

## Ein Beitrag zur Morphologie des Influenzavirus: Struktur des Influenza-A<sub>2</sub>-«Hongkong»-Virus<sup>1</sup>

Seit der Einführung der Negativkontrastierung in die elektronenmikroskopische Technik<sup>2</sup> wissen wir relativ genau Bescheid über die Morphologie des Influenzavirus<sup>3-6</sup>: Es handelt sich um runde oder fadenförmige Gebilde mit einem kleinsten Durchmesser von ca. 100 nm, deren Hülle mit regelmässig<sup>7</sup> angeordneten Projektionen oder «spikes» besetzt ist<sup>8,9</sup>. Inkomplette, nicht infektiöse Formen zeigen einen ausgesprochenen Polymorphismus und sind im allgemeinen wesentlich grösser<sup>10-12</sup>. Die RNS ist bei den Influenzaviren in Form einer Nukleoproteinspirale<sup>6,9,13,14</sup> in die oben erwähnte Hülle eingeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Befunde an Influenzavirus A<sub>2</sub> bestätigt, ebenso wird gezeigt, dass die Beobachtung von CHU et al.<sup>15</sup>, wonach frisch isolierte Influenzaviren als fadenförmige Partikel vorliegen, auch für diesen Virustyp gilt. Die Untersuchung der Viren aus dem Rachenspülwasser selbst zeigt, dass die Erreger aber auch im menschlichen Wirt filamentöse Gestalt haben. Weiter werden die Faktoren<sup>16</sup> für die Entstehung der filamentösen oder runden Formen diskutiert.

**Material und Methoden.** Verwendet wurden 15 verschiedene Stämme von Influenza A<sub>2</sub>, welche Anfang 1969 in unserem Labor aus Rachenspülwasser durch Überimpfen auf Bruteier isoliert werden konnten. Die Stämme erhielten vom World Influenza Centre, London, die Bezeichnung Influenza A<sub>2</sub>/Switzerland/1-15/69. Daneben wurden auch der Stamm Influenza A<sub>2</sub>/Hongkong/1/68 sowie zum Vergleich die Stämme Influenza A-PR8 und A<sub>2</sub>/Singapur/1/57, die beiden letzteren nach vielen Eipassagen, untersucht; sie wurden zum Zweck der hier beschriebenen Untersuchungen während einiger Passagen auch in Nierenzellen von *Erythrocebus patas* gehalten.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Viren aus Rachenspülwasser durch Adsorption und Elution mit Hühnererythrozyten angereichert. Hierbei erwies sich die Elutionszeit als sehr kritisch, indem bei längerer Zeit als 2 h die Viren zunehmend zerfielen (Dekapsidation, vgl. 17).

Die virushaltige Flüssigkeit wurde nicht oder mit 2% OsO<sub>4</sub> fixiert auf kollodiumbefilmte und mit Kohle bedampfte elektronenmikroskopische Präparatnetze gegeben, nach 2 min wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und das noch feuchte Präparat durch Aufbringen und sofort wieder Absaugen von 1% Phosphorwolframsäure (pH 6,8-7,0) kontrastiert. Die Aufnahmen wurden in einem Siemens-Elmiskop-I A-Elektronenmikroskop

mit Objektraumkühlung und einer Beschleunigungsspannung von 80 oder 100 kV hergestellt.

**Resultate.** Die Figur 1 zeigt filamentöse Influenza-A<sub>2</sub>-Viren von verschiedener Länge, aber recht regelmässigem Durchmesser von ca. 100 nm, so wie sie direkt im Rachenspülwasser gefunden werden. Offenbar sind die Viren teilweise in Muzinstoffe des Speichels eingebettet<sup>18,19</sup>, was die schlechte Darstellbarkeit erklären könnte. Die Figur 2 zeigt ein filamentöses Viruspartikel aus Rachenspülflüssigkeit, welches nach Absorption und Elution von Erythrozyten teilweise dekapsidiert ist, so dass die innere Nukleoproteinkomponente sichtbar wird.

