Effekt, Exp (B) <1 = negativer Effekt.

#### 4.3.1.1.3 Molekulare Epidemiologie des STLV-1

Mit Hilfe der HTLV Real-time PCR (s. Material und Methoden) konnte in Gewebeproben von 5 der 10 verstorbenen Schimpansen und von 2 der 5 verstorbenen Roten Stummelaffen der hoch konservierte *tax*-Bereich des STLV-Genoms nachgewiesen werden. Um eine phylogenetische Zuordnung des detektierten STLV-1 zu ermöglichen, wurde anschließend von allen *tax*-positiven Tieren ein 422 Basenpaare (Bp) großes Fragment der LTR-Region des Genoms amplifiziert; von 3 Schimpansen und einem Roten Stummelaffen konnte zusätzlich ein 522 Basenpaare großes Stück der *env*-Region amplifiziert werden (Tabelle 19). Die LTR- und *env*-Region des HTLV/STLV-Genoms sind im Vergleich zu dem sonst konservierten Genom Regionen mit einer hohen Variabilität, daher werden diese Regionen standardmäßig für phylogenetische Analysen eingesetzt (Ellerbrok et al., 1997, 1998).

Ein Vergleich der STLV-1-Sequenzen zeigt, dass jeder serologisch positive Schimpanse mit einem anderen STLV-1-Stamm infiziert war. Da die Sequenzanalyse des PCR-Produktes des Tieres Rafiki eine „gemischte“ Sequenz vermuten ließ, wurde das PCR-Produkt kloniert und 10 Klone sequenziert. Hierdurch konnte festgestellt werden, dass Rafiki mit mindestens zwei verschiedenen STLV-1-Stämmen infiziert war. Auch die beiden Roten Stummelaffen waren jeweils mit einem unterschiedlichen STLV-1 Stamm infiziert. Ein Vergleich der STLV-1-Varianten zeigte, dass der Stamm STLV<sub>wrc</sub> auf 422 Bp keinen Unterschied zu dem Stamm STLV-Dorry hatte; erst ein Vergleich von 1,4 Kilobasen (Kb) zeigte 3 Bp Unterschied. Auch in der *env*-Region waren bei diesen beiden Tieren innerhalb von 522 nur 3 Nukleotide Unterschied vorhanden, ein Fragment von 1000 Nukleotiden zeigte dann in diesem Bereich 6 Bp Unterschied. Der Stamm STLV<sub>wrc</sub>-14/97 zeigte auf den 422 Bp der LTR-Region nur 3 Bp Unterschied zu dem Stamm Ptr-Rafiki-I. Tabelle 20 vergleicht die Anzahl der in der LTR ermittelten unterschiedlichen Nukleotide der hier erfassten STLV-1-Stämme und vergleicht diese mit der HTLV-1-Sequenz ATK (Seiki et al., 1984).

Tabelle 19: Mittels PCR auf STLV-1 untersuchte Schimpansen und Rote Stummelaffen

Primaten	Gruppe/ Territorium	Alter <sup>1</sup> (Jahre)	Geschlecht	STLV-1 Real-time PCR	Sequenz	Referenz- nummer <sup>2</sup>
Schimpansen						
Dorry	Nord	10	W	+	Ptr-Dorry*	AY267833 AY267829
Loukoum	Nord	~27	W	+	Ptr-Loukoum*	AY267835 AY267831
Lefkas	Nord	8	M	-	-	
Leonardo	Nord	2	M	-	-	
Noah	Mitte	7	M	-	-	
Leo	Mitte	~29	M	+	Ptr-Leo*	AF539747 AY267830
Kady	Mitte	~30	W	+	Ptr-Kady	AY267834
Rafiki	Süd	~19	M	+	Ptr-Rafiki-I Ptr-Rafiki-II	AY267836 AY267838
Olduvai	Süd	8	M	-	-	
Tita	Süd	~25	W	-	-	
<i>C. badius</i>						
9/96	Nord	adult	W	-	-	
14/97	Süd/Nord	adult	W	+	STLVwrc-14/97	AY33376
2/02	Mitte	adult	M	+	STLVwrc*	AY267837 AY267832
3/02	Süd	juvenil	M	-	-	
4/98	Süd	adult	M	-	-	

