Aus dem Institut für Ärztliche Mikrobiologie und Immunologie
der Karls-Universität in Prag
(Direktor: Prof. Dr. F. Patočka)

Ein Purifikat des Virus der Teschener Krankheit der Schweine (Encephalomyelitis enzootica suis) im Elektronenmikroskop

von

Dr. V. Kubelka und Prof. Dr. F. Patočka

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 24. Juli 1954)

Die elektronenoptische Darstellung der kleinsten pathogenen Virusarten von Menschen und Tieren ist dadurch besonders erschwert, daß im Gewebe gewöhnlich verschiedene makromolekulare Komponenten gefunden werden, die in Größe und Form diesen Virusarten ähneln und dadurch eine richtige Interpretation der Bilder erschweren.

Daher wurde eine elektronenoptische Darstellung der Viren der menschlichen und tierischen Poliomyelitiden nur selten publiziert. Das Virus der Schweinelähmung ist – soweit uns bekannt – noch nicht dargestellt worden.

Von den verwandten Virusarten demonstrierten Gollan und Marvin (1) das Virus der Mäusepoliomyelitis Stamm MM. Es wurde in einer langfristigen Prozedur hauptsächlich durch Alkoholpräzipitation bearbeitet. Die Virusteilchen waren sphärisch und leicht asymmetrisch und hatten einen Durchmesser von 12–20 mμ.

Sven Gard und Tiselius (2) veröffentlichten im Jahre 1942 elektronenoptische Bilder, die das Theiler-Virus der Mäuselähmung als dünne, 15 mμ breite und 580–2150 mμ lange Fäden – je nachdem, ob das Material aus dem Gehirn oder aus dem Stuhl stammt – in Form von Ästen und Netzen darstellen. Wyckoff nimmt an, daß diese Fäden bakterielle Geißeln sind. Ähnliche Fäden wurden von den genannten Autoren auch aus dem Stuhle gesunder weißer Ratten, Mäuse und Menschen isoliert. Später stellte Gard (3) auch bei menschlichen Poliomyelitiden ähnliche Bilder fest.

Im Jahre 1946 fanden Loring, Marton und Schwerdt (4) in Mäusegehirnen das Virus der Kinderlähmung Stamm Lansing als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 12–34 mμ, also von recht verschiedener Größe. Kausche (5) gibt im Jahre 1948 für den Lansingstamm ebenfalls sphärische Teilchen an. 2 Jahre später erzielten Reagan, Schenck und Brückner (6) elektronenoptische Bilder des Brunhilde-Stammes der Kinderlähmung aus

einer zunächst filtrierten und dann lange Zeit bei 50000 U/min zentrifugierten Affenrückenmarksuspension. Die 20–50 mμ großen, leicht sphärischen und asymmetrischen Teilchen waren dem Lansingstamme ähnlich. Einige Fadenformen wurden auch gefunden.

Im Jahre 1951 publizierten dieselben Autoren (7) Abbildungen, die den Stamm Leon in Form von kleinen, 12–15 mμ breiten und etwa 30 mμ langen Stäbchen darstellen.

Viel besser sind Purifikation und elektronenoptische Darstellung etwas größerer Virusarten gelungen, zum Beispiel die der Erreger der östlichen und westlichen Pferdeencephalomyelitis. Es wurden runde oder ovoide, ziemlich uniforme Partikel mit einem Durchmesser von etwa 40 mμ gefunden.

Die Purifikationsmethodik, die wir zur endgültigen Darstellung des Virus der Schweinelähmung benutzten, ist eine Kombination einiger Reinigungsmethoden, die wir systematisch seit dem Jahre 1949 durchgearbeitet haben.

In unseren systematischen Studien der biologischen und immunologischen Eigenschaften des Virus der Teschener Schweinelähmung (8, 9, 10) haben wir eine Reihe von Eigenschaften dieses Virus festgestellt, deren Aufklärung Voraussetzung unserer kombinierten Methodik wurde, und zwar war es vor allem die Feststellung einer fast absoluten Ätherresistenz des Virus [siehe auch Sven Gard (11)], weiter die große Toleranz gegen niedrige p_H-Werte, bei denen sich das Virus präzipitieren läßt, die Fähigkeit der Elution des Virus bei alkalischer Reaktion. Außerdem wurden die Möglichkeiten der Präzipitation durch Methylalkohol und die der Elution des Präzipitats in destilliertem Wasser untersucht und endlich auch die gute Resistenz gegen wiederholtes Gefrieren und Auftauen.

