

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene

Erste Abteilung / Originale

Band 207

Ausgegeben im Juli 1968

Heft 2

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Professor Dr. med. H. KNOTHE)

Elektronenmikroskopische Befunde bei einer Affenseuche (*Cercopithecus aethiops*)

G. MAY, H. KNOTHE, D. HÜLSER und K. HERZBERG¹

(unter ständiger Mitarbeit von C. Plescher und H. Dräger, med.-techn. Assist.)

Mit 2 Tafeln

Eingegangen am 13. Februar 1968

Summary

*Electronmicroscopical findings in a communicable disease in monkeys (*Cercopithecus aethiops*)*

Electron microscopical data given by G. MÜLLER and D. PETERS, describing the agent of a communicable disease of monkeys (*Cercopithecus aethiops*) as curved rods, are confirmed and supplemented in morphology. Furthermore, we succeeded in strengthening the etiological significance of this agent by combining its multiplication in human amnion cells, infection of guinea pigs with the 5th passage of the tissue culture and electron microscopy of this agent in all these steps.

Zusammenfassung

Die elektronenmikroskopischen Befunde von G. MÜLLER und D. PETERS, die den Erreger einer Affenseuche (*Cercopithecus aethiops*) als gebogene Stäbe dargestellt haben, werden bestätigt und erweitert. Es gelang, die ätiologische Bedeutung dieser Formen durch die Kombination von Gewebekultur (menschliche Amnionzellen), Tierversuch (Meerschweinchen) und elektronenmikroskopischem Befund in dieser Reihenfolge zu sichern.

D. PETERS und G. MÜLLER (Tropeninstitut Hamburg) haben mit einem großen Maß von Wahrscheinlichkeit den Erreger der noch mit mancherlei Unklarheiten behafteten „Affenseuche“ im Blut von infizierten Meerschweinchen, das ihnen von R. SIEGERT und Mitarb. (Marburg/Lahn) zu Nachweisversuchen übersandt worden war, elektronenmikroskopisch dargestellt. Abbildungen der haken- und spazierstockähnlichen Gebilde brachten

¹ Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die elektronenmikroskopischen Leihgaben. H.

das Deutsche Ärzteblatt 1967, S. 2715, die Deutsche Medizinische Wochenschrift 1967, S. 2341, und die Münchener Medizinische Wochenschrift 1967 im Beiblatt 50. Nach einer neueren Mitteilung gelang PETERS und MÜLLER die elektronenmikroskopische Darstellung auch aus dem Blut grüner Meerschweinchen, die im Hygiene-Institut in Freiburg (Professor R. HAAS) infiziert worden waren. Parallel zu den Untersuchungen von R. SIEGERT und Mitarb. und D. PETERS und G. MÜLLER liefen virologische Untersuchungen an den Krankheitsfällen, die in Frankfurt a. M. aufgetreten waren, und über welche G. MAY und H. KNOTHE berichtet haben (DMW 1968).

Bei Anwendung der uns von G. MÜLLER empfohlenen Präparations-technik (Ausschleuderung des mit Glutaraldehyd und Formalin behandelten Meerschweinchenblutes und Plasmas auf Netze oder 7-Lochblenden am Zentrifugenbecher-Boden) fanden auch wir elektronenmikroskopisch Stäbe mit einer Umbiegung an einem Ende. Diese mutmaßlich die Krankheit hervorrufenden Gebilde, die aus eigenen Meerschweinchenblutproben (G. MAY und H. KNOTHE) von den Erkrankungen in Frankfurt a. M. gewonnen worden waren, traten in unseren elektronenmikroskopischen Aufnahmen in verschiedener Gestalt auf, und zwar bisher als

- gerade Stäbe, 600–1000 μ lang, 65–70 μ breit, die Enden abgerundet ohne Krümmung (etwa die Hälfte);
- Stäbe mit einer Endkrümmung (Haken- oder Spazierstockform);
- Stäbe in Haarnadelform;
- Stäbe mit einer Endschleife (Ösenform) und Fäden in Schleifen bis zu mehreren μ Länge.