M = Männchen, W = Weibchen. \* = von diesen Tieren konnte neben der LTR - auch die *env*-Region des STLV-Genoms amplifiziert werden. <sup>1</sup> = Das Alter der Stummelaffen war nicht bekannt, die Tiere wurden anhand des Entwicklungszustandes in adulte und juvenile Tiere eingestuft. <sup>2</sup> = diese Sequenzen wurden in den Datenbanken unter der angegebenen Referenznummer (*accession number*) hinterlegt.

## Ergebnisse

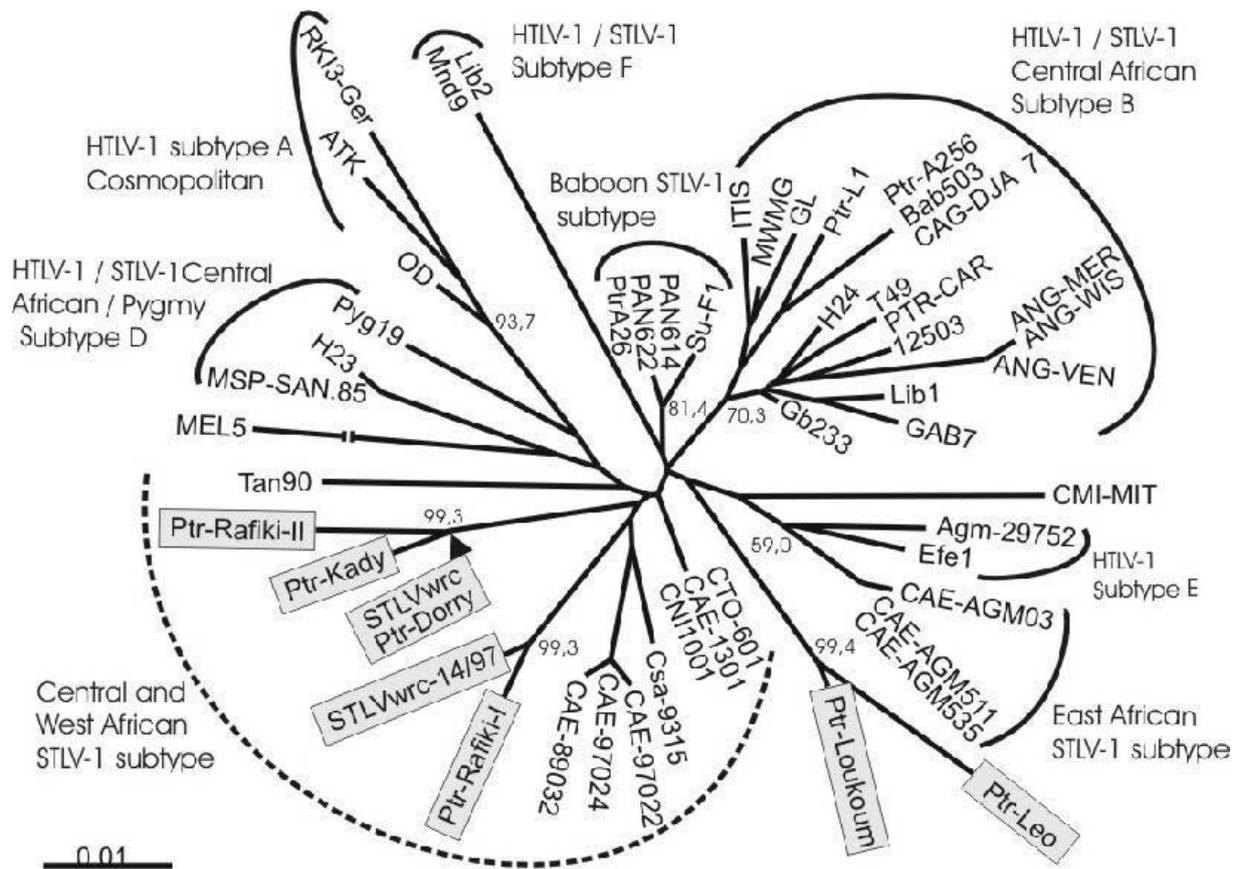
**Tabelle 20:** Vergleich der STLV-1-Sequenzen der verschiedenen Tai-Schimpansen und Roten Stummelaffen (*P. badius*) zueinander und zur Sequenz ATK (Referenznummer J02029). Die Unterschiede beziehen sich auf ein 422 Basenpaar-Fragment der LTR und sind in absoluten Zahlen (Basenpaaren, Bp) und in Prozent (%) dargestellt.

