

### 3 Material und Methoden

Die eigenen Untersuchungen, Beobachtungen und Probennahmen im Tai-Nationalpark erfolgten im Zeitraum von März 2005 bis März 2006. Im Zuge dieser Arbeit wurden aber auch vor diesem Zeitraum gemachte Beobachtungen und gesammelte Proben miteinbezogen. Das Ziel war, alle vorhandenen Daten zu den Ausbrüchen respiratorischer Erkrankungen unter den Tai-Schimpansen zusammenzutragen und auszuwerten, um ein möglichst vollständiges Bild der untersuchten Krankheitsgeschehen zu erstellen.

#### 3.1 Probennahme Kot, Urin, *fruit wadges*

Im Rahmen des permanenten Gesundheitsüberwachungsprogramms des Tai-Schimpansenprojekts wurden von März 2005 bis März 2006 Kot- und Urinproben sowie gekaute Fruchtreste, sog. *fruit wadges*, von den Individuen der verschiedenen Gruppen gesammelt. Diese Proben dienen zur Etablierung nichtinvasiver Untersuchungsmethoden und zur Anlegung einer Materialbank, auf die in Folgeuntersuchungen zurückgegriffen werden kann. Auf ihrer Grundlage soll langfristig ein Basiswissen über die bei gesunden Schimpansen vorkommenden Viren, Bakterien und Parasiten aufgebaut werden. Zusätzlich zu diesen routinemäßig gesammelten Proben erfolgte eine ausgeweitete Probennahme bei erkrankten Tieren, von denen so viele Proben wie möglich gesammelt wurden. Prinzipiell wurden nur solche Proben genommen, die eindeutig einem Individuum zuzuordnen waren (Beobachtung des Kot- bzw. Urinabsatzes oder des Ausspuckens der Fruchtreste) und bei denen eine Kontamination mit Exkreten anderer Tieren ausgeschlossen werden konnte.

Zur Aufnahme von **Kotproben** wurde ein Einmal-Untersuchungshandschuh benutzt, mit dem der nicht mit dem Waldboden in Kontakt gekommene Anteil des Kots zunächst vom Boden aufgenommen wurde. Dann wurde der Handschuh über den Kot gestülpt, verknotet und beschriftet. Der Transport zum Camp erfolgte auf Eis. Im Camp wurde eine makroskopische Untersuchung jeder Kotprobe auf Beimengungen wie Pflanzenbestandteile, Reste von Beutetieren (Haut, Knochen, Haare usw.), Endoparasiten und andere Besonderheiten durchgeführt. Anschließend wurden von jeder Probe mit Hilfe eines Plastik-Einmalspatels zwei Aliquots in 2 ml-Probenröhrchen überführt, diese beschriftet und in Flüssigstickstoff konserviert. Gefundene Endoparasiten wurden in Alkohol aufbewahrt. Bei ausgewählten Proben erfolgte außerdem ein Vermischen mit 10%igem Glycerin vor dem Einfrieren bei -20°C, um später Bakterienanzuchtversuche durchzuführen. Zu jeder Kotprobe wurden der

Name des Individuums, Datum, Uhrzeit des Kotabsatzes, Uhrzeit der Aufnahme, Uhrzeit der Konservierung in Flüssigstickstoff, Konsistenz und eventuelle Beimengungen notiert.

Der **Urin** der Schimpansen sammelt sich nach dem Absetzen auf am Waldboden liegenden Blättern, von denen er mit einer Mikropipette aufgenommen und direkt in ein Probenröhrchen überführt werden konnte. Die Urinproben wurden ebenfalls auf Eis zum Camp transportiert und dort in Flüssigstickstoff konserviert. Es wurden auch hier der Name des Individuums, Zeit des Urinabsatzes, der Aufnahme und Konservierung sowie die Farbe und evtl. Trübungen, Blutbeimengungen etc. erfasst.

Bei den gesammelten *fruit wadges* handelt es sich um das Fruchtfleisch besonderer Früchte, die von den Schimpansen zwar lange und intensiv gekaut werden, jedoch anschließend nicht abgeschluckt, sondern ausgespuckt werden. Diese Fruchtbrei-Ballen sind mit Speichel durchsetzt und können nach entsprechender Aufarbeitung Aufschluss über die in der Mundhöhle vorkommenden Mikroorganismen geben. Transport und Konservierung erfolgten wie bei den Kot- und Urinproben.

Nach Jagden der Schimpansen auf andere Affenarten wurden **Proben des verzehrten Beutetieres** wie Fleischstücke, Haut oder Blut genommen, die von den Schimpansen zurückgelassen wurden. Diese Proben sollen Aufschluss über mögliche Transspeziesübertragungen zwischen den Schimpansen und den anderen im gleichen Habitat lebenden Primatenarten geben. Insgesamt wurden während des Feldaufenthaltes 400 Kotproben, 150 Urinproben, 120 *fruit wadges* sowie Proben von 23 Beutetieren genommen. Diese Proben stehen für Untersuchungen im Rahmen des Taï-Schimpansenprojekts am Robert Koch-Institut und am Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie zur Verfügung. Für die vorliegende Arbeit wurden sie nicht verwendet.