Sehr viel deutlicher lassen sich die Viren aus Allantoisflüssigkeit von Hühnerembryonen darstellen, wobei auch hier in den ersten Passagen noch filamentöse Formen

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde vom Schweiz. Nationalfonds unterstützt.

<sup>2</sup> S. BRENNER und R. W. HORNE, *Biochim. biophys. Acta* 34, 103 (1959).

<sup>3</sup> R. W. HORNE, A. P. WATERSON, P. WILDY und A. E. FARNHAM, *Virology* 11, 79 (1960).

<sup>4</sup> P. W. CHOPPIN, J. S. MURPHY und W. STOECKENIUS, *Virology* 13, 548 (1961).

<sup>5</sup> I. ARCHETTI und D. S. BOCCARELLI, *Arch. ges. Virusforsch.* 11, 599 (1962).

<sup>6</sup> B. LOVAS und G. TAKÁTSY, *Arch. ges. Virusforsch.* 17, 67 (1965).

<sup>7</sup> I. ARCHETTI, A. JEMOLO und D. STEVE-BOCCARELLI, *Arch. ges. Virusforsch.* 20, 133 (1967).

<sup>8</sup> A. P. WATERSON, J. M. W. HURRELL und K. E. JENSEN, *Arch. ges. Virusforsch.* 12, 487 (1963).

<sup>9</sup> G. SIEGL, J. PETTE und H. MAHNEL, *Arch. ges. Virusforsch.* 24, 299 (1968).

<sup>10</sup> R. D. BARRY, R. W. HORNE und A. P. WATERSON, *Z. Naturforsch.* 17b, 749 (1962).

<sup>11</sup> D. H. MOORE, M. C. DAVIES, S. LEVIN und M. E. ENGLERT, *Virology* 17, 470 (1962).

<sup>12</sup> C. MORGAN, K. C. HSU und H. M. ROSE, *J. exp. Med.* 116, 553 (1962).

<sup>13</sup> L. HOYLE, R. W. HORNE und A. P. WATERSON, *Virology* 13, 448 (1961).

<sup>14</sup> K. APOSTOLOV und T. H. FLEWETT, *Virology* 26, 506 (1965).

<sup>15</sup> C. M. CHU, I. M. DAWSON und W. J. ELFORD, *Lancet* I, 602 (1949).

<sup>16</sup> P. W. CHOPPIN, *Virology* 21, 278 (1963).

<sup>17</sup> L. HOYLE, R. W. HORNE und A. P. WATERSON, *Virology* 17, 533 (1962).

<sup>18</sup> S. G. ANDERSON, F. M. BURNET, S. FAZEKAS DE ST. GROTH, J. F. McCREA und J. D. STONE, *Austr. J. exp. Biol.* 26, 347 (1948).

<sup>19</sup> I. GRESSER und H. B. DULL, *Proc. Soc. exp. Biol.* 115, 192 (1964).

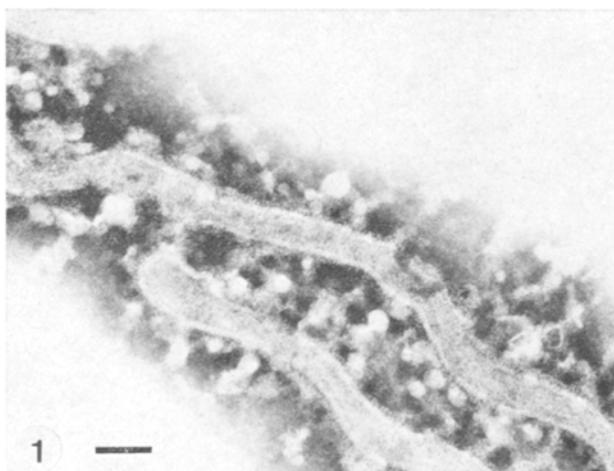


Fig. 1. Influenzavirus A<sub>2</sub> («Hongkong») in Rachenspülwasser.  $\times 70000$  (Marke: 100 nm).

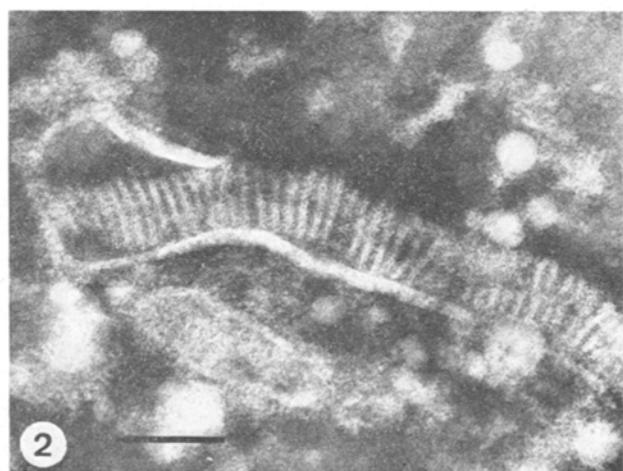


Fig. 2. Influenzavirus A<sub>2</sub> in Rachenspülwasser, teilweise dekapsidiert, mit sichtbarer Nukleoproteinspirale.  $\times 140000$  (Marke: 100 nm).

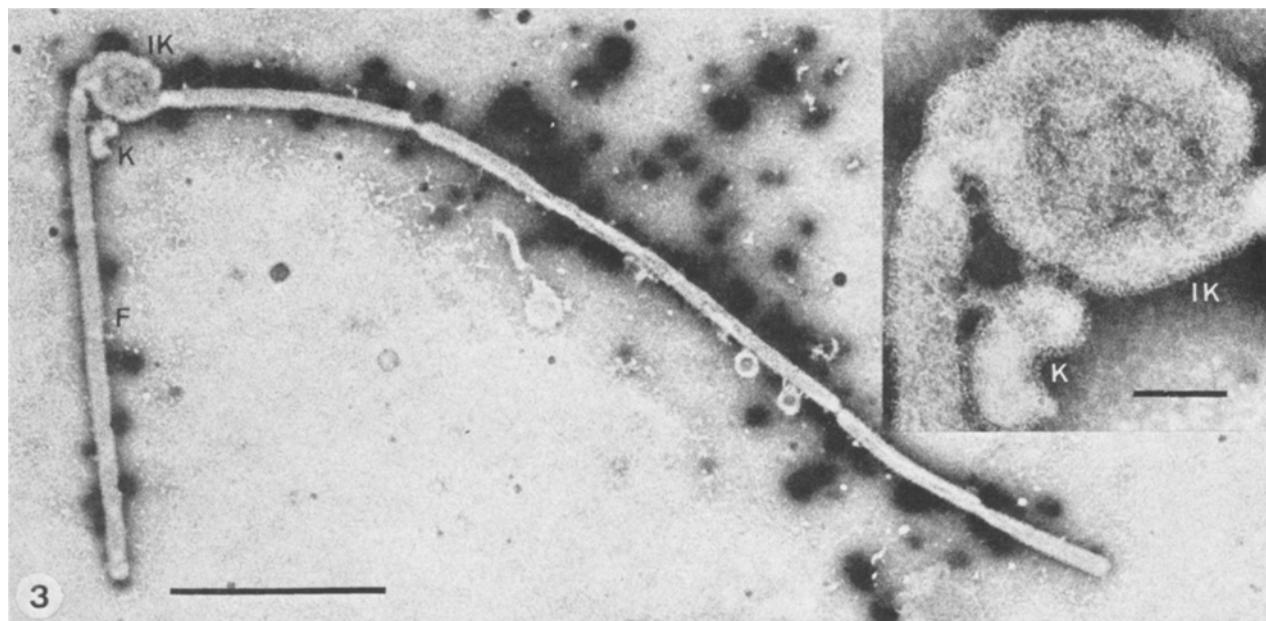


Fig. 3. Influenzavirus A<sub>8</sub>, 1. Eipassage. Filamentöse Form (F), daneben inkomplette (IK) und komplett (K) sphärische Partikel.  $\times 28000$  (Marke: 1  $\mu$ m). Inset: Inkomplette und komplett Partikel bei höherer Vergrößerung.  $\times 120000$  (Marke: 100 nm).

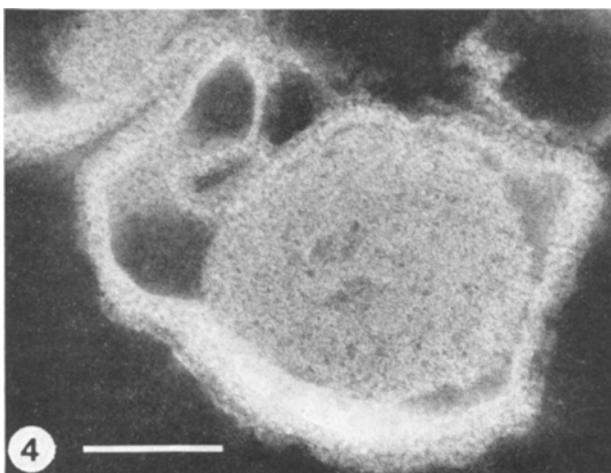


Fig. 4. Influenzavirus A<sub>2</sub>, 2. Eipassage. Nicht fixiertes, inkomplettes Virus mit teilweise leerer und geschrumpfter Hülle.  $\times 180000$  (Marke: 100 nm).

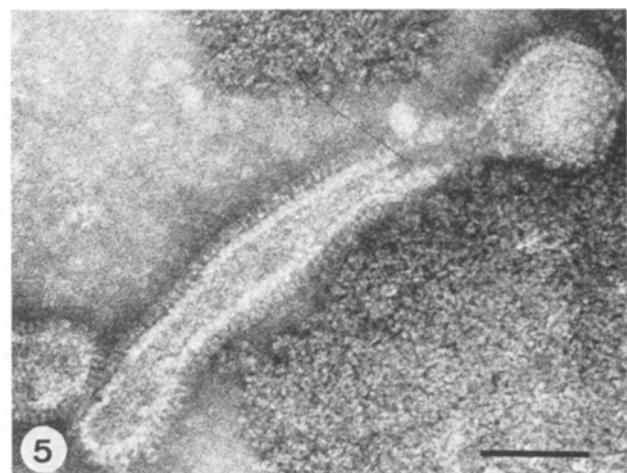


Fig. 5. Influenza A-PR8, 2. Affennierenpassage. Bildung von kurzen Filamenten.  $\times 140000$  (Marke: 100 nm).

von zuweilen grosser Länge (bis 20  $\mu$ m) vorliegen (Figur 3). Auf dieser Aufnahme lassen sich auch die grossen, teilweise leeren, inkompletten Viren erkennen, welche in wechselnder Menge in jedem Präparat vorkommen. Die Figur 4 zeigt ein unfixiertes, inkomplettes Influenza-A<sub>2</sub>-Virus aus der 2. Eipassage. Deutlich ist die leere Hülle zu sehen, welche infolge der osmotischen Veränderungen bei der Kontrastierung deformiert erscheint<sup>5,20</sup>.

Da die Vermutung nahe liegt<sup>16</sup>, dass die Ausbildung von filamentösen Formen – abgesehen von genetischer Fixierung der Eigenschaft<sup>21</sup> – bei allen Influenzavirustümmlen abhängig ist von der Wirtszelle einerseits<sup>22</sup> und dem umgebenden Milieu andererseits<sup>23,24</sup>, wurde der Influenza-A<sub>2</sub>/Singapur/1/57-Stamm und der A-PR8-Stamm parallel in Hühnerembryonen und Patasaffen-Nierenzellen gezüchtet; dies geschah deshalb, weil von Influenza A<sub>2</sub> keine Stämme mit genügend hoher Eipassagezahl und somit rein sphärischen Partikeln<sup>25</sup> zur Verfügung standen.

Es zeigt sich, dass in Affen-Nierenzellen gezüchtete A<sub>0</sub>- und A<sub>2</sub>-Viren schon nach ein bis zwei Passagen zu kurzen Filamenten werden (Figur 5) und nicht oder nicht so rasch nach Ausschleusen aus der Zelle in sphärische Partikel von etwa 100 nm Durchmesser zerfallen<sup>5</sup>, wie die aus den Hühnerembryonen stammenden Viren (Figur 6).

In ganz seltenen Fällen finden sich in den Präparaten Bilder wie Figur 7, wobei offenbar die äussere Hülle des

<sup>20</sup> K. REUSS, I. C. PLESCHER, D. HÜLSE and K. HERZBERG, Zentbl. Bakt. (Orig.) 203, 47 (1967).

<sup>21</sup> E. D. KILBOURNE and J. S. MURPHY, J. exp. Med. 111, 387 (1960).

<sup>22</sup> J. S. MURPHY, D. T. KARZON and F. B. BANG, Proc. Soc. exp. Biol. 73, 596 (1950).

<sup>23</sup> H. A. BLOUGH, Virology 19, 349 (1963).

<sup>24</sup> H. A. BLOUGH, Virology 19, 112 (1963).

<sup>25</sup> F. M. BURNET and P. E. LIND, Arch. ges. Virusforsch. 7, 413 (1957).

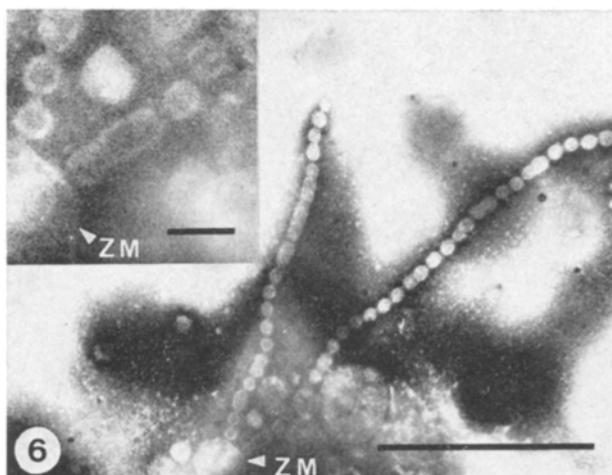


Fig. 6. Influenza A-PR8, Eipassage. Ausschleusen von sphärischen Partikeln (ZM = Zellmembran).  $\times 28000$  (Marke: 1  $\mu\text{m}$ ). Inset: gleiche Stelle der Zellmembran mit frisch gebildeten Viren bei höherer Vergrößerung.  $\times 85000$  (Marke: 100 nm).

Virus durchlässig geworden und das Kontrastiermittel in das Virion eingedrungen ist. Dabei zeigt sich die doppelte Nukleoproteinspirale mit einer Ganghöhe von ca. 100 Å, einer Breite der Nukleoproteinfäden von 60 Å und einem Durchmesser der Gesamthelix von 600 Å, was mit den Werten aus der Literatur<sup>6, 9, 13, 14</sup> gut übereinstimmt.

**Diskussion.** Diese Untersuchungen an Influenza A<sub>2</sub>, dem Erreger der «Hongkong-Grippe» bestätigen die Befunde aus der Literatur, welche an früheren Influenzavirusstämmen erhoben wurden hinsichtlich der Grösse, Form<sup>3-6, 8, 9, 15</sup> und Oberflächenbeschaffenheit<sup>7, 27</sup> der Vironen. Auch der Aufbau der informationstragenden RNS, einer Nukleoproteinhelix respektive -doppelhelix stimmt mit dem in der Literatur angegebenen überein<sup>6, 9, 13, 14</sup>.

Die Gründe, weshalb Influenzavirus einmal filamentös und ein andermal sphärisch erscheint, sind nicht ganz klar. Einerseits scheinen genetische Faktoren die Erscheinungsform beeinflussen zu können<sup>21</sup>, andererseits scheinen auch Faktoren an der Zelloberfläche verantwortlich zu sein. Dass aber nicht nur die Zelloberfläche als solche verantwortlich ist, sondern auch die umgebende Flüssigkeit, welche ja aus technischen Gründen je nach Zell- und Kulturart wechselt, geht auch aus den Arbeiten von BLOUGH<sup>23, 24</sup> hervor. Eine experimentelle Klärung dieser Frage steht zurzeit noch aus.

Die hier gezeigte Figur 6 macht aber wahrscheinlich, dass vor allem das *Milieu*, in dem die Wirtszelle sich aufhält, ausschlaggebend ist, indem vermutet werden

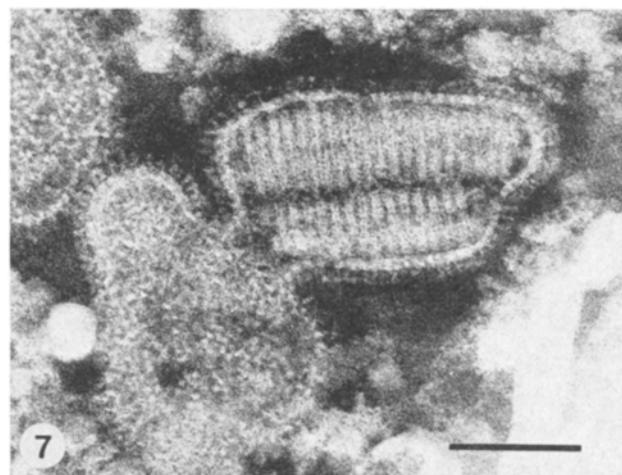


Fig. 7. Influenzavirus A<sub>2</sub>, Eipassage. Darstellung von 2 nebeneinanderliegenden Nukleoproteinspiralen in der gleichen Hülle.  $\times 170000$  (Marke: 100 nm).

kann, dass sowohl bei sphärischen als auch bei filamentösen Viruspartikeln der Entstehungsmechanismus der gleiche ist, dass aber je nach Medium die Viren sich entweder als Filament mit sehr langer, sich in bezug auf Information mehrfach wiederholender Nukleoproteinhelix formieren oder aber gleich nach der Entstehung in die kleinsten infektiösen Einheiten zerfallen, entsprechend der minimal nötigen RNS-Menge, nämlich ca. 6 Umgänge der Nukleoproteinspirale<sup>6</sup>, welche die vollständige Information für die Neusynthese des Virus enthält.

**Summary.** The morphology and internal structure of Influenza A<sub>2</sub> ('Hongkong') virus is described. This virus has the same morphological characteristics as previously isolated Influenza A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, and A<sub>2</sub> strains. Evidence is also presented that this influenza virus appears in a filamentous form in human throat washings. The reasons for the virus to be a filamentous or a spherical particle are discussed.

K. BIENZ und H. LÖFFLER

*Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Basel,  
CH-4000 Basel (Schweiz), 19. Mai 1969.*

<sup>26</sup> L. HOYLE, J. Hyg. Camb. 52, 180 (1954).

<sup>27</sup> F. M. DAVENPORT, R. ROTT und W. SCHÄFER, J. exp. Med. 112, 765 (1960).

#### Aphanomyces Root Rot of Cauliflower in Varanasi, a New Recording for India

During surveys, a partial wilt of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) plants was encountered in Varanasi, Uttar Pradesh during September–October in early transplanted crops in intensively cultivated fields. The disease appears with a few sickly plants in scattered pockets in water-logged areas. Infected plants remain stunted with limp, partially withering leaves due to loss in turgor and chlorophyll faded to a lighter shade. The infection starts from the rootlets and root tips of young plants; the cortical tissues become water-soaked

and soft as the infection progresses upward in the mesocotyl. The root bark discolors to dull brownish, sloughs into shreds and separates from the vascular strand. The rootlets get detached from the main tap root on pulling the plant out and the sloughed bark separates in the soil. Infected plants do not recover from the wilt and are attacked by weakly parasitic organisms, leading to ultimate death. Nearly 10% of plants are infected in most of the fields with partially water-logged and poorly aerated, sandy clayey soils.