Bp / %	Dorry	Rafiki-I	Rafiki-II	Leo	Lou-koum	<i>P. badius</i> 2/02	<i>P. badius</i> 14/97	ATK
Kady	3 99%	17 95%	7 98%	23 94%	21 95%	3 99%	15 96%	26 93%
Dorry		14 96%	4 99%	23 94%	18 95%	0 100%	12 97%	23 94%
Rafiki-I			18 95%	25 94%	20 95%	14 96%	4 99%	27 93%
Rafiki-II				27 93%	22 94%	4 99%	16 96%	27 93%
Leo					7 98%	23 94%	23 94%	31 92%
Lou-koum						18 95%	18 95%	23 94%
<i>P. bad.</i> 2/02							12 97%	23 94%
<i>P. bad.</i> 14/97								25 94%

Des Weiteren wurde auf der Basis der hier bestimmten Sequenzen sowie der in der Datenbank (GenBank) verfügbaren Daten ein STLV-1-Stammbaum für die LTR- sowie für die *env*-Region erstellt (Abbildungen 15 und 16). Die in dieser Arbeit erfassten STLV-1-Stämme wurden in der öffentlichen Sequenzdatenbank (GenBank) hinterlegt (siehe Tabelle 18).

### 4.3.1.1.4 Nachweis von SIV

Das Vorkommen von SIV bei den Roten und den Olivgrünen Stummelaffen ( $SIV_{wrc}$  und  $SIV_{olc}$ ) des Tai-Nationalparks wurde von Cournaud et al. (2003) beschrieben. Auf diesen Sequenzen beruhend wurde eine  $SIV_{wrc}$ - und  $SIV_{olc}$ -spezifische PCR entworfen (siehe Material und Methoden). Mit Hilfe dieser PCR konnte bei den Proben *P. bad.* 2/02 und *P. bad.* 3/02 ein 220 Bp großes Fragment des SIV-Genoms amplifiziert und sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen zeigten eine hohe Homologie zu den publizierten  $SIV_{wrc}$ -Sequenzen mit 87% für die Sequenz Acc. Nr. AY138267.1 bis 83% für die Sequenz AY138266.1. Die erhaltenen Sequenzen gruppieren sich also eindeutig innerhalb des von Cournaud et al. (2003) beschriebenen  $SIV_{wrc}$ -Subtypus. Bei den Schimpansen konnten mit Hilfe dieser PCR keine  $SIV_{wrc}$ - oder  $SIV_{olc}$ -spezifischen Sequenzen nachgewiesen werden.