Diese Stäbe zeigen nach PWS-Kontrastierung sehr schmale Querstreifungen. Deutlich sichtbar sind auch längsverlaufende Aufhellungen, zwei schmale in der Mitte und zwei breitere am Rande. Ob die Querstreifungen durch eine *innere* Helix gebildet werden, ist aus unseren Aufnahmen zweifelsfrei noch nicht zu ersehen, desgleichen nicht, ob die flockige helle *Außen-*schicht Strukturen enthält. Der Querschnitt der Stäbe wäre rundlich oder sechseckig denkbar, doch haben wir bisher nur Längsstücke gesehen und durch Schnitte keinen weiteren Aufschluß bekommen.

Technik der Präparatengewinnung

Mit Passagematerial i. p. geimpfte Meerschweinchen wurden zwischen dem 2. und 5. Fiebertag (d. h. 24–96 Stunden nach Fieberbeginn) herzpunktiert, 1,0 ml Vollblut in 10 ml 2,5%ige, verschieden stark gepufferte Glutaraldehydlösung gegeben. 24 Stunden stehen lassen, danach 1,2 ml 38%ige Formaldehydlösung zugegeben und nochmals 48 Stunden stehen lassen. Ausschleudern der Erythrozyten 10 Minuten bei 500 g, den Überstand in die Becher einer *horizontal*-schwingenden Zentrifuge (Phywe-Zentrifuge mit Swing-out Rotor) gegeben und auf den Boden entweder ein Netz mit Formvar oder eine Objektblende gebracht. Ausschleuderungen bei 12000 g, 45000 g bzw. 100000 g. Netze und Objektblenden werden in üblicher Weise negativkontrastiert (1% PWS, pH 6,2). Siemens-Elmiskop I, Vergrößerung 20000 bis 40000fach, Nachvergrößerung auf 100000 bis 200000fach.

Auf den Tafeln I und II sind verschiedene charakteristische Befunde abgebildet.

Es gelang uns dann, die Bedeutung der Hakenstäbe als Krankheitsursache durch die Anordnung: Tierversuch → Gewebekultur → Tierversuch → elektronenmikroskopisches Bild zu sichern. Infektiöses Meerschweinchenblut wurde auf

eine menschliche Amniongewebekultur gebracht und diese alle 8–10 Tage und jedesmal 1:100 verdünnt fortgeführt. In den Passagen waren leichte, jedoch unverkennbare Zellveränderungen zu sehen.² Die 5. Passage, die einer Gesamtverdünnung seit Beginn von 10^{-10} entsprach, wurde Meerschweinchen i. p. injiziert. 5–6 Tage später fieberten sie mehrere Tage um $40,5^{\circ}\text{C}$. *Blut dieser Tiere vom 2. und 3. Fiebertag*, das in der oben angegebenen Weise verarbeitet wurde, *enthielt in UZ-Sedimenten, negativkontrastiert, Stäbe mit und ohne Haken*. Ebensolche Stäbe enthielt der Überstand der Gewebekultur.

Aufgefallen sind uns noch Partikel von etwa $250 \times 150 \text{ m}\mu$ Größe mit abgerundeten Ecken. Ihre Wand zeigt leichte Unebenheiten. Sie sind mutmaßlich nicht für Meerschweinchen infektiös, da sich die Meerschweinchen mit Filtraten durch Filter der Porenweite $450 \text{ m}\mu$, in denen die kleinen Partikel enthalten sein müßten, nicht krankmachen ließen, sondern erst mit Filtraten durch Filter der Porenweite $1000 \text{ m}\mu$.

Auf einige seltene stab- oder fadenförmige Gebilde *anderen* Ursprungs sei hingewiesen. Gelegentlich findet man an Erythrozyten zottenähnliche Ausstülpungen oder im Freien Kristallnadeln von ähnlicher Breite und Länge, wie die hakenförmigen Gebilde. Sie zeigen aber beide keine Querstreifung, so daß sie schon dadurch von den Erregerstäben meist zu unterscheiden sind.