### **3.2 Beobachtung kranker Schimpansen und Aufnahme klinischer Daten**

Die im Rahmen des Projektes routinemäßig durchgeführten Beobachtungen der Schimpansen erfolgten auf täglicher Basis während der gesamten Wachphase der Tiere, d.h. von Sonnenaufgang bis Sonnenuntergang. Während dieser Zeit wurden Verhaltensbeobachtungen durchgeführt und die unter 3.1 genannten Proben genommen. Sobald ein Tier Anzeichen einer Erkrankung zeigte, wurde ihm gezielt gefolgt und sein Gesundheitszustand genau beobachtet und protokolliert. Es erfolgte eine Beurteilung des Allgemeinbefindens anhand von Körperhaltung, Verhalten, Bewegungsaktivität, Nahrungsaufnahme, Ernährungszustand, Atemfrequenz und äußerem Gesamteindruck. Bei Vorhandensein von Symptomen wurden diese detailliert notiert (z. B. Veränderungen des Atemtyps, Atemgeräusch, Hustenfrequenz,

Charakter und Farbe des Nasenausflusses) und durch Videoaufnahmen dokumentiert. Wenn mehrere Tiere gleichzeitig erkrankt waren, wurden alle zur Verfügung stehenden Mitarbeiter des Projekts mit der Beobachtung der betroffenen Tiere beauftragt, um möglichst vielen der erkrankten Individuen folgen und Daten aufnehmen zu können. Neben der Erfassung des Krankheitsverlaufes beim einzelnen Individuum konnte so beim Auftreten von Epidemien auch ein Bild von deren Ausbreitung und Verlauf gewonnen werden. Durch die gezielte Beobachtung erkrankter Individuen wurde außerdem erreicht, dass im Falle des Todes des Tieres möglichst bald *post mortem* eine Sektion durchgeführt werden konnte.

Als **Dauer der Erkrankung** bei den einzelnen Individuen wurde der Zeitraum angegeben, während dem klinische Symptome bei dem betroffenen Tier zu beobachten waren. Einschränkung gilt hier, dass nicht jedes Einzeltier täglich und kontinuierlich beobachtet werden konnte. In den Fällen, in denen der Beginn oder das Ende der Erkrankung nicht genau bestimmt werden konnte, wurde als Mindesterkrankungsdauer die Anzahl der Tage angegeben, an denen das Tier tatsächlich krank beobachtet wurde. Des Weiteren ist zu bedenken, dass ein Tier möglicherweise trotz bestehender Erkrankung keine offensichtlichen klinischen Symptome zeigte. Dies gilt insbesondere für sehr junge Tiere, die auch bei schwerer Erkrankung oft nur vergleichsweise geringe Symptome zeigten. Überdies wird bei diesen Jungtieren die Beobachtung dadurch erschwert, dass sie meist eng am Körper der Mutter getragen werden.

### 3.3 Epidemiologie

Die Epidemien im August 2005 und Februar 2006 wurden selbst beobachtet und protokolliert. Die Daten zu den vor diesem Zeitraum aufgetretenen Erkrankungen wurden im Rahmen dieser Arbeit erfasst und ausgewertet.

Die Tai-Schimpansen wurden in Anlehnung an Boesch & Boesch-Achermann (2000) in folgende **Altersklassen** eingeteilt: Jungtiere von 0–5 Jahre, Jungtiere von 6–9 Jahre, Subadulte von 10–15 Jahre, Adulte über 15 Jahre. Die Einteilung der Jungtiere in zwei Altersklassen erfolgte vor dem Hintergrund, dass Schimpansen bis zu einem Alter von ca. fünf Jahren von der Mutter gesäugt werden und weitgehend von ihr abhängig sind.

Die **Dauer einer Epidemie** wurde definiert als der gesamte Zeitraum, während dem mindestens bei einem Individuum einer Gruppe klinische Symptome einer respiratorischen Erkrankung beobachtet wurden.

Die zu jedem Krankheitsausbruch angegebene **Gesamtmorbidität** bezieht sich auf die gesamte Dauer der Epidemie und gibt den Prozentsatz der während der Epidemiezeit

erkrankten Tiere an. Die in Abbildung 3 angegebene **Morbidität pro Tag** gibt den jeweiligen Prozentsatz der erkrankten Tiere an einem bestimmten Tag an, bezogen auf die Anzahl der an dem entsprechenden Tag beobachteten Schimpansen. Die Gesamtgruppengröße eignet sich hier nicht als Bezugsgröße, da die Tai-Schimpansen in *fission-fusion*-Gemeinschaften leben, die sich immer wieder in kleinere Untergruppen aufspalten, weshalb häufig nicht alle Tiere an einem Tag beobachtet werden können. Es sind nur Tage dargestellt, an denen mindestens sieben Individuen beobachtet werden konnten. Bei den Epidemien der Südgruppe 2004 standen Morbiditätsdaten nur für Individuen älter als fünf Jahre zur Verfügung.