**Abbildung 15:** Stammbaum STLV-1/HTLV-1; die in dieser Untersuchung erfassten STLV-1-Stämme sind durch Rechtecke gekennzeichnet, basierend auf 422 Bp der LTR

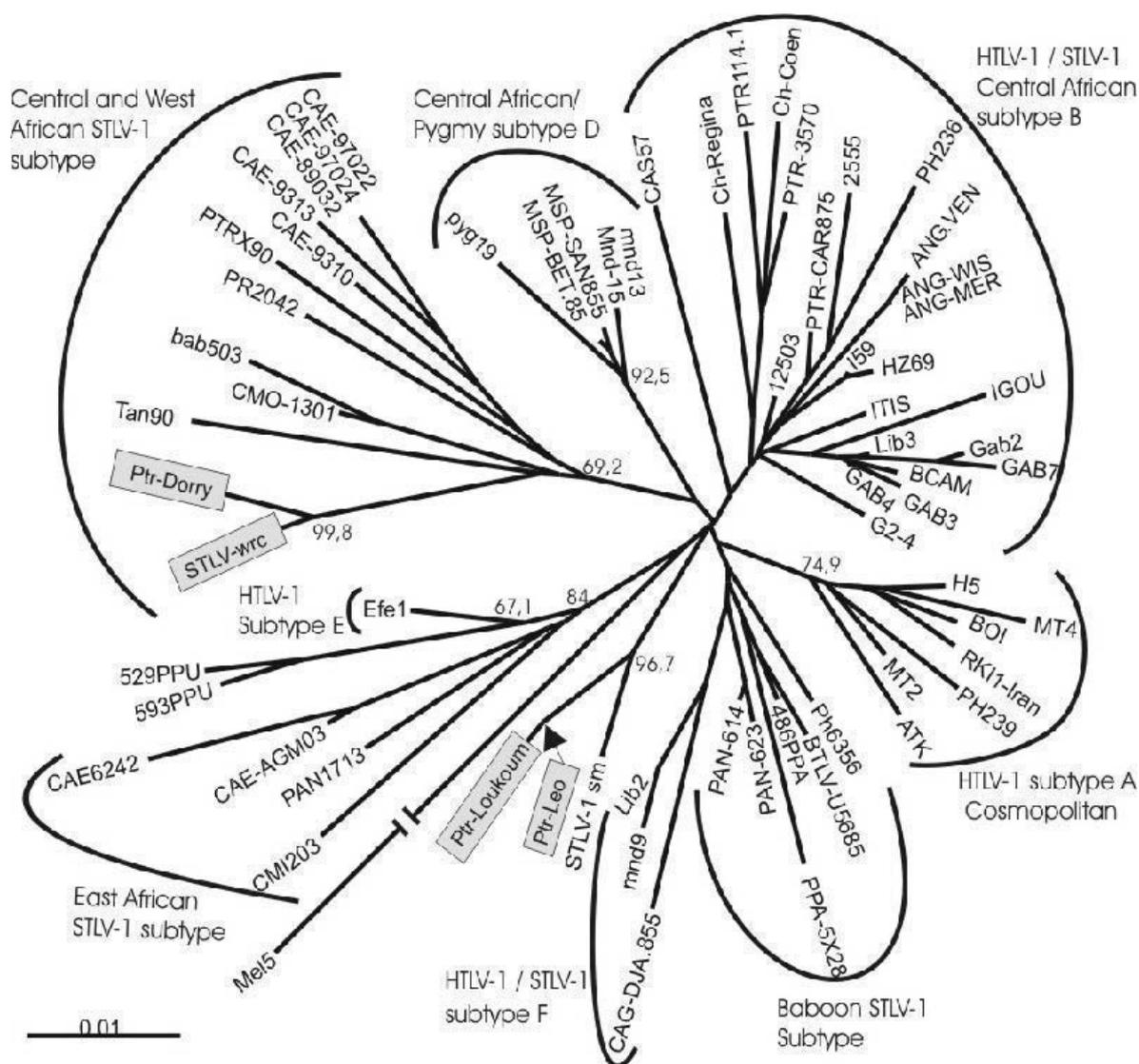


Abbildung 16: Stammbaum STLV-1/HTLV-1; die in dieser Untersuchung erfassten STLV-1-Stämme sind durch Rechtecke gekennzeichnet, basierend auf 520 Bp der *env*-Region