Diskussion

Die sehr wechselnde Größe der einzelnen Stäbe des Affenseuchenerregers, die zwischen $0,6 \mu$ und mehreren μ Länge bei wenig veränderter Breite von etwa $70 \text{ m}\mu$ betragen kann, ferner die Haken- und Schleifenformen, ließen Zweifel verständlich erscheinen, ob man es hier mit einer Virusart zu tun habe. Betrachtet man aber die kürzeren Partikel ohne Haken ($700 \times 70 \text{ m}\mu$), so sind durch die Außenhaut und die Querstreifung immerhin Ähnlichkeiten mit einigen Viren der Vesikularstomatitis (V.S.V.)-Gruppe vorhanden. In ihrer Nähe vermuten auch PETERS und MÜLLER den Affenseuchenerreger. Das V. S. V., Cocal- und Egtvedvirus (BERGOLD, DITCHFIELD, HOWATSON, MUSSGAY, RECZKO, ZWILLENBERG) unterscheiden sich andererseits vom Affenseuchenerreger dadurch, daß ihre infektiösen Partikel viel kürzer und überwiegend gleichmäßig groß sind, etwa $175 \times 68 \text{ m}\mu$ (HOWATSON), daß sie, je nach Stamm verschieden häufig, eine tiefe Einbuchtung an einem Ende haben und keine Haken bilden. So würde auch das in mehreren Arbeiten die V.S.V.-Partikel beschreibende Wort „Bullet“ = (Gewehr) Geschöß für den Affenseuchenerreger ein verfehelter Vergleich sein.

Manche Blutentnahmen von fiebernden Meerschweinchen ergaben elektronenmikroskopisch keinen positiven Befund. Der 2. und 3. Fiebertag ist vielleicht günstiger als spätere Tage. Die von MÜLLER empfohlene Technik der direkten Sedimentierung der Partikel auf Netze in *horizontal drehenden* Zentrifugenbechern oder auch auf 7-Lochblenden, wie wir es durchführten, scheint ein zweckmäßiges Verfahren für den Nachweis zu sein. Mit der Abkratzung der Sedimente von der Zentrifugenbecherwand aus einem Rotor mit *schräger* Bohrung, Übertragung auf einen Glasobjektträger und Abtupfen von diesem haben wir in mehreren Versuchen keinen Erfolg gehabt.

² E. SIMPSON (Porton/England) und R. E. KISSLING (Atlanta/USA) gelang die Erregervermehrung mit cytopathischem Effekt auf BHKC (Baby-Hamster-Kidney)-Gewebe-kulturen (briefliche Mitteilung an G. MAY).

Schrifttum

- BERGOLD, G. H. and MUNZ, K.: *J. Ultrastruct. Res.* **17**, 233 (1967).
DITCHFIELD, J. and ALMEIDA, J.: *Virology* **24**, 232 (1964).
HOWATSON, A. F. and WHITMORE, G. F.: *Virology* **16**, 466 (1962).
MAY, G. und KNOTHE, H.: *Dtsch. med. Wschr.* **93**, 620 (1968).
MUSSGAY, M. and WEIBEL, J.: *J. cell. Biol.* **16**, 119 (1963).
RECZKO, E.: *Arch. ges. Virusforsch.* **10**, 588 (1961).
SIEGERT, R., SHU, HSIN-LU, SLENCZKA, W., PETERS, D. und MÜLLER, G.: *Dtsch. med. Wschr.* 1967, 2341.
ZWILLENBERG, L. O., JENSEN, M. und ZWILLENBERG, H.: *Arch. ges. Virusforsch.* **17**, 1 (1965).
- Priv. Doz. Dr. G. MAY, Prof. Dr. H. KNOTHE, Dipl. Phys. D. HÜLSER und Prof. Dr. K. HERZBERG, Hygiene Institut der Universität, 6 Frankfurt/M. 70, Paul-Ehrlich-Str. 40.