Methodik: Das Rückenmark eines intrazerebral infizierten, zu Beginn der paralytischen Symptome, also in dem Stadium, in dem nach unseren Feststellungen das Maximum an Virus vorhanden ist (8), getöteten Schweines wurde in einer gekühlten Turmixapparatur bei 12000 U/min in eine 20%ige Suspension gebracht und über Nacht bei — 60° C in einer Menge von 200 ccm aufbewahrt.

Am nächsten Tage wurde die Suspension 5mal aufgetaut und wieder gefroren und dann bei 3000 U/min abzentrifugiert. Aus dem Überstehenden wurden die Lipoide durch Behandlung mit der gleichen Menge Äther entfernt und dann 30 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Die flüssige Ätherschicht sowie die feste lipoide Schicht wurden verworfen, die wässerige Phase im Vakuum deätherisiert und im Kühlschrank bei — 60°C über Nacht aufbewahrt. Das durch Zentrifugation bei 3000 U/min am folgenden Tag entstandene Sediment wurde verworfen, der Überstand einer sauren Präzipitation in der Weise unterworfen, daß das p_H mittels 1 Mol Essigsäure auf 4 gebracht wurde. Das Gemisch wurde im Kühlschrank bei 4° C 30 Minuten lang aufbewahrt, dann bei 3000 U/min zentrifugiert und das Überstehende vernichtet. Das Sediment wurde in einer Pufferlösung von p_H 8 in einem Zehntel des früheren Volumens resuspendiert und das Ganze auf p_H 8 gebracht. Anschließend folgte eine neue Zentrifugation bei 3000 U/min, nach der das Sediment verworfen und das eluierte Virus auf 1° C abgekühlt wurde. Unter steter Kontrolle des Thermometers wurde dann tropfenweise auf — 30° C abgekühlter Methylalkohol zugegeben, bis die Gesamtmenge des Alkohols 25% der Suspension betrug. Die Temperatur durfte niemals über 3° C steigen. Das entstehende Präzipitat wurde bei —15° C aufbewahrt. Alsdann wurde das Gemisch 20 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in einem Gemisch von 40 ccm destilliertem Wasser und 10 ccm Alkohol gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment wurde in 3 ccm

redestilliertem Wasser resuspendiert und über Nacht bei —60° C eingefroren. Nach dem Auftauen am nächsten Tage wurde durch kurze Zentrifugation bei 3000 U/min eine wasserklare Flüssigkeit erhalten.

Diese Methode ist zwar relativ kompliziert, jedoch konnten wir im Hinblick auf die verschiedene Stabilität der normalen Gewebsproteine damit rechnen, daß es in der bearbeiteten Rückenmarksuspension außer dem Virus kaum andere makromolekularen Komponenten geben könnte, die, ohne früher oder später zu denaturieren und aus der Suspension auszufallen, alle genannten Bearbeitungsstadien überdauern könnten.

Zur Kontrolle wurde nach der gleichen Methode neben dem infektiösen Rükkenmark auch die Rückenmarksuspension von einem gesunden Schwein bearbeitet.

Das Purifikat aus dem infektiösen Rückenmark wurde experimentell auf seinen Virusgehalt untersucht und zu diesem Zwecke 2 Ferkeln mit je 0,7 ccm intrazerebral injiziert. Beide Schweine erkrankten typisch an Schweinelähmung, das eine nach 8 Tagen, das andere nach einer 9tägigen Inkubationszeit. Die histologische Untersuchung der geschlachteten Tiere ergab den für Schweinelähmung typischen Befund. Gleichzeitig wurden beide Purifikate — das aus dem infektiösen und das aus normalem Rückenmark — zur weiteren elektronenoptischen Untersuchung auf Kolloidmembranen gebracht.

Dieses Experiment bestätigte unsere bei früheren Untersuchungen gemachten Erfahrungen, daß die Purifikation mit der Suspension eines infizierten Rückenmarks besser vor sich geht als mit der eines normalen und daß es mit der ersteren leichter gelingt, wasserklare Endprodukte zu erhalten, was wohl auf die Verschiedenheit der chemischen Konstitution oder der kolloiden Stabilität der Lipoproteine zurückzuführen ist.