#### 4.3.1.2 Andere chronisch/latent vorkommende Viren

Auch Viren, die eine **Hepatitis** hervorrufen können, sind bei Schimpansen beschrieben worden (Robertson, 2001). Obwohl die verschiedenen Erreger nur in seltenen Fällen ein klinisches Bild hervorrufen (Bennett et al., 1998), können sie in einem multifaktoriellen Krankheitsgeschehen von Bedeutung sein. Das Vorkommen von Antikörpern gegen das Hepatitis-B-Virus (HBV) und von HBV-spezifischen Sequenzen wurden von mir selbst und das von Hepatitis C- und TT-Virus wurde für die hier vorliegende Kohorte durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Schreier, RKI, untersucht. Drei von 11 Schimpansen waren positiv für Antikörper gegen das Core-Protein des Hepatitis B-Virus (Tabelle 21).

Tabelle 21: Serologische Untersuchung auf HBV

Primaten	Anti-HBc (Enzygnost)	
	Vielfaches des Grenzwertes	Bewertung
Kady	15,81	<b>reaktiv</b>
Leo	11,43	<b>reaktiv</b>
Noah	0,37	neg
Bob*	0,38	neg
Dorry	0,39	neg
Loukoum	0,39	neg
Leonardo	0,38	neg
Lefkas	0,36	neg
Rafiki	0,33	neg
Tita	1,37	<b>reaktiv</b>
Olduvai	0,35	neg
2/02	0,43	neg
3/02	0,38	neg

\* Blutprobe von einem lebenden Tier

Tiere mit Namen sind Schimpansen, solche mit Nummern Rote Stummelaffen

Mit Hilfe einer HBV-spezifischen PCR (MacDonald et al., 2000) konnte in allen drei Anti-HBc-positiven Schimpansen auch genomische HBV-DNS nachgewiesen werden. Serologisch negative Tiere waren auch in der PCR negativ. Somit konnten eventuell auftretende „falsch positive“ bzw. „falsch negative“ Ergebnisse des HBV-ELISA ausgeschlossen werden. Die 160 Bp langen Fragmente der drei positiven Tiere zeigte 100% Homologie zu publizierten HBV-Stämmen von Schimpansen (z.B. Acc. No. AF242585). Auch TT-Viren wurden bei den Taï-Schimpansen mittels PCR nachgewiesen; eine weitergehende Analyse der erfassten Virusstämme wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Hepatitis C-Virus konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse im Einzelnen sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

**Herpesviren** führen in der Regel zu latenten Infektionen, die jedoch nur sporadisch bzw. in Stress-Situationen (u.a. Krankheiten, psychischer Stress) klinische Symptome verursachen können. Nur wenige Herpesviren können eine tödliche akute Krankheit hervorrufen; ein Beispiel hierfür ist die Transspezies-Übertragung des Herpes-B- und des Herpes-simplex-Virus. Eine Herpes-B-Infektion beim Menschen (Reservoir: Makaken) bzw. eine Herpes-Simplex-Infektion bei Menschenaffen (vom Menschen stammend) (Bennett et al., 1998) können zu tödlich verlaufenden Erkrankungen führen. Hat jedoch der Mensch Antikörper gegen Herpes-simplex-Virus, so scheint er gegen Herpes-B-Virus geschützt sein, und umgekehrt bei den Affen (Hull, 1971; Ludwig et al., 1978; Ludwig et al., 1983).