Tafel I

- Abb. 1. Erreger der Affenseuche (*Cercopithecus aethiops*) aus Meerschweichenvollblut. MS 252, Passage 7. Ösenförmige Umbiegung an einem Ende; Negativkontrast. Vergr. 100000 ×
- Abb. 2. wie Abb. 1. Haarnadelförmige Umbiegung. Negativkontrast. Vergr. 100000 ×
- Abb. 3. desgl. Meerschweinchen-Citratblut, MS 265, Passage 7. Endabschnitt eines geraden Stabes. Negativkontrast. Vergr. 200000 ×

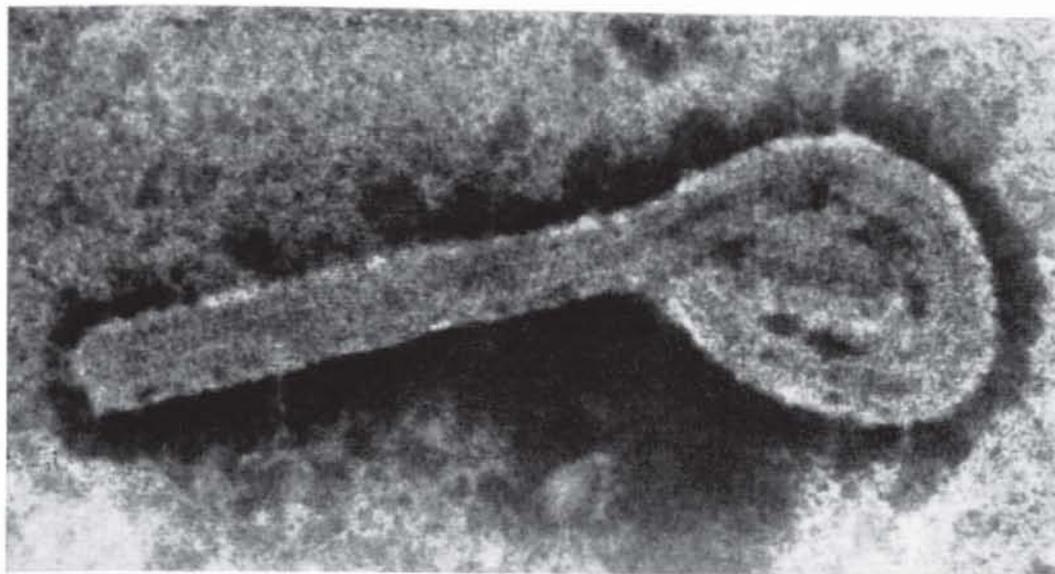


Abb. 1