Aus den beigefügten elektronenoptischen Abbildungen (s. Tafel VII—X) ist zu ersehen, daß das Präparat aus den nichtinfizierten Geweben außer ganz amorphen Teilchen von Gewebstrümmern und kleinen, wenig dichten Gebilden, größtenteils auch ohne genaue Kontur, nichts enthält, was man als Viruspartikel bezeichnen könnte. Dagegen kann man im infizierten Gewebe eine große Menge sphärischer bis leicht ovoider Gebilde erkennen, die meistens sehr regelmäßig sind und stellenweise die Tendenz zeigen, sich anzuhäufen. Die sphärischen Gebilde sind ziemlich kompakt und undurchlässig für Elektronen. Man könnte sie in 3 Gruppen einteilen mit einem Durchmesser von rund 25 mμ für die kleinsten und 50—60 mμ für die größten. Ihre Zahl, Dichte und Regelmäßigkeit lassen keinen Zweifel daran zu, daß es sich um Teilchen handelt, die im normalen Gewebe nicht zugegen sind und die in unserem Falle höchstwahrscheinlich Virusteilchen der Enzephalomyelitis enzootica suum vorstellen.

Noch anschaulicher sind diese Teilchen im mit Beryllium schräg bedampften Präparat. Sie lassen klar erkennen, daß es sich um ein Virussubstrat handelt, das z. B. den elektronenoptischen Abbildungen des Virus Polio Typ Brunhilde, wie sie von Reagan, Schenck und Brückner (6) publiziert wurden, sehr ähnlich ist.

Diskussion

Die elektronenoptische Darstellung der Viruspartikel der Poliomyelitisgruppe ist — wie allgemein bekannt — sehr erschwert. Bis vor kurzem war es sogar

zweifelhaft, ob es überhaupt möglich wäre, dieselben auf diese Weise von verschiedenen Ballastpartikeln zu differenzieren. Heute zweifelt jedoch die Mehrheit der Autoren nicht mehr daran, daß Abbildungen erzielt worden sind, die uns über die Größe und Form dieser Virusarten Aufschluß geben [Koprowski (13)]. Einige Publikationen wurden eingangs angeführt. Die Virusteilchen haben eine sphärische oder fast sphärische Form. Erwähnt werden muß noch die Feststellung von Leyon und Gard (12), nach der auch das Virus der Mäuseencephalomyelitis Typ FA sphärisch ist und einen Durchmesser von 30 mμ hat.

Soweit uns bekannt ist, wurde das Virus der Schweinelähmung bisher elektronenoptisch nicht dargestellt. Im Hinblick auf die Tatsache, daß die biologischen Eigenschaften dieses Erregers – wie an anderer Stelle ausgeführt (8, 9) – vieles Gemeinsame mit denen des Virus der menschlichen Polio und mit denen des Theiler-Virus der Mäuseencephalomyelitis haben, konnte man annehmen, daß auch die elektronenoptische Form des Erregers der Schweinelähmung der der beiden genannten Virusarten ähnlich sein würde.

Wie schon erwähnt, sind diese elektronenoptischen Abbildungen das Ergebnis einer langjährigen Prüfung von Methoden, die zur Purifikation des Virus führen könnten. Das Präparat, das zur elektronenoptischen Bearbeitung Verwendung fand, war optisch wasserklar und biologisch gemessen ebenso aktiv wie eine virushaltige Suspension in einer Verdünnung von 10^{-2}. Es mußte also ein größeres Quantum an Virus enthalten, was wohl der Menge der im Präparat gesehenen sphärischen Partikel entsprechen würde.

Es hält schwer, sich vorzustellen, daß diese Partikel in einem so wirksamen Präparat etwas anderem als dem Virus selbst entsprechen könnten, um so mehr, als in einem nach der gleichen Methode verarbeiteten nichtinfektiösen Material ähnliche Partikel nicht gefunden wurden. Was die Zusammenballung von Virusteilchen anbetrifft, die stellenweise Teilchen besonderer Größe vortäuscht, so dürfen wir auf die Feststellung von Ruska hinweisen, nach der eine solche Anhäufung von Viruspartikeln durch Austrocknen des Präparates zustande kommt. Der letzte Grund, der uns zu der Annahme zwingt, daß unsere elektronenoptisch dargestellten sphärischen Teilchen mit dem Virus der Schweinelähmung identisch sind, ist der, daß ihre Größe – sie übertrifft nur um ein geringes die des Virus der menschlichen Poliomyelitis – der entspricht, die wir für das Virus der Encephalomyelitis suum durch die Filtrationsmethode festgestellt haben.