**Tabelle 22:** Mittels PCR untersuchte chronische/inapparente virale Erreger

<b>Primaten</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Herpesviren</b>	<b>HBV</b>	<b>HCV</b>	<b>TTV</b>
Kady	Milz	PtrLCV1*- <b>pos</b>			
	Leber		<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>
Leo	Milz	PtrLCV1- <b>pos</b>			
	Leber		<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>
Noah	Milz	PtrLCV1- <b>pos</b>			
	Leber		neg	neg	<b>pos</b>
Dorry	Milz	PtrLCV1- <b>pos</b>			
	Leber			neg	neg
Olduvai	Milz	PtrLCV1- <b>pos</b>			
	Leber		neg		
Loukoum	Blut	PtrLCV1- <b>pos</b>			
Leonardo	Milz	PtrLCV1- <b>pos</b>			
Lefkas	Blut	PtrLCV1- <b>pos</b>			
Rafiki	Milz	neg			
Tita	Milz	PtrLCV1- <b>pos</b>			
	Leber		<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>
2/02	Milz	PbadLCV1**- <b>pos</b>			
	Leber		neg	neg	neg
3/02	Blut	PbadLCV1- <b>pos</b>			

\* PtrLCV1 = LCV-1 des Schimpansen, \*\* PbadLCV1 = LCV-1 des *Ptilocolobus badius*. Leerstellen sind nicht untersuchte Proben. Tiere mit Namen sind Schimpansen, solche mit Zahlen Rote Stummelaffen. \*PtrLCV1 = LCV-1 des Schimpansen, \*\*PbadLCV1 = LCV-1 des *Ptilocolobus badius*

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ehlers (RKI) konnte bei den Schimpansen und Roten Stummelaffen zwar kein humanes Herpesvirus gefunden werden (Tabelle 22), jedoch ein neues Herpesvirus der Familie Lymphocryptovirus (LCV). Die Bedeutung dieses Virus für Primaten ist unbekannt; da es jedoch auch in der Zoopopulation bei gesunden Schimpansen weit verbreitet ist, wird nicht von einer Beeinträchtigung der Tiere ausgegangen. Details zu der Phylogenie der nachgewiesenen LC-Viren sind dem Artikel von Ehlers et al. (2003) zu entnehmen.

#### 4.3.2 Akute Erreger

Da fünf der sechs in dieser Arbeit untersuchten und obduzierten Schimpansen an akuten Krankheiten verstorben waren, wurde ein möglichst breites Spektrum an Nachweissystemen auf verschiedenste akute Erreger eingesetzt. In diese Analysen wurden des weiteren Proben von vor 2001 verstorbenen und von einem später als März 2002 verstorbenen Schimpansen einbezogen, da die Todesursache dieser Tiere ebenfalls unbekannt war.

Nachdem als erstes eine Infektion mit Ebola-, Marburg- und Lassavirus am Bernhard-Nocht-Institut ausgeschlossen werden konnte, wurden die Proben in der Arbeitsgruppe von Frau

Dr. Tischer (NRZ MMR) am RKI serologisch und mit Hilfe der PCR auf das Masernvirus getestet. Der Tierarzt Pierre Formenty (WHO, Tai-Ebola-Projekt) hatte bei den 1999 verstorbenen Schimpansen den Verdacht geäußert, dass ein Masernvirus Auslöser der respiratorischen Erkrankungsfälle sein könnte. Daher wurden diese Analysen als erste durchgeführt. Weder serologisch noch mit PCR-Methoden konnten jedoch Masernviren nachgewiesen werden.

Anschließend wurden die Proben auf weitere hochpathogene Viren sowie auch Bakterien untersucht. Anlässlich der möglichen Bedrohung durch bioterroristische Anschläge waren hochsensitive Testverfahren zum Nachweis verschiedener Erreger im Zentrum für Biologische Sicherheit des RKI entwickelt worden und standen daher für diese Untersuchungen zur Verfügung. Hierzu zählten Nachweissysteme für Orthopockenviren, *Coxiella*, *Francisella* und *Brucella* (Tabellen 23 und 24).