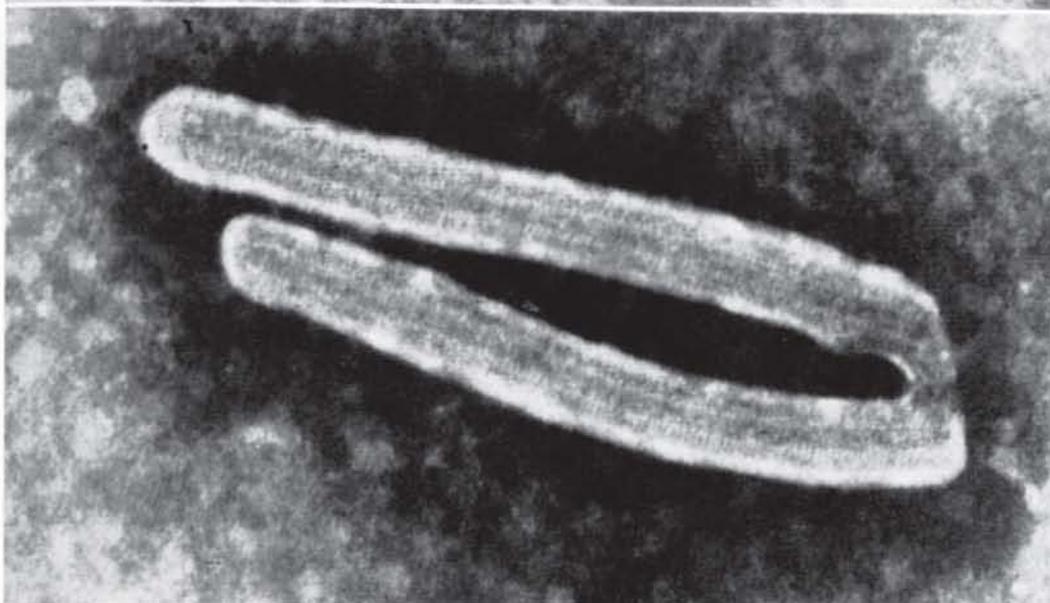


Abb. 2

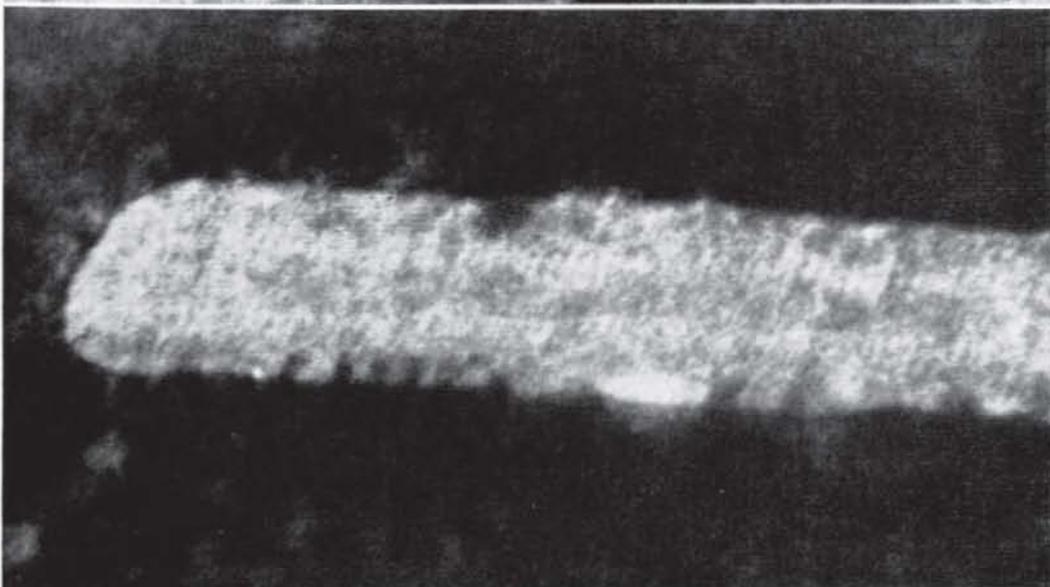


Abb. 3

Tafel II

Abb. 4. Erreger der Affenseuche aus Meerschweinchen-Citratblut MS 265, Passage 7. Parallel gelagerte gerade Stäbe ohne Haken mit Querstreifung und flockulärer Außenschicht. Negativkontrast. Vergr. 90 000 ×

Abb. 5. Erreger der Affenseuche aus Überstand von menschlicher Amniongewebekultur, 5. Passage. Negativkontrast. Vergr. 90 000 ×

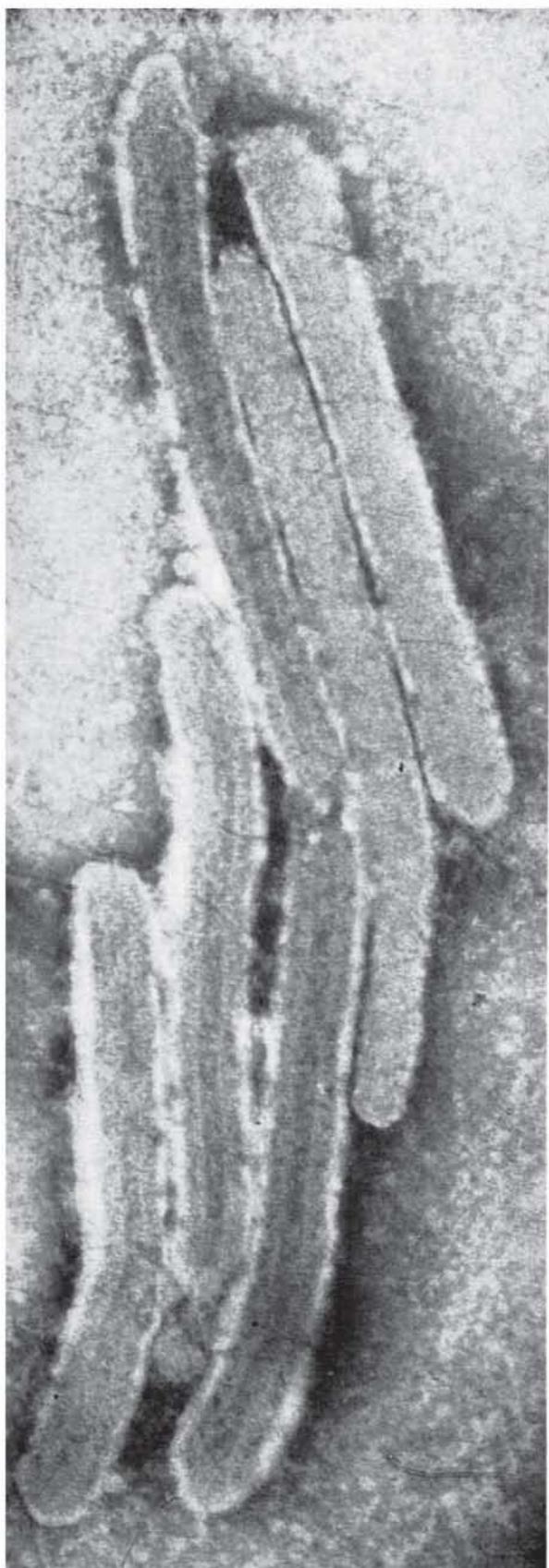


Abb. 4

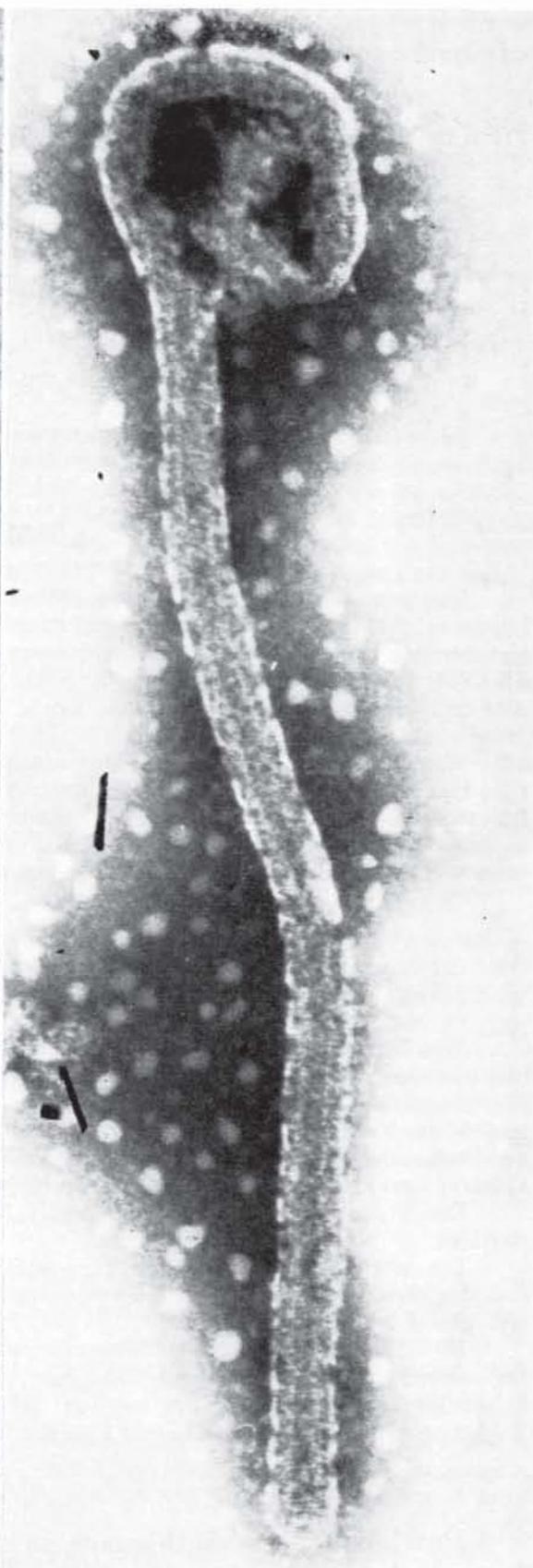


Abb. 5