Zusammenfassung

Die Autoren beschreiben elektronenoptische Aufnahmen des Virus der Schweinelähmung (Encephalomyelitis enzootica suum), die in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. Wolf von der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften hergestellt wurden. Zur Abbildung gelangte ein Purifikat, das aus dem Rückenmark intrazerebral infizierter, zu Beginn der paralytischen Symptome geschlachteter Schweine stammte.

Zur Purifikation fand eine kombinierte Methodik Verwendung, die darin bestand, daß die Rückenmarksuspension zunächst wiederholt gefroren und wieder aufgetaut, die Lipoide durch Behandlung mit Äther entfernt, bei p_H 4 einer sauren Präzipitation unterworfen, in einem Zehntel des Inhaltes eluiert,

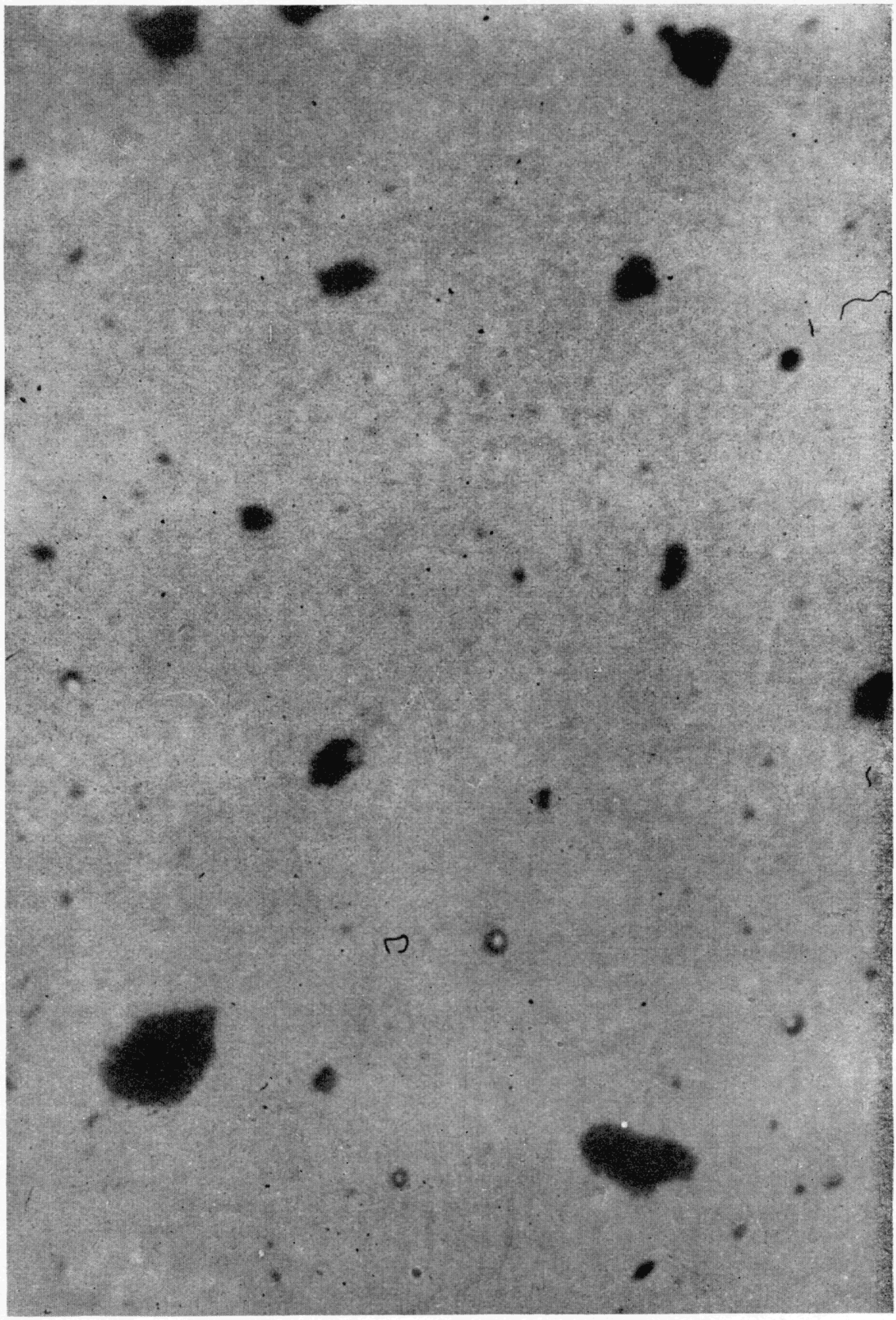

Abb. 1. Purifikat eines nichtvirushaltigen Rückenmarks. Elektronenoptische Darstellung von Prof. J. Wolf. 1:40000.

