

Die Hämagglutination des Influenzavirus A₂-Hongkong

Im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Basel wurde im Januar 1969 erstmals in der Schweiz die neue Variante Hongkong des Influenzavirus isoliert¹. Während der Frühjahrsepidemie 1969 wurden im ganzen 16 und in der zweiten Welle im Winter 1969/70 weitere 9 Hongkong-Stämme aus Untersuchungsmaterial von Patienten gezüchtet.

Als Ergänzung zu einer Arbeit², die vor allem Fragen der Fermentaktivität und -spezifität dieses Virus sowie das Verhalten gegen unspezifische Inhibitoren im Serum untersucht, versuchen wir nun das Virus in der Hämagglutination näher zu untersuchen.

Abkürzungen für die verwendeten Influenzavirus-Stämme:

A-PR8 A₀-Puerto Rico 8/1936
A₂-Asia A₂/Asia/1/57
A₂-HK-SW A₂-Hongkong/Schweiz/10/69
A₂-HK-ENG A₂/Hongkong/England/1/68

Methoden. Hämagglutinationsspektrum. Die verschiedenen Blutarten erhielten wir freundlicherweise vom Zoologischen Garten Basel (Drs. E. LANG und HOFFMANN) und von Dr. UEHlinger, Tierspital Münchenstein.

Mit 0,2 ml Allantoisflüssigkeit der verschiedenen Viren wird eine 2fache Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung über 10 Vertiefungen einer Plexiglasplatte hergestellt. In jede Vertiefung gibt man 0,2 ml einer 1%-Erythrozytensuspension. Die Ablesung erfolgt nach 30–45 min bei Zimmertemperatur, nach 2 h bei 4°C.

Elutionsfähigkeit³. 1 ml Allantoisflüssigkeit wird bei 4°C mit 1 ml 10%-Erythrozytensuspension versetzt. Nach 15 min wird das Gemisch zentrifugiert und eine Probe des Überstandes zur Kontrolle der vollständigen Adsorption der Viren ausgetitriert. Nach Wiederaufschütteln kommt das Gemisch ins Wasserbad von 37°C. Nach den entsprechenden Zeitabständen wird zentrifugiert und durch Titration des Überstandes festgestellt, wie weit die Elution fortgeschritten ist.

Das Hämagglutinationsspektrum. Jeder Typus, jede Variante des Influenzavirus hat sein mehr oder weniger charakteristisches Spektrum der Erythrozytenarten, die agglutiniert werden. Die Angaben über Hämagglutinationsspektren in der Literatur^{4,5} sind schwankend, teilweise sogar widersprechend. Abgesehen von den Diffe-

renzen bei den verschiedenen Untersuchern, die mit der Untersuchungsmethodik zusammenhängen, spielen Variable von Seiten des Virus (Provenienz, Anpassungsphase), von Seiten der Erythrozyten (Alter, Schwankungen bei verschiedenen Blutproben derselben Spezies) und von Seiten des Reaktionsmilieus eine Rolle⁴.

Ausserdem ist die Umgebungstemperatur, wie noch gezeigt werden soll, von entscheidendem Einfluss. Unsere Versuche zur Aufstellung eines Hämagglutinationsspektrums wurden bei Zimmertemperatur (25–30°C) und in kleinerem Rahmen bei 4°C durchgeführt.

Tabelle I zeigt, dass bei Zimmertemperatur und in der Kälte das A₂-Asia-Virus das breiteste Spektrum hat, gefolgt vom A₂-HK-SW und A₂-HK-ENG, dann vom A-PR8 und B-LEE-Virus.

Die bei Zimmertemperatur durchgeführten Versuche weisen erhebliche Unterschiede in den Spektren von A₂-Asia und A₂-HK auf. Erythrozyten von Rind, Kalb, Pferd, Pony und von der Stachelmaus wurden von den A₂-HK-Stämmen nicht agglutiniert im Gegensatz zum A₂-Asia.

Bei 4°C weisen das A₂-HK-SW- und A₂-HK-ENG-Virus ein erheblich breiteres Spektrum als bei Zimmertemperatur auf, nur die Erythrozyten der Stachelmaus können von beiden Stämmen nicht agglutiniert werden.

Allerdings sind die Titer bei Rind, Pferd, Pony erheblich niedriger als bei A₂-Asia und zum Teil inkonstant, das heisst nicht reproduzierbar mit anderen Allantoisflüssigkeiten desselben Stammes oder mit Erythrozyten anderer Provenienz. Das bestätigt, dass einzelne Virusstämme gewisse Erythrozytenarten nur bei 4°C agglutinieren oder zumindest bei 4°C viel höhere Titer zeigen als bei Zimmertemperatur^{5,6}.

¹ H. LÖFFLER, K. BIENZ, F. BÜHLER und J. J. CONVERS, *Pathologia Microbiol.* 34, 132 (1969).

² W. R. FREY, *Pathologia Microbiol.*, im Druck (1970).

³ I. SIEBELIST und B. TUMOVA, *Z. Immunforsch. exp. Ther.* 127, 254 (1964).

⁴ C. HALLAUER, *Handbuch für Virusforschung* (Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1950), vol. 2, p. 141.

⁵ B. SCHMID und K. GROSSGEBAUER, *Z. Hyg. InfektKrankh.* 146, 26 (1959).

⁶ J. P. OVERMAN und W. F. FRIEDEWALD, *J. Immun.* 62, 415 (1949).

Tabelle I. Hämagglutinationsspektren

	Huhn	Türkentaube	Haustaube	Mensch	Meerschweinchen	Hamster	Katze	Hund	Rind	Kalb	Pferd	Pony	Esel	Ziege	Hammel	Maus	Stachelmaus	
B-Lee	++++	+++	++++	++++	+++	++	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Zimmertemperatur (25–30°C)
A-PR8	++++	+++	+++	++++	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	(++)	+++	-	
A ₂ /HK/SW/10/69	++++	++	++	++++	++++	++	(+)	++++	-	-	-	-	(++)	+	++	(+++)	-	
A ₂ /HK/ENG/1/68	++++	+++	+++	++++	++++	+++	(+)	++++	-	-	-	-	+++	+	++	++++	-	
A ₂ -Asia/1/57	++++	+++	++++	++++	++++	(+)	+++	++++	+++	+++	+++	+++	++++	++	+++	++++	+++	
B-Lee	++++								+++	-	-	-	(+++)	++	++	-	-	+ 4°C
A-PR8	++++								+++	+	(+)	++	+++	+++	++	-	-	
A ₂ /HK/SW/10/69	++++								+	(+)	(+)	++	+++	+++	++++	-	-	
A ₂ /HK/ENG/1/68	++++								+	(+)	(+)	++	++	++	+++	++	-	
A ₂ -Asia/1/57	++++								++++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	

++++, regelmässige Agglutination in hohen Titern. +++, ++, +, entsprechend niedrigere Titer. (+++), (++), (+), unregelmässige Agglutination in den entsprechenden Titern (das heisst in einigen Versuchen keine Agglutination). -, keine Agglutination.

Tabelle II. Elution des A₂-Asia- und A₂-HK-SW-Stammes von verschiedenen Erythrozyten^a

		Hämagglutinationstiter des Überstandes					
		Nach Adsorption	Elution 1 h	Elution 2 h	Elution 5 h	Elution 8 h	Elution 24 h
A ₂ -Asia 1:512	Huhn	< 2	32	64	128	128	128
	Esel	< 2	128	128	128	128	128
	Rind	< 2	128	128	128	128	128
	Ziege	4	64	64	128	128	128
	Stachelmaus ^b	16	128	128	128	128	256
	Pferd	< 2	4	8	16	32	32
A ₂ -HK 1:256	Huhn	< 2	4	16	64	128	128
	Esel	< 2	16	32	64	64	64
	Rind ^b	8	64	64	128	128	128
	Ziege	4	32	32	64	64	64
	Stachelmaus ^b	32	64	64	64	128	128
	Pferd ^b	8	32	32	64	64	64

^a Die Zahlen geben den reziproken Wert der Virusendtitel an. ^b Erythrozyten, die bei Zimmertemperatur mit den entsprechenden Viren nicht agglutinieren.

Ist nun die schnellere Elution nach erfolgter Adsorption dafür verantwortlich, dass manche Viren bei Zimmertemperatur dieselben Erythrozyten nicht zu agglutinieren vermögen, die sie bei 4 °C, wenn auch in niedrigen Titern, agglutinieren? Um diese Frage für das A₂-HK-Virus zu klären, wurde die Elution des A₂-Asia- und A₂-HK-SW-Stammes von verschiedenen Erythrozytenarten geprüft.

Tabelle II zeigt folgendes: 1. Die Elutionsfähigkeit des A₂-HK-SW-Virus ist geringer als die des A₂-Asia bei den Erythrozyten des Huhnes und des Esels. 2. Sie ist von derselben Grössenordnung bei den Erythrozyten des Rindes, der Ziege und der Stachelmaus. 3. Sie ist grösser für A₂-HK bei den Erythrozyten des Pferdes.

Diskussion. Wir nehmen folgende Arbeitshypothese an: Die Adsorption der Viren an die Erythrozyten ist temperaturunabhängig. Die Elutionsgeschwindigkeit hingegen ist bei Zimmertemperatur grösser als bei 4 °C⁴. Sie kann so gross werden, dass trotz erfolgter Adsorption keine Agglutination mehr stattfindet.

Die Elutionsgeschwindigkeit von A₂-Asia ist offensichtlich nicht gross genug, um eine Agglutination der Erythrozyten durch das Virus zu verhindern, da das A₂-Asia-Virus auch bei Zimmertemperatur alle untersuchten Erythrozyten agglutiniert. Bei denjenigen Erythrozyten, die bei Zimmertemperatur durch das A₂-HK-Virus agglutiniert werden, sollte die Elutionsgeschwindigkeit des A₂-HK gleich gross oder kleiner sein als die des A₂-Asia. Das ist der Fall für die Erythrozyten des Huhnes, des Esels und der Ziege.

Die Elutionsgeschwindigkeit des A₂-HK-Virus von denjenigen Erythrozyten, die bei Zimmertemperatur nicht

agglutiniert werden, sollte grösser sein als die des A₂-Asia-Virus. Das stimmt nur für die Erythrozyten des Pferdes. Die Erythrozyten des Rindes werden bei Zimmertemperatur von den A₂-HK-SW-Viren nicht agglutiniert, obwohl diese keine grössere Elutionsgeschwindigkeit von diesen Erythrozyten zeigen als die A₂-Asia-Viren, die diese Erythrozyten auch bei Zimmertemperatur zu agglutinieren vermögen.

Für die Erythrozyten des Huhnes, des Esels, der Ziege und des Pferdes könnte die Grösse der Elutionsgeschwindigkeit also den Ausschlag geben, ob bei Zimmertemperatur eine Agglutination durch das A₂-HK-SW-Virus stattfindet oder nicht. Für die Erythrozyten des Rindes müsste eine andere Erklärung gefunden werden.

Summary. A₂-Hongkong influenza virus does not agglutinate the erythrocytes of the cow, the calf, the horse, the pony and the spiny mouse at room temperature, while the A₂-Asia influenza virus causes agglutination. At a temperature of 4 °C A₂-Hongkong was able to agglutinate the erythrocytes of all species examined except those of the spiny mouse. Whether the A₂-Hongkong virus does or does not agglutinate the erythrocytes of the chicken, the donkey, the goat, the spiny mouse and the horse at room temperature could depend on the speed of elution.

W. R. FREY

Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Basel, CH-4051 Basel (Schweiz), 23. Juli 1970.

Zur Massenkultur des insektenpathogenen Pilzes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Von den insektenpathogenen Pilzen wird für Versuche zur biologischen Bekämpfung von Schadinsekten *Beauveria bassiana* am häufigsten benutzt¹. Solche Anwendung wird sich um so leichter realisieren und intensivieren lassen, je einfacher, billiger und ergiebiger die Massenkultur des Pilzes und die Gewinnung seiner Konidien ist. Kulturen sind auf festen oder flüssigen Nährmedien möglich und führen relativ langsam zu den ziemlich widerstandsfähigen Konidien; oder sie erfolgen submers in geeigneter

Nährlösung und liefern schnell grosse Mengen von Blastosporen, die aber weniger widerstandsfähig sind. Auch Kombinationen von Submerskultur und nachfolgender Oberflächenkultur (durchwachsene Kulturflüssigkeit in

¹ E. MÜLLER-KÖGLER, *Pilzkrankheiten bei Insekten* (P. Parey, Berlin und Hamburg 1965).