

Elektronenmikroskopische Befunde in der Lunge nach Infektion mit dem Arbovirus BeAn 67949 bei der Maus

Ronaldo de Araujo* und Agustin Bullon jr.**

Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. H. Meessen)

Eingegangen am 10. November 1971

Electron Microscopic Findings in Mouse Lung Following Inoculation of Arbovirus BeAn 67949

Summary. Pulmonary changes produced in young suckling mice after intracerebral inoculation of Arbovirus BeAn 67949 are those of an interstitial pneumonitis, studied from the 5 th to the 9th day after the inoculum. The first changes are focal proliferation of septal cells with thickening of the alveolar wall and collapse of alveoli; fat droplets in the cytoplasm and occasionally in the nucleus, with degranulation and a pale nuclear chromatin are conspicuous in these cells. Inclusion bodies, both vesicular and granular in structure, were sometimes associated with focal cytoplasmic degradation. The template site of virus replication was almost exclusively the nucleus; different maturation forms, with many coreless particles were all ellipsoid and about 100 N. Extensive necrosis within foci of septal cells and hypertrophied endothelial cells bearing many inclusion bodies were the final changes.

Zusammenfassung. 10 neugeborenen weißen Mäusen wurden 0,02 ml einer Suspension von Hirngewebe intracerebral inoculiert, das von vorher mit BeAn 67949-Virus-infizierten Mäusen stammte. Am 5., 6., 7., 8. und 9. Tag nach der Inoculation wurden die Tiere getötet und Gewebestücke für histologische und elektronenoptische Untersuchungen entnommen. Das Virus BeAn 67949 ruft eine interstitielle Pneumonie hervor, die herdförmig mit einer Verdickung des Blut-Luft-Weges durch Vermehrung septaler Zellen beginnt. Es folgen ausgedehnte Nekrosen im Interstitium. Die septalen Zellen zeigen eine Auflockerung des Kernchromatins, eine Verfettung des Cytoplasma und am 8. Tag nach der Inoculation verschiedene vesiculäre und granuläre cytoplasmatische Einschlußkörper. Am 8. Tag werden reife Viruspartikel im Kern gefunden, die etwa 90 Nanometer messen und eine elliptische oder runde Form besitzen.

Causey et al. konnten 1961 in Belém (Amazonas-Gebiet), Brasilien, erstmals Arboviren der Gruppe C (Casal u. Whitman, 1961) isolieren. Seitdem ist die Zahl der Arboviren der Gruppe C stetig größer geworden (Causey et al., 1961; Bruno Lobo et al., 1962; Hammon, 1962; Gibbs et al., 1964; Causey et al., 1966); dadurch sind zahlreiche Fragen zur Nomenklatur, Klassifikation, Epidemiologie und Pathogenese aufgekommen (Melnick u. McCombs, 1966; Berghold et al., 1969; Bonsdorff et al., 1969; Tournier, 1970). Ein vorläufiger Katalog wurde durch den „Public-Health Service“ der USA veröffentlicht (Taylor, 1967); darin sind die bis November 1970 entdeckten 243 Virustypen enthalten (Am. Committee, 1970). Die durch die Arbo-Viren der Gruppe C induzierten Veränderungen sind bisher nur vereinzelt histologisch untersucht worden (de Paola, 1967; Lacerda,

* Stipendiat des DAAD. Aus dem Nucleo de Patologia Regional der Bundesuniversität Para, Brasilien (Direktor: Prof. Dr. J. M. Leite).

** Jetzt: Pathologisches Institut der Universität, Madrid/Spanien.

1967; Braga Dias, 1970). Die ultrastrukturellen Zell- und Gewebeveränderungen sind bei natürlich oder experimentell infizierten Tieren kaum bekannt (Lacerda, 1968). Immerhin scheinen diese Viren für zahlreiche Tierspecies hochpathogen zu sein (Casals u. Reeves, 1965; Olits u. Clark, 1965; Olits u. Casals, 1965). Auch Fälle von humanen Infekten konnten wir in Übereinstimmung mit Hanson (1967) im Amazonas-Gebiet beobachten. Diese Beobachtungen humaner Infektionen waren Anlaß zu eingehenderen licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Das Arbovirus BeAn 67949 (so benannt nach der Nummer des ersten inoculierten Tieres) wurde zum ersten Mal 1964 aus dem Blut einer Fledermaus (*Carollia subrufa*) von Utingawald in Belém isoliert.

Material und Methodik

10 neugeborenen weißen Mäusen wurden 0,02 ml einer Suspension von Hirngewebe intracerebral inoculiert. Die Suspension stammte von vorher mit BeAn 67949 infizierten Mäusen. Die Tiere wurden am 5., 6., 7., 8. und 9. Tag nach der Inoculation durch Dekapitation getötet; sofort entnommene Lungenstückchen wurden in einer 3% Glutaraldehyd-Phosphatpuffer-Lösung fixiert. Aus Transportgründen (Belém Düsseldorf) wurden die ersten Stücke 7 Tage, die letzten Stücke 2 Tage in dieser Lösung bei 4° C gehalten. Nach Waschen in Zuckerpufferlösung wurden die Gewebestücke mit OsO₄ nachfixiert. Durcupan-Dünnschnitte wurden mit Bleihydroxyd (Karnovsky, 1961) und Uranylacetat kontrastiert und mit dem RCA EMU-3 Elektronenmikroskop untersucht.

Befunde

5 und 6 Tage nach der Inoculation der Virussuspension sind die Befunde ähnlich und können gemeinsam beschrieben werden. Es zeigt sich eine herdförmige Vermehrung der interstitiellen septalen Zellen mit Verdickung des Blut-Luft-Weges (Abb. 1); spaltförmige Alveolarlichtungen sind frei von Zellen (Abb. 2). Im Cytoplasma der septalen Zellen finden sich zunehmend vermehrte Fetttröpfchen (Abb. 3), die hier und da auch im Kern zu sehen sind. Die unterschiedlich großen blassen Kerne zeigen ein aufgelockertes Chromatin (Abb. 2). Mitosen sind zahlreich. Die Capillaren weisen eine zunehmende Verdickung der Endothelzellen vorwiegend auf der Seite nach dem Interstitium auf (Abb. 4); selten, aber deutlich sind diese Zellen so groß, daß sie das ganzen Lumen verschließen; Lysosomen und multivesiculäre Körperchen sind vermehrt und auffällig. Auch die Endothelzellen der kleinen Arterien sind hyperplastisch. Das Alveolar- und Bronchialepithel ist intakt, ebenso die größeren Gefäße und die Nervenäste.

Am 7. und 8. Tag nach der Inoculation sind die Befunde noch intensiver ausgeprägt, Fetttröpfchen sind jetzt besonders zahlreich. In den interstitiellen septalen Zellen treten Einschlußkörper auf, die teils im Cytoplasma, teils im Kern oder in beiden gleichzeitig zu sehen sind (Abb. 6). Diese Zellen lassen oft eine Hyperplasie des Golgi-Apparates erkennen. Die cytoplasmatischen Einschlußkörper sind nur in Zellen zu finden, in denen Veränderungen des Kernes schon zu erkennen sind. Kleinere cytoplasmatische Einschlußkörper bestehen aus einem elektronendichten Bezirk mit feinen schwarzen Granula in enger Beziehung zum erweiterten endoplasmatischen Reticulum oder zum Golgi-Apparat. Nach ihrer Entstehung lassen sich zwei Arten von Einschlußkörpern unterscheiden: 1. „vesikuläre“ Einschlußkörper (Abb. 5): Dabei finden sich mehrere Vesikel oder multi-

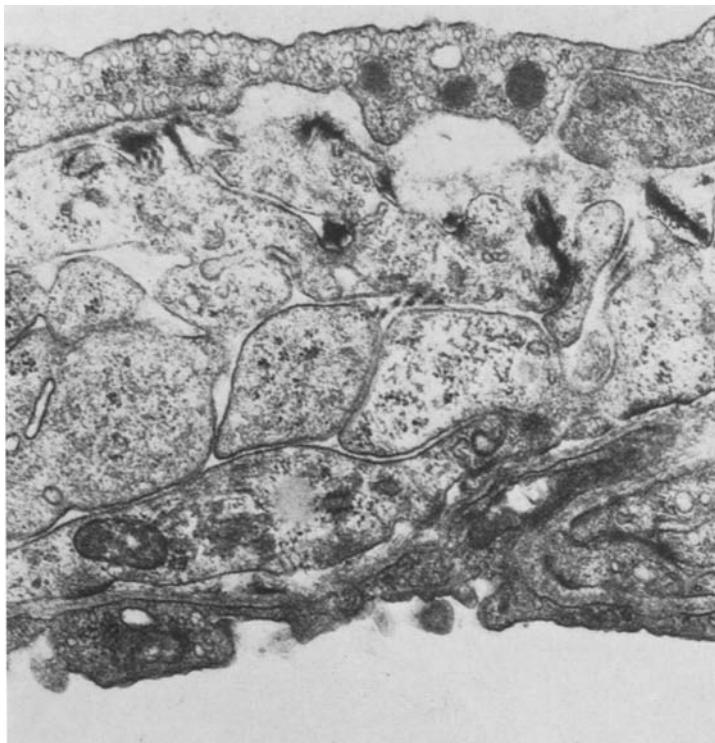


Abb. 1. Verdickung des Blut-Luft-Wegs durch vermehrte septale Zellen 5 Tage nach Inoculation von BeAn 67949-Virus. Elektronenmikr.: 8000; Gesamtvergr.: 30400

vesiculäre Körper, die durch eine einzige Membran umhüllt sind und in engem Verhältnis zum endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Apparat liegen; 2. „granuläre“ Einschlußkörper (Abb. 6), die von runder oder hufeisenförmiger Gestalt sind und sehr elektronendichte Granula mit blassen Bezirken enthalten. In diesen sind Viruspartikel zu erkennen. Die Viruspartikel sind ellipsoid, nur mit einer einzigen Membran umhüllt, messen etwa 100—110 N (Nanometer) und besitzen einen blassen oder leeren inneren Teil; an verschiedenen Stellen zeigen sie einen elektronendichten Inhalt, der manchmal zur Hälfte innerhalb, zur anderen Hälfte außerhalb der Schale wie ein streifenförmiger Bogen liegt. Beide Typen der cytoplasmatischen Einschlußkörper sind oft mit Phagosomen und Cytolysomen verbunden oder liegen in deren Nähe. Im Kern sind die Einschlußkörper bei im übrigen blassem Chromatin als fleckförmige, teils homogene, teils granuläre Bezirke zu erkennen (Abb. 6). Typische Viruspartikel werden erst ab 8. Tag im Kern beobachtet. Die intranucleäre Reifung des Virus lässt sich durch drei Arten von Partikeln belegen (Abb. 7): 1. Partikel mit einer einfachen Membran und leerem oder blassem Inhalt; 2. Partikel mit doppelter Membran und ähnlichem Inhalt und 3. Partikel mit elektronendichtem Zentrum und einfacher Membran. Zwischenformen kommen vor. Partikel mit bogenförmigen, elektronendichten Streifen, die mit der einen Hälfte innerhalb,