In Kooperation mit anderen Fachgebieten des RKI wurde zusätzlich nach weiteren Viren gesucht, die möglicherweise eine akute Erkrankung bei Schimpansen hervorrufen können. Getestet wurde auf Enteroviren, West-Nil-Virus, Adenovirus 1–4, Influenzavirus A H1, H3 und Influenzavirus B sowie das Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenzavirus und Humanes Metapneumovirus. Keiner dieser Erreger konnte nachgewiesen werden (Tabelle 24).

Aufgrund des respiratorischen Krankheitsbildes der 1999 verstorbenen Schimpansen und insbesondere des Tieres Kady wurden parallel zu den am RKI durchgeführten Untersuchungen auch Proben an Frau Prof. Hakenbeck, Universität Kaiserslautern, geschickt. Mit Hilfe einer *Streptococcus*-spezifischen PCR in der hoch konservierten bakteriellen 16S-Region (McGee et al., 2001) konnte sie bei den 1999 verstorbenen Tieren *Streptococcus pneumoniae* nachweisen; auf diese Ergebnisse wird in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen. Doch auch die PCR mit DNS des Tieres Leo zeigte eine positive Bande bei der Gelelektrophorese. Eine Sequenzierung des PCR-Produktes zeigte, dass die Sequenz 100% homolog mit *Bacillus cereus*- bzw. *Bacillus anthracis*-Sequenzen war. Zur Abgrenzung von *B. cereus* von *B. anthracis* wurde daraufhin am RKI eine *B. anthracis*-spezifische Real-time PCR (Ellerbrok et al., 2002) mit DNS von allen Tieren durchgeführt. Diese PCR zeigte für die Tiere Leo, Noah, Dorry, Gargantuan, Gisèle und den später verstorbenen Olduvai in den drei untersuchten Regionen (*pag*, *cap-C* und *rpo-B*) einen positiven Befund (Tabelle 23). Die PCR-Produkte der 2 Virulenzgene *pag* und *capC* (kodiert auf den Plasmiden PXO1 und PXO2), sowie der genomischen *rpo-B*-Region wurden mit der Gelelektrophorese aufgetrennt und sequenziert. Die Sequenzen belegten eine hohe Homologie zu bekannten *B. anthracis*-Sequenzen.

Zusätzlich wurde eine *variable number tandem repeat* (VNTR)-Analyse (Andersen et al., 1996; Jackson et al., 1997, 1999) durchgeführt, mit deren Hilfe in der *vrrA*-Region zwei *repeat*-Einheiten erfasst werden konnten. Dieses Allel wurde in allen sechs untersuchten

## Ergebnisse

Schimpansen erfasst. Dies weist darauf hin, dass die sechs Tiere mit dem gleichen *B. anthracis*-Stamm infiziert waren. Zwei Repeats in dieser Region des Genoms sind u.a. bei *B. anthracis*-Stämmen afrikanischer Herkunft beschrieben worden (Keim et al., 2000).

Tabelle 23: Ergebnisse der Real-time PCR auf akute bakterielle Erreger

<b>Primaten</b>	<b>Gewebe</b>	<b><i>B. anthracis</i></b>	<b><i>Coxiella burnetii</i></b>	<b><i>Francisella tularensis</i></b>	<b><i>Brucella spec.</i></b>
Kady	Milz	neg	neg	neg	neg
	Lunge	neg			
Leo	Milz	<b>pos</b>	neg	neg	neg
	Lunge	<b>pos</b>			
Noah	Milz	<b>pos</b>	neg	neg	neg
	Lunge	<b>pos</b>			
Dorry	Milz	<b>pos</b>	neg	neg	neg
	Lunge	<b>pos</b>			
Gargantuan	Muskel	<b>pos</b>			
Gisèle	Muskel	<b>pos</b>			
Olduvai	Milz	<b>pos</b>	neg	neg	neg
	Lunge	<b>pos</b>			
Loukoum	Milz	neg		neg	neg
	Lunge	neg			
Leonardo	Milz	neg	neg	neg	neg
	Lunge	neg			
Lefkas	Milz	neg		neg	neg
Rafiki	Milz	neg	neg	neg	neg
	Lunge	neg			
Tita	Milz	neg	neg	neg	neg
	Leber	neg			
<i>C.b.</i> 3	Milz	neg	neg	neg	neg
	Leber	neg			
<i>C.b.</i> 4	Blut	neg			