Die **Mortalität** gibt den Prozentsatz der Todesfälle (Sterberate) innerhalb einer Gruppe während einer Epidemie an und ergibt sich aus der Zahl der Todesfälle, geteilt durch die Gesamtgruppengröße.

Als **Todesfall** aufgrund von respiratorischer Erkrankung wurde jeder Schimpanse einer der Studiengruppen definiert, bei dem vor seinem Tod Symptome einer respiratorischen Erkrankung beobachtet werden konnten und / oder bei dem durch die pathologische und histologische Untersuchung eine respiratorische Erkrankung als Todesursache nachgewiesen werden konnte. Tiere, die während einer Epidemie verschwanden und die möglicherweise an einer respiratorischen Erkrankung starben, bei denen jedoch auch andere Todesursachen nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden zwar erwähnt, aber nicht als Todesfälle aufgrund von respiratorischer Erkrankung betrachtet und nicht in die Mortalitätsraten einbezogen.

### 3.4 Sektionen

Die Durchführung der Sektionen erfolgte unter Einhaltung höchstmöglicher Sicherheitsvorkehrungen so schnell wie möglich nach dem Tod bzw. Auffinden des Tieres direkt an der Fundstelle des Kadavers im Wald. Auf die Durchführung von Sektionen in den Camps wurde aufgrund der Gefahr einer Übertragung potentieller Pathogene auf den Menschen wie auch einer Kontamination der Proben mit vom Menschen stammenden Keimen verzichtet. Der Sektionsplatz wurde mit starker Plastikfolie ausgelegt und zur Abwehr von Fliegen mit einem Moskitonetz abgedeckt. Die Sektionen wurden in entsprechender Schutzkleidung, bestehend aus Ganzkörper-Overall, Plastikschrürze, Ärmelschützer, doppelten Handschuhen, Mundschutz, Gesichtsschutz, Gummistiefeln und Überschuhen, durchgeführt. Eine weitere Person war zur Assistenz und Protokollierung der erhobenen Befunde sowie zur Foto- und Videodokumentation anwesend. Es erfolgte die pathologische Beurteilung aller Organe und die Entnahme von Proben. Nach der Sektion wurden alle Verbrauchsmaterialien verbrannt und der Kadaver in mindestens 50 cm Tiefe vergraben. Die benutzten Gegenstände wurden in

einer Chlorlösung desinfiziert, das Sektionsbesteck nach der Reinigung zusätzlich über einer Flamme und im Ofen hitzesterilisiert. Im Zeitraum von März 2005 bis März 2006 wurden insgesamt zwei Sektionen an gestorbenen Schimpansen selbst durchgeführt, bei einer weiteren erfolgte die pathologisch-anatomische Befundaufnahme in Zusammenarbeit mit F. Leendertz. Des weiteren wurden Sektionen an fünf roten Stummelaffen (*Ptilocolobus badius*), an zwei Campbell's Meerkatzen (*Cercopithecus campbelli*) und an einem Potto (*Perodicticus potto*) selbst durchgeführt. Die genannten kleineren Primatenarten gehören zum Beutespektrum der Schimpansen und wurden unter dem Gesichtspunkt einer Übertragung von Krankheitserregern in die Studie miteinbezogen. Die Untersuchung dieser Proben ist noch nicht abgeschlossen; die vorliegende Arbeit bezieht sich auf die Schimpansensektionsproben. Neben den Proben der im Untersuchungszeitraum gestorbenen Schimpansen wurde Organmaterial von drei weiteren, vor 2005 verstorbenen Schimpansen histologisch untersucht. Die Sektionen an diesen Tieren wurden von den Tierärzten P. Formenty (1999) und F. Leendertz (2004) durchgeführt.

**Tabelle 3:** Während oder kurz nach den respiratorischen Epidemien verstorbene Schimpansen, bei denen weiterführende Untersuchungen durchgeführt wurden.

Schimppanse	Gruppe	Alter [Jahre]	Geschlecht	Todesdatum	Erkrankungsdauer [Tage]	durchgeführte Untersuchungen*
Loukoum	Nord	27	w	Mai '99	6	P, H, PCR
Lefkas	Nord	8	m	Mai '99	10	P, H, PCR
Léonardo	Nord	2	m	Juni '99	~11	P, PCR
Orest	Süd	5	m	März '04	~2	PCR
Ophélia	Süd	0,75	w	März '04	~1	PCR
Virunga	Süd	~39	w	März '04	6	P, H, PCR
Ishas Baby	Süd	0,16	m	Feb. '06	1-2	P, H, PCR
Candy	Ost	~30	w	Feb. '06	min. 9	P, H, PCR
Vasco	Ost	~15	m	Feb. '06	n. b.	P, H, PCR

\* P: pathologisch-anatomische Untersuchung, H: histopathologische Untersuchung,

PCR: Polymerasekettenreaktion; w: weiblich, m: männlich, n. b.: nicht beobachtet

Um eine Einordnung der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen zu ermöglichen, wurden auch die über diese Tiere vorhandenen Informationen zu den klinischen Symptomen, zum Krankheitsverlauf und zur pathologisch-anatomischen Untersuchung aufgeführt. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über alle Tiere, bei denen eine Sektion und weiterführende Unter-

suchungen (Pathologie, Histologie, molekulargenetische Untersuchungen) durchgeführt wurden.

### **3.4.1 Probenentnahme und –konservierung**

Während der Sektionen wurden mehrere Proben (mindestens zwei, bei Leber, Lunge und Milz mindestens vier Aliquots) von jedem Organ entnommen und in Flüssigstickstoff konserviert. Je ein weiteres Aliquot von Leber, Lunge und Milz wurde vor dem Einfrieren in Flüssigstickstoff mit 10%igem Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt sowie eine weitere Probe dieser Organe in RNA later® (Qiagen, Hilden) konserviert und bei –20 °C aufbewahrt. Für die histologischen Untersuchungen wurden Proben jedes Organs in 4%igem Formaldehyd (Carl Roth, Karlsruhe) konserviert. Die in Flüssigstickstoff kryokonservierten Proben wurden auf Trockeneis nach Deutschland transportiert und anschließend am Robert Koch-Institut bei –70 °C gelagert.

### **3.4.2 Histopathologische Untersuchungen**

#### **3.4.2.1 Paraffineinbettung**

Die Organproben der obduzierten Tiere wurden direkt nach der Entnahme in 4%igem neutral gepuffertem Formaldehyd (Carl Roth, Karlsruhe) fixiert. Nach dem Transport nach Deutschland wurden sie im DPZ zugeschnitten und in Einbettkassetten gelegt. Die Paraffineinbettung erfolgte in einem Einbettautomaten (Hypercenter XP, Shandon, Frankfurt am Main). Die Proben wurden zunächst für 2 Stunden mit entmineralisiertem Wasser bei Raumtemperatur unter Vakuum gewässert. Anschließend durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe (50%iges, 70%iges, 80%iges, 96%iges, 96%iges, 100%iges, 100%iges Ethanol für jeweils 45 min bei 35 °C) zur Entwässerung. Die Proben kamen dann zweimal für 1,5 bzw. 1 Stunde bei Raumtemperatur und unter Vakuum in Chloroform. Zum Schluss wurden sie zweimal für jeweils 1,5 Stunden bei 60 °C unter Vakuum in Paraffin überführt.

#### **3.4.2.2 Anfertigung von Gewebeschnittpräparaten**

Die Gewebeschnitte wurden an einem Schlittenmikrotom (Mikrotom HM 400R, Microm, Walldorf) angefertigt. Die ca. 4 µm dicken Schnitte wurden mit Hilfe eines in einem Eisbad angefeuchteten Durchschlagpapierstreifens vom Paraffinblock abgenommen und in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt. Die Schnitte wurden dann auf einen unbehandelten Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **3.4.2.3 Färbungen für die histopathologische Untersuchung**

Die Hämalaun & Eosin-Färbungen (HE) erfolgten im Färbeautomat (Varistain Gemini, Shandon, Frankfurt am Main). Neben dieser Übersichtfärbung wurden an ausgewählten Organschnitten mehrere Spezialfärbungen nach den im Anhang aufgeführten Protokollen durchgeführt, so die Giemsa-Färbung zum Nachweis von Bakterien, die Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Reaktion zur Darstellung von neutralen Mukopolysacchariden und zum Nachweis von Pilzen und Hefen, die Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis säurefester Stäbchen sowie die Berliner-Blau-Färbung zum Nachweis von Eisen. Eine Übersicht über die histologischen Färbungen gibt Tabelle 4.

### **3.4.2.4 Lichtmikroskopische Auswertung und Dokumentation**

Für die lichtmikroskopische Auswertung der gefärbten Schnitte in Zusammenarbeit mit Frau K. Mätz-Rensing wurde das Mikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Die photographische Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera (Power Shot A95, Canon, Amsterdam) und des Computerprogramms analySIS auto (Soft Imaging Systeme GmbH, Münster).