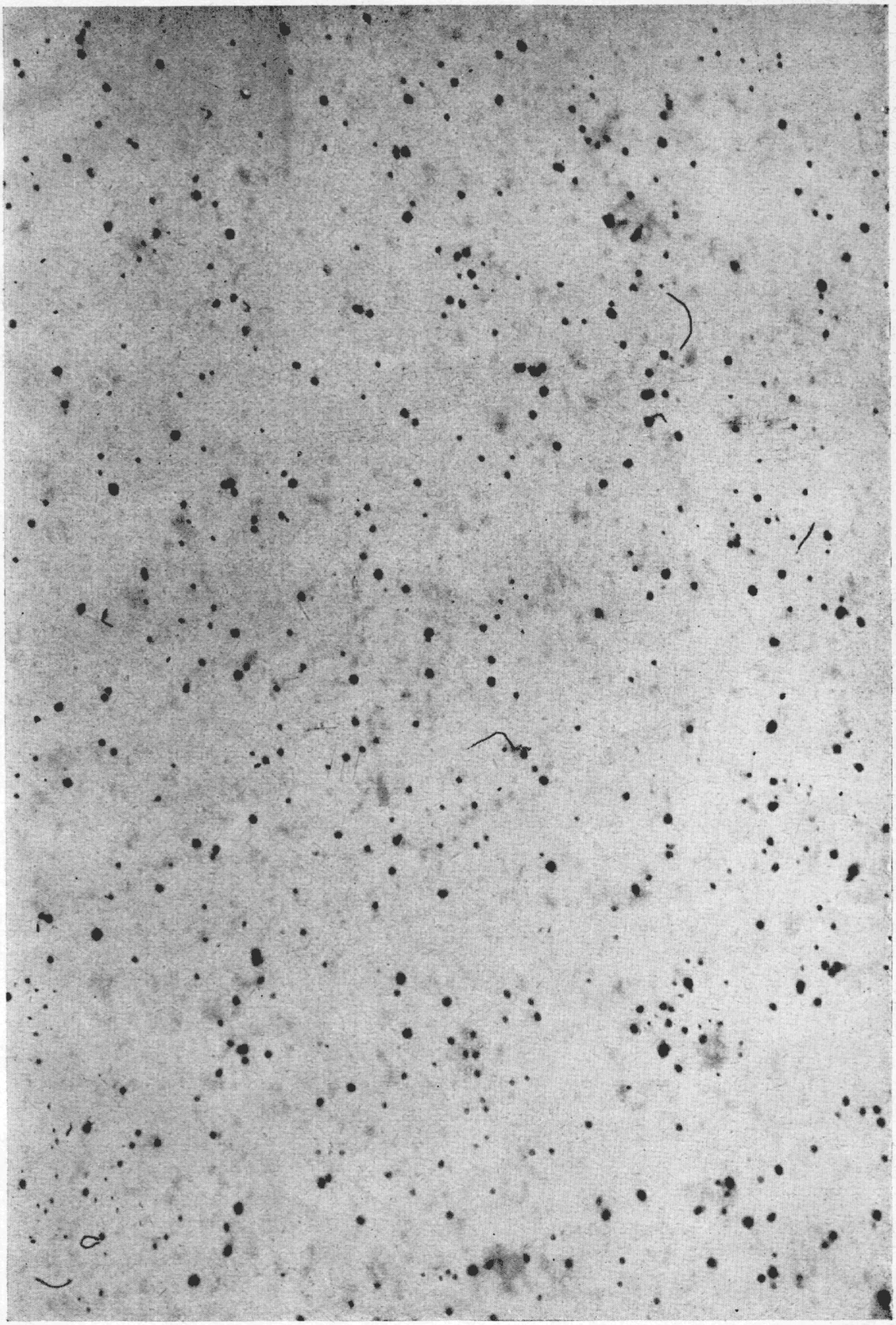

Abb. 2. Virus der Schweinelähmung im Durchleuchtungsbild. Elektronenoptische Darstellung von Prof. J. Wolf. 1:20000.