Leerstellen sind nicht untersuchte Proben; Tiere mit Namen sind Schimpansen, Tiere mit Nummern Rote Stummelaffen

Tabelle 24: Ergebnisse der PCR zur Feststellung der Prävalenz akuter viraler Erreger

Name	Gewebe	Masern- virus*	Orthopocken- viren	Enteroviren	WNV	Adenovirus D1-4	Influenzavirus A H1	Influenzavirus A H3	Influenza- virus B	RSV	Parainfluenza- virus	HMPV
Kady	Milz	neg	neg	neg	neg							
	Leber		neg	neg								
	Lunge			neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	Mes. LK			neg		neg						
	Herz			neg								
Leo	Milz	neg	neg	neg	neg							
	Leber		neg	neg								
	Lunge					neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	Mes. LK			neg		neg						
	Jejunum			neg								
Noah	Milz		neg	neg	neg							
	Leber	neg	neg	neg								
	Lunge	neg		neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	Mes. LK			neg		neg						
	Herz			neg								
Dorry	Jejunum			neg								
	Milz	neg	neg	neg	neg							
	Leber		neg	neg								
	Lunge			neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	Mes. LK			neg		neg						
Olduvai	Herz			neg								
	Milz		neg	neg	neg							
	Leber		neg	neg								
	Lunge			neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	Herz			neg		neg						
2/02	Mes. LK			neg								
	Milz	neg	neg	neg	neg							
	Leber		neg	neg		neg						

\* alle getesteten Tiere waren auch serologisch negativ. Mes. LK = Mesenterial-Lymphknoten. WNV = West-Nil-Virus; RSV = Respiratory Syncytial Virus; HMPV = Humanes Metapneumovirus; Leerstellen sind nicht untersucht

54 Tabelle 25: Ursachen der Todesfälle zwischen März 2001 und März 2002

Schimpanse	Gruppe	Alter (Jahre)	Todesdatum	Geschlecht	Symptome	Pathologie/Histologie	Nachgewiesene Erreger	Todesursache
Dorry	Nord	10	15. Okt. '01	W	nicht beobachtet	nicht möglich, autolytisch	STLV-1, LCV <i>B. anthracis</i>	Milzbrand
Gargantuan	Nord	10	15. Okt. '01	M	nicht beobachtet	nicht möglich, keine Organe	<i>B. anthracis</i>	Milzbrand
Gisèle	Nord	5	15. Okt. '01	W	nicht beobachtet	nicht möglich, keine Organe	<i>B. anthracis</i>	Milzbrand
Noah	Mitte	7	13. Feb. '02	M	nicht beobachtet	stark geröteter Darm, Blutungen in verschiedenen Organen, v.a. Darm und Lunge	LCV, TTV <i>B. anthracis</i>	Milzbrand
Leo	Mitte	~29	14. Feb. '02	M	Erbrechen, Schwäche, plötzlicher Tod	stark geröteter Darm, Blutungen in verschiedenen Organen, v.a. Darm und Lunge	STLV, LCV, HBV, TTV <i>B. anthracis</i>	Milzbrand
Kady	Mitte	~30	11. Dez. '01	W	langsamer Krankheitsverlauf, Schwäche, Atembeschwerden	Verwachsungen des Herzbeutels mit Lungenfell und Brustfell, großes, dünnwandiges Herz	STLV, LCV, HBV, TTV	chronisch respiratorische Erkrankung, dilatative Kardiomyopathie

W = Weibchen; M = Männchen