**Table 4:** Übersicht über die histopathologisch beurteilten Sektionsproben und die durchgeführten Färbungen

	<b>Candy</b>	<b>Ishas Baby</b>	<b>Vasco</b>	<b>Virunga</b>	<b>Loukoum</b>	<b>Lefkas</b>
Lunge	BB, Gi, HE, PAS, ZN	Gi, HE, PAS, ZN	Gi, HE, PAS	Gi, HE, PAS, ZN	HE	Gi, HE, PAS, ZN
Trachea	Gi, HE, PAS	Gi, HE, PAS		Gi, HE, PAS		
Kehlkopf	HE			Gi, HE, PAS		
Leber	BB, HE	HE	HE	Gi, HE, PAS	HE	HE
Milz	Gi, HE	HE	HE	HE	HE	HE
Herz	BB, HE	Gi, HE, PAS	HE	Gi, HE, PAS	HE	HE
Speicheldrüse	BB, Gi, HE					
Magen	HE	HE	HE	BB, HE, ZN	HE	
Dünndarm	Gi, HE	HE	HE	BB, Gi, HE, PAS, ZN	HE	
Dickdarm	BB, HE	HE	HE	BB, HE, Gi, PAS, ZN	HE	
Niere	BB, HE	HE	HE	HE	HE	HE
Nebenniere		HE				
Harnblase		HE				
Thymus		HE				
Lymphknoten	BB, HE	Gi, HE, PAS	HE			HE
Tonsillen	HE	HE				
Zungengrund	HE	Gi, HE, PAS				
Großhirn	HE					
Meningen	HE					
Uterus	HE					
Hoden		Gi, HE, PAS				
Prostata		Gi, HE, PAS				
Muskulatur	HE	HE			HE	
Haut	HE	HE	HE	HE	HE	

BB: Berliner-Blau-Färbung, Gi: Giemsa-Färbung, HE: Hämalaun & Eosin-Färbung,

PAS: Periodic-Acid-Schiff-Reaktion, ZN: Ziehl-Neelsen-Färbung,

Leerstellen: kein Probenmaterial vorhanden



### **3.4.3 Rachenabstriche von Mitarbeitern**

Um der Frage einer eventuellen Übertragung von Krankheitserregern vom Menschen auf die Schimpansen nachzugehen, wurde das Spektrum der im Rachenraum vorhandenen Erreger bei den Mitarbeitern des Tai-Schimpansenprojekts erfasst. Zu diesem Zweck wurden während der respiratorischen Epidemien unter den Schimpansen 2004, 2005 und 2006 Rachenabstriche von den im Projekt arbeitenden Menschen genommen. Ein Watteträger, bestehend aus einem Plastik- oder Holzstiel mit am unteren Ende befindlichem Wattetupfer, wurde mehrmals an der Schleimhaut von Rachen und Backentasche entlang geführt und mehrere Minuten lang in der Backentasche gehalten und bewegt, so dass Speichel und Schleimhautzellen aufgenommen wurden. Unmittelbar danach wurde das Wattestübchen unter Entfernung des oberen Stielendes in ein Kryoröhrchen gegeben und direkt in Flüssigstickstoff konserviert. War eine unmittelbare Kryokonservierung aus logistischen Gründen nicht möglich, wurden die Proben in RNAlater<sup>®</sup> konserviert. Der Transport der Proben nach Deutschland erfolgte auf Trockeneis, anschließend wurden sie bis zur Aufarbeitung bei  $-70\text{ °C}$  gelagert.

#### **3.4.3.1 Aufarbeitung der Rachenabstriche**

Zur Aufarbeitung der tiefgefrorenen Rachenabstriche wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend der Stiel des Wattestübchens mit einer sterilen Pinzette erfasst und so weit aus dem Röhrchen gezogen, dass nur noch der am unteren Ende befindliche Wattetupfer in dem Röhrchen verblieb. Dann wurden 3 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco BRL<sup>®</sup>, Eggenstein) über den Wattetupfer in das Röhrchen pipettiert, der Wattetupfer im Medium bewegt und mehrmals am Rand des Röhrchens ausgedrückt. Anschließend wurde der Stiel des Wattestübchens mit einer sterilen Schere abgeschnitten und der Wattetupfer im Medium intensiv gevortext. Für jede Probe wurde neues, steriles Instrumentarium verwendet. Die so gewonnenen Lösungen wurde direkt als Ausgangsmaterial für die Nukleinsäure-Extraktion sowie nach Sterilfiltration für die Anzuchtversuche in der Zellkultur eingesetzt.

## **3.5 Molekulargenetische Methoden**

### **3.5.1 Nukleinsäure-Extraktion aus Rachenabstrichen**

Die Extraktion von RNA erfolgte entsprechend den Vorschriften des Herstellers mit dem QIAquick<sup>®</sup>Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden), mit dem parallel auch DNA extrahiert wird. Eluiert wurde mit 2 x 40 µl RNase freiem Wasser (Fluka, Schweiz).

### 3.5.2 cDNA Synthese

Die extrahierte RNA wurde mit Hilfe des Superscript 1st Strand cDNA Synthesis Kits (Invitrogen<sup>TM</sup>, Karlsruhe) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dazu wurden Random Hexamer Primer (Metabion, Martinsried) eingesetzt. Das Produkt wurde bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 3.5.3.1 Untersuchung humaner Rachenabstriche auf Viren

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1986) wurden die Rachenabstriche auf das Vorhandensein von Nukleinsäuren der in Tabelle 5 aufgeführten Viren untersucht. Dazu wurden am RKI etablierte PCR-Systeme verwendet, wobei sowohl konventionelle als auch Real-Time PCR (TaqMan<sup>TM</sup>) (Heid et al. 1996) zum Einsatz kamen (siehe Tabelle 5). Die Untersuchungen der Rachenabstriche auf PIV-1-3, HMPV, humanes Herpesvirus-7 (HHV-7) und Enteroviren wurden selbst durchgeführt, die übrigen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Robert Koch-Instituts.

Die Untersuchungen auf HHV-7 dienten dazu, einen Anhaltspunkt für den Erfolg der Probenaufarbeitung und Nukleinsäureextraktion zu erhalten. Dieses  $\beta$ -Herpesvirus ist ein weitverbreitetes Pathogen mit einer hohen Seroprävalenz in der Bevölkerung und kann häufig im Speichel gesunder Erwachsener nachgewiesen werden (Tanaka-Taya et al. 1996).

**Table 5:** Untersuchung der humanen Rachenabstriche auf Viren und dazu verwendete PCR-Methoden

Virus	Methode	Erregerspektrum	Referenz
Adenovirus*	Real-time PCR	human	(Chmielewicz et al. 2005)
Enterovirus*	Real-time PCR	human	(Pusch et al. 2005)
	nested PCR	human	(Pusch et al. 2005)
HHV-7	Real-time PCR	human	Ellerbrok et al. unveröff.
HMPV	Real-time PCR	human	Finsterbusch et al. unveröff.
Influenzavirus*	Real-time PCR	Influenza AH1, AH3, B	(Schweiger et al. 2000)
PIV-1-3	nested PCR	human	Schweiger et al. unveröff.
RSV*	Real-time PCR	human	Schweiger et al. unveröff.

\* in Zusammenarbeit mit B. Schweiger, RKI Berlin

Die PCR zur Detektion von Parainfluenzavirus wurde nach dem in Tabelle 6 dargestellten Protokoll durchgeführt. Die PCR-Bedingungen zeigt Tabelle 7. Die Real-time PCR zur Detektion von HHV-7 und HMPV wurde mit dem ABI Prism<sup>TM</sup> 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die PCR-Protokolle sind in Tabelle 8 und 9 dargestellt, die Bedingungen der Real-time PCR in Tabelle 10. Protokoll und Bedingungen der durchgeführten nested PCR zum Nachweis von Enteroviren sind Tabelle 11 und 12 zu entnehmen. Eine Übersicht über alle verwendeten Primer gibt Tabelle 13 .

**Tabelle 6:** PCR-Protokoll Parainfluenza

Für die nested PCR wurden 2 µl des PCR-Produkts eingesetzt.

NH <sub>4</sub> -PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0 µl
Forward Primer 1 (25 mM)	0,3 µl
Reverse Primer 1 (25 mM)	0,3 µl
Forward Primer 2 (25 mM)	0,3 µl
Reverse Primer 2 (25 mM)	0,3 µl
Forward Primer 3 (25 mM)	0,3 µl
Reverse Primer 3 (25 mM)	0,3 µl
Platinum Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25µl
Template (cDNA)	4,0 µl
Aqua bidest	ad 25 µl

**Tabelle 7:** PCR-Bedingungen Parainfluenza

Bei der nested PCR betrug die Annealingtemperatur 58 °C und es wurden 35 Zyklen durchlaufen.

94 °C	300 s	
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	40 x
72 °C	90 s	
72 °C	300 s	

**Tabelle 8:** Real Time PCR-Protokoll HMPV

NH <sub>4</sub> -PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (2,5mM)	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0µl
F4 (10µM)	0,7 µl
R9 (10µM)	0,7 µl
F4-Inosin (10µM)	0,7 µl
R9-Inosin (10µM)	0,7 µl
Sonde (10 µM)	0,25 µl
Rox (10 µM)	0,25 µl
Platinum Taq-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
Template (cDNA)	5,0 µl
Aqua bidest	ad 25 µl

**Tabelle 9:** Real-Time PCR-Protokoll HHV-7

NH <sub>4</sub> -PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (2,5mM)	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0µl
Forard Primer (10 µM)	0,75 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,75 µl
Sonde (10 µM)	0,25 µl
Rox (10 µM)	0,25 µl
Platinum Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl
Template (cDNA)	2,0 µl
Aqua bidest	ad 25 µl

**Tabelle 10:** Real-Time PCR- Bedingungen HMPV und HHV-7

95 °C	120 s	
95 °C	15 s	
60 °C	60 s	45 x

**Tabelle 11:** PCR-Protokoll Enteroviren

Für die nested PCR wurden 2 µl des PCR-Produkts eingesetzt.

NH <sub>4</sub> -PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0 µl
Forward Primer (25 mM)	1,5 µl
Reverse Primer (25 mM)	1,5 µl
Platinum Taq-Polymerase (5U/µl)	0,15µl
Template (cDNA)	3,0 µl
Aqua bidest	ad 25 µl

**Tabelle 12:** PCR- Bedingungen Enteroviren

95 °C	300 s	
95 °C	30 s	
42 °C	30 s	35 x
72 °C	60 s	
72 °C	900 s	

**Tabelle 13:** verwendete Primer und Sonden zu den in Tabelle 5 genannten Methoden

F: Forward, R: Reverse

Bezeichnung	Sequenz	Annealing-Temp.
<b>HHV-7</b>		
P1 F	5' CACAAAAGCGTCGCTATCAA	60 °C
P2 R	5' TGTCATTACTCCAGTGA CTTC CG	60 °C
S1 Sonde	5'6-Fam ATCGACACCCATCAXTACACGAAGCC	60 °C
<b>HMPV</b>		
F4	5' ACCTTGCTTAAGGAATCATCAGG	60 °C
R9	5' GTCCCACTTCTATGGTTGATGCTAG	60 °C
F4-Inosin	5' ACCTTGCTTAAGGAATCATCAGG	60 °C
R9-Inosin	5' GTCCCACTTCTATGGTTGATGCTAG	60 °C
Sonde	5' 6-Fam TCAGCACCAGACACACC	60 °C
<b>Parainfluenzavirus</b>		
PIV1-748 F1	5' CCTTAAATTCAGATATGTAT	50 °C
PIV1-1225 R1	5' GATAAATAATTATTGATACG	50 °C
PIV2-803 F2	5' AACAACTCTGCTGCAGCATT	50 °C
PIV2-1310 R2	5' ATGTCAGACAATGGGCAAAT	50 °C
PIV3-762 F3	5' CTGTAAACTCAGACTTGGTA	50 °C
PIV3-1239 R3	5' TTTAAGCCCTTGTCAACAAC	50 °C
nested PCR		
PIV1-780 F1	5' CCGGTAATTTCTCATACTATG	58 °C
PIV1-1096 R1	5' CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG	58 °C
PIV2-845 F2	5' CCATTTACCTAAGTGATGGAAT	58 °C
PIV2-1048 R2	5' GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA	58 °C
PIV3-884 F3	5' ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT	58 °C
PIV3-1060 R3	5' CCCTGGTCCAACAGATGGGT	58 °C
<b>Enteroviren</b>		
EntV1 F	5' CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	42 °C
EntV2 R	5' ATTGTCACCATAAGCAGCCA	42 °C
nested PCR		
EntV5 F	5' TACTTCGAGAAACCYAGTA	42 °C
EntV80 R	5' AACACGGACACCCAAAGTA	42 °C

### 3.5.3.2 Untersuchung von Schimpansen-Lungenproben auf Viren

Die Untersuchungen der Lungengewebeproben von verstorbenen Schimpansen auf die genannten respiratorischen Viren wurden am RKI, Berlin von der Arbeitsgruppe B. Schweiger und von N. Ernst und S. Köndgen mit den in Tabelle 5 aufgeführten Methoden durchgeführt. Die Gewebeproben wurden außerdem auf Masernvirus (Santibanez et al. 1999) untersucht.

### 3.5.3.3 Untersuchung auf Bakterien

Die Untersuchungen der Rachenabstriche sowie der kryokonservierten Schimpansen-Lungenproben auf bakterielle respiratorische Erreger wurden am RKI, Berlin von M. Leider durchgeführt. Dazu wurden Primer eingesetzt, die auf die hochkonservierte 16S ribosomale DNA-Region des bakteriellen Genoms gezielt sind (Muyzer et al. 1993). Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Topo TA Cloning Kits (Invitrogen<sup>TM</sup>) kloniert und selektierte Klone anschließend mit dem Sequenziergerät ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Didesoxymethode (Sanger et al. 1977) sequenziert. Zum Nachweis von *Streptococcus pneumoniae* wurden auf Gene speziesspezifischer Virulenzfaktoren gerichtete Primer eingesetzt (Chi et al. 2007). Neben den molekulargenetischen Untersuchungen wurden auch Anzuchtversuche zum bakteriologischen Erregernachweis auf Blutagar vorgenommen.

### 3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in 1,5 - 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose (peQ GOLD Universal Agarose, peQLab, Erlangen) in TAE-Puffer kochend gelöst und in eine Gelelektrophorese-Kammer (Horizon 58, Gibco BRL<sup>®</sup>, Eggenstein) gegossen. Fünf µl einer Probe wurden mit glycerinhaltigem Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingebracht. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Molekulargewichts-Standard verwendet. Die Auftrennung erfolgte in 30-60 Minuten durch Anlegen einer 95 V Spannung. Die ethidiumbromidgefärbten Fragmente wurden unter UV-Licht der Wellenlänge 300 nm auf einem Transluminator (Herolab EASY RH-3, Herolab, Wiesloch) sichtbar gemacht und durch ein Videodokumentationssystem (Herolab, Wiesloch) aufgezeichnet.

## **3.6 Kultureller Virusnachweis**

### **3.6.1 Zellkulturtechnik**

Parallel zu den angewendeten molekulargenetischen Methoden wurde auch die kulturelle Virusdiagnostik bei allen trocken kryokonservierten Proben durchgeführt. Um bei den Anzuchtversuchen ein möglichst breites Spektrum an respiratorischen Viren abzudecken, wurden die Zelllinien A549 (humane Lungenkarzinomzellen, ECACC-Nr.: 86012804) und LLC-MK2 (Rhesusaffen-Nierenzellen, ATCC-Nr.: CCL-7) ausgewählt. Letztere gelten als besonders geeignet zur Anzucht von HMPV (Boivin et al. 2002). Da ein zu HMPV homologes Paramyxovirus bei einigen der an respiratorischen Erkrankungen gestorbenen Schimpansen nachgewiesen wurde, war es von besonderem Interesse herauszufinden, ob dieses Virus auch bei den mit den Schimpansen arbeitenden Menschen vorhanden ist.

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Dauerzelllinien. Die Zellen wurden als Monolayer-Kulturen in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wurde D-MEM mit 10% fetalem Kälberserum (FKS, Gibco BRL<sup>®</sup>, Eggenstein), 1% L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) und 1% Antibiotikum (Penicillin / Streptomycin, PAA, Pasching) verwendet. Für die LLC-MK2-Zellen wurden dem Medium zusätzlich 0,08% Trypsin (PAA, Pasching) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in einem Zellkultur-Inkubator (Heraeus, Hanau). Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu erfolgte eine Ablösung der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (1:2). Die abgelösten Zellen wurden mit frischem Medium im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen überführt.

### **3.6.2 Inokulation und Passagierung der Zellkulturen**

#### **3.6.2.1 Inokulation mit Material aus Rachenabstrichen**

Am Vortag der Inokulation wurden  $4 \times 10^4 / \text{cm}^2$  LLC-MK2-Zellen bzw.  $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$  A549-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, so dass am Tag der Inokulation eine Konfluenz von 70-80% vorlag. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (Telaval 31, Zeiss, Oberkochen) bestimmt. Die Inokulation erfolgte in Doppelansätzen auf zwei verschiedenen Zelllinien. Pro Probe und Zelllinie wurde eine Platte verwendet, zwei Negativkontrollen pro Zelllinie wurden auf je einer gesonderten Platte mitgeführt. Je 1000 µl der aufgearbeiteten Rachenabstrich-Probe (siehe 3.4.3.1) wurden durch einen 0,2 µm-Spritzenfilter (FP 30 / 0,2 CA-S, Schleicher & Schuell) filtriert. Von diesem Filtrat wurden pro Ansatz 250 µl sowie 250 µl D-MEM ohne Zusätze auf die Zellkultur gegeben und eine



Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 1500 µl Medium (D-MEM mit 5% FKS, 1% L-Glutamin und 1% Antibiotikum; bei LLC-MK2 zusätzlich mit 0,08% Trypsin) aufgefüllt. Die Zellkulturen wurden für sieben Tage bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in einem Inkubator kultiviert und täglich makroskopisch und mikroskopisch (32fache, 100fache und 200fache Vergrößerung) auf Veränderungen und virusinduzierte zytopathische Effekte (ZPE) hin untersucht.

### **3.6.2.2 Passagierung**

Der Zellkulturüberstand jedes Ansatzes wurde zwei Mal auf frische Zellen passagiert. Die Passagen erfolgten jeweils am siebten Tag nach der Infektion. Dazu wurden auf die wie oben beschrieben am Vortag ausgesäten frischen Zellen nach Abnehmen des Mediums und Spülen mit PBS je 500 µl des Überstands gegeben, eine Stunde inkubiert und anschließend mit 1500 µl Medium aufgefüllt.

Da der für HMPV charakteristische ZPE erst nach einer mittleren Inkubationszeit von 17 Tagen auftritt (Boivin et al. 2002), erfolgten bei den LLC-MK2-Zellkulturen zusätzlich zwei Passagen der inokulierten Zellen an Tag 7 und Tag 14 nach der Inokulation. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit frischem Medium in ein größeres Zellkulturbehältniss überführt (von 24-Well-Platten auf 6-Well-Platten, von 6-Well-Platten auf 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen). Die Zellen wurden so insgesamt für 21 Tage kultiviert.

### **3.6.3 Ernte der Zellkultur**

Von jeder Zellkultur wurde nach Ablauf der 7- bzw. 21tägigen Kultivierung eine Rückstellprobe erstellt, indem der Überstand der Doppelansätze bis auf einen den Zellrasen eben bedeckenden Rest abgenommen und vereinigt wurde. Die Zellen wurden mit dem restlichen Medium für zehn Minuten bei -70 °C gefroren, um die Zellen zu lysieren. Danach wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze abgeschabt und zum Überstand gegeben. Die Proben wurden aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

## **3.7 Geräte und Reagenzien**

Die verwendeten Geräte und Reagenzien sind, sofern nicht im Text genannt, im Anhang aufgelistet.