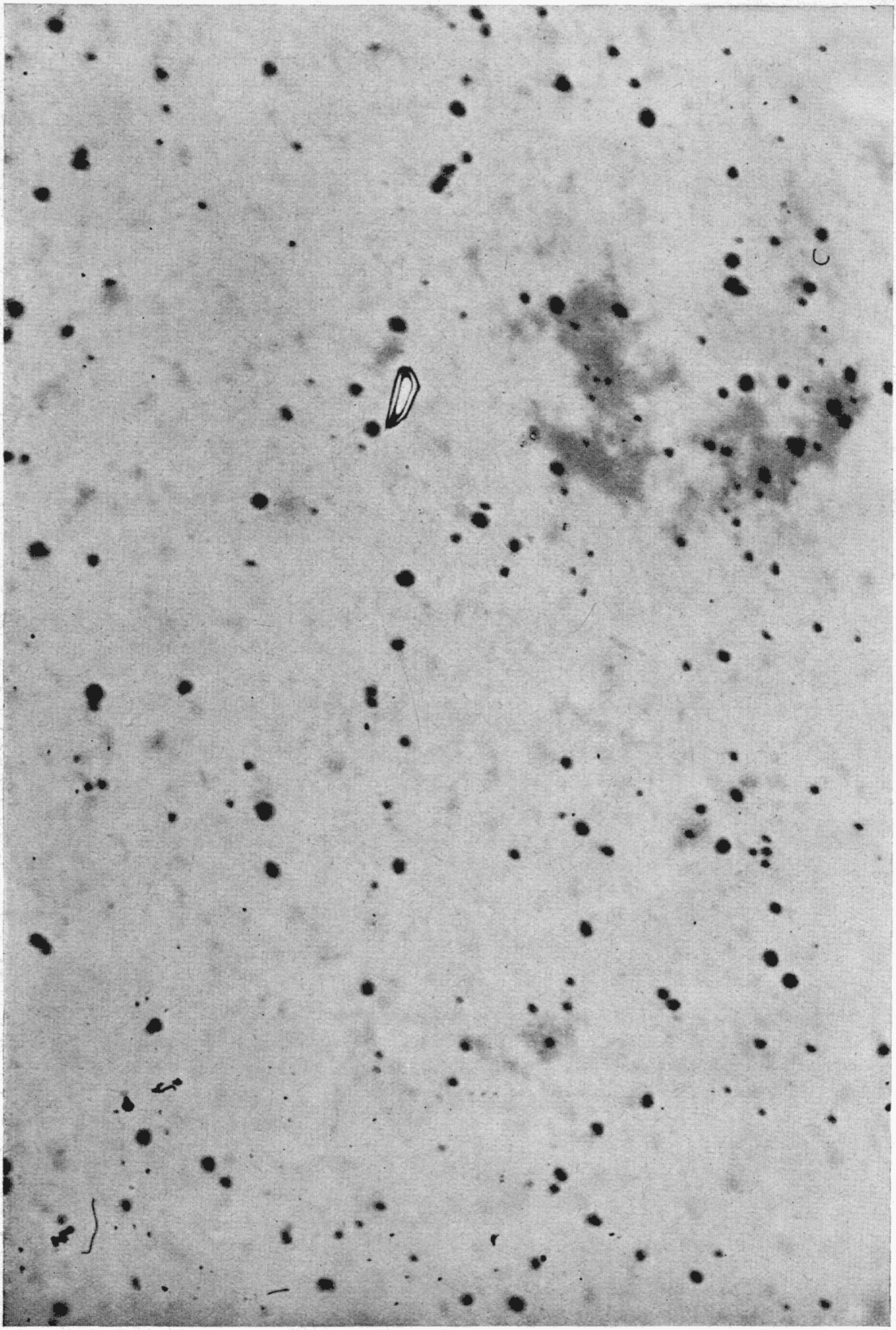

Abb. 3. Virus der Schweinelähmung im Durchleuchtungsbild. Elektronenoptische Darstellung von Prof. J. Wolf. 1:40000.

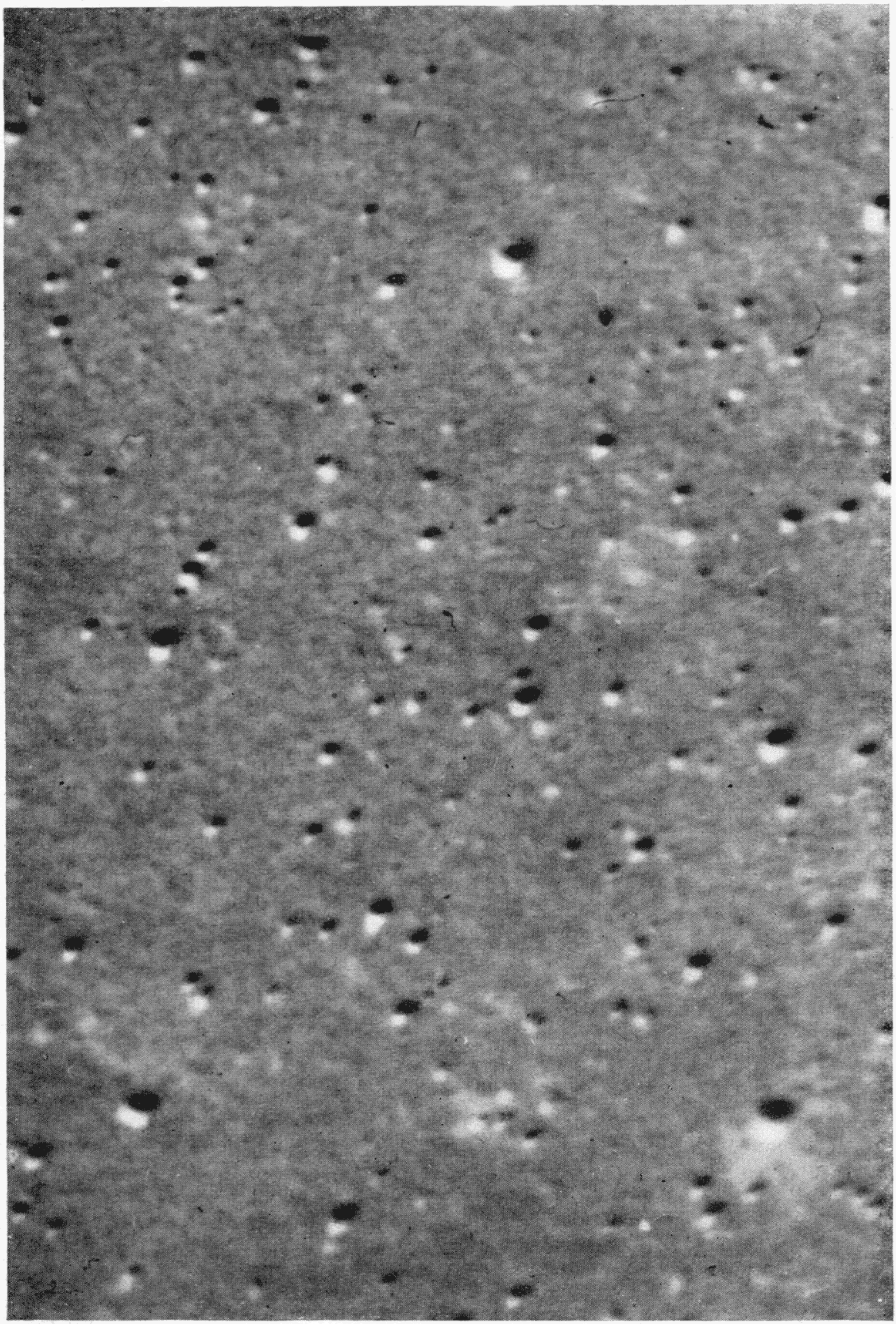

Abb. 4. Virus der Schweinelähmung mit Beryllium schräg bedampft. Elektronenoptische Darstellung von Prof. J. Wolf. 1:80000.

danach bei einer Temperatur unter 0° C mit Methylalkohol abermals präzipitiert und in einem Quantum von redestilliertem Wasser eluiert wurde, so daß eine wasserklare Flüssigkeit erhalten wurde, von der 1 ccm 14 g Rückenmark entsprach. Dieses klare Purifikat enthielt, wie ein Übertragungsversuch an 2 Tieren zeigte, aktives Virus in der gleichen Menge wie eine virushaltige Suspension von 10^{-2}. Als Kontrolle diente eine auf gleiche Weise hergestellte Suspension aus dem Rückenmark eines gesunden Schweines.

Das infektiöse Purifikat enthielt sphärische Teilchen oder deren Aggregate mit einer Größe von 30–60 mμ, was der Größe des Virus entspricht, wie sie in einer früheren Arbeit festgestellt wurde. Das nichtinfektiöse Purifikat enthielt keine ähnlichen Partikel. Die Wahrscheinlichkeit, daß die beschriebenen Teilchen den Viruspartikeln entsprechen, wird hervorgehoben.

Schrifttum

(1) Gollan, F., and Marvin, J.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **67**, 366 (1948).

(2) Gard, S.: Purification of poliomyelitis viruses, experiments on murine and human strains. Acta med. Scand. suppl. **143** (1943).

(3a) Gard, S.: Comparative physicochemical and electron-microscopic studies of purified preparations of the poliomyelitis virus. Arkiv Kemi, Mineral., Geol. **1943**, B 17.

(3b) Gard, S.: Übermikroskopische Beobachtungen an gereinigten Poliomyelitis-Viruspräparaten. Ein Beitrag zur Frage der Epidemiologie der Kinderlähmung. Klin. Wschr. **22**, 315 (1943).

(4a) Loring, Marton and Schwerdt: Electron microscopy of purified Lansing virus. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **62**, 289 (1946).

(4b) Loring: Similarities in electronmicrographs of purified Lansing and SK poliomyelitis viruses. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **64**, 101 (1947).

(5) Kausche: Zur Reindarstellung eines Poliomyelitis-virus-Lansingstammes. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. **1948**, 54. Kongr.

(6) Reagan, Schenck and Brückner: Morphological observations by electron-microscopy of the Brunhilde strain of poliomyelitis virus. J. Infekt. Dis. **86**, 295 (1950).

(7) Reagan, Schenck and Brückner: Morphological observations by electron-microscopy of the Leon strain of poliomyelitis virus. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **77**, 42 (1951).

(8) Patočka, Kubelka und Slavík: O některých biologických vlastnostech viru Encephalomyelitis enzootica suis (Über einige biologische Eigenschaften des Virus der Encephalomyelitis enzootica suis). Věstník československé akademie zemědělské 1951 **XXV**, 461. Sborník Akademie zemědělské 1952, 131.

(9) Patočka, Kubelka und Záček: Pokus o částečnou purifikaci viru encephalomyelitis enzootica suum (Ein Versuch einer teilweisen Purifikation des Virus der Encephalomyelitis enzootica suum). Biologické list **31**, 45 (1950).

(10) Patočka, Kubelka und Boháč: Příspěvek k imunologii nakažlivé obrny vepřů (Ein Beitrag zur Immunologie der infektiösen Schweinelähme [Encephalomyelitis enzootica suum]). Československá Hygiena, epidemiologie, mikrobiologie **2**, 22 (1953).

(11) Gard, S.: Arch. Virusforsch. **1951**, 249.

(12) Leyon and Gard: Biochim. biophysica acta. **4**, 385 (1950).

(13) Koprowski: Discussion of classification and nomenclature of the poliomyelitis group. Ann. N. Y. Acad. Sc., N. Y. **1953**, Virus and rickettsial classification and nomenclature.

Verlag: S. Hirzel, Leipzig · Lizenz-Nr. 267/GN 2231
Satz und Druck: Buchdruckerei Oswald Schmidt KG, Leipzig III/18/65 · Printed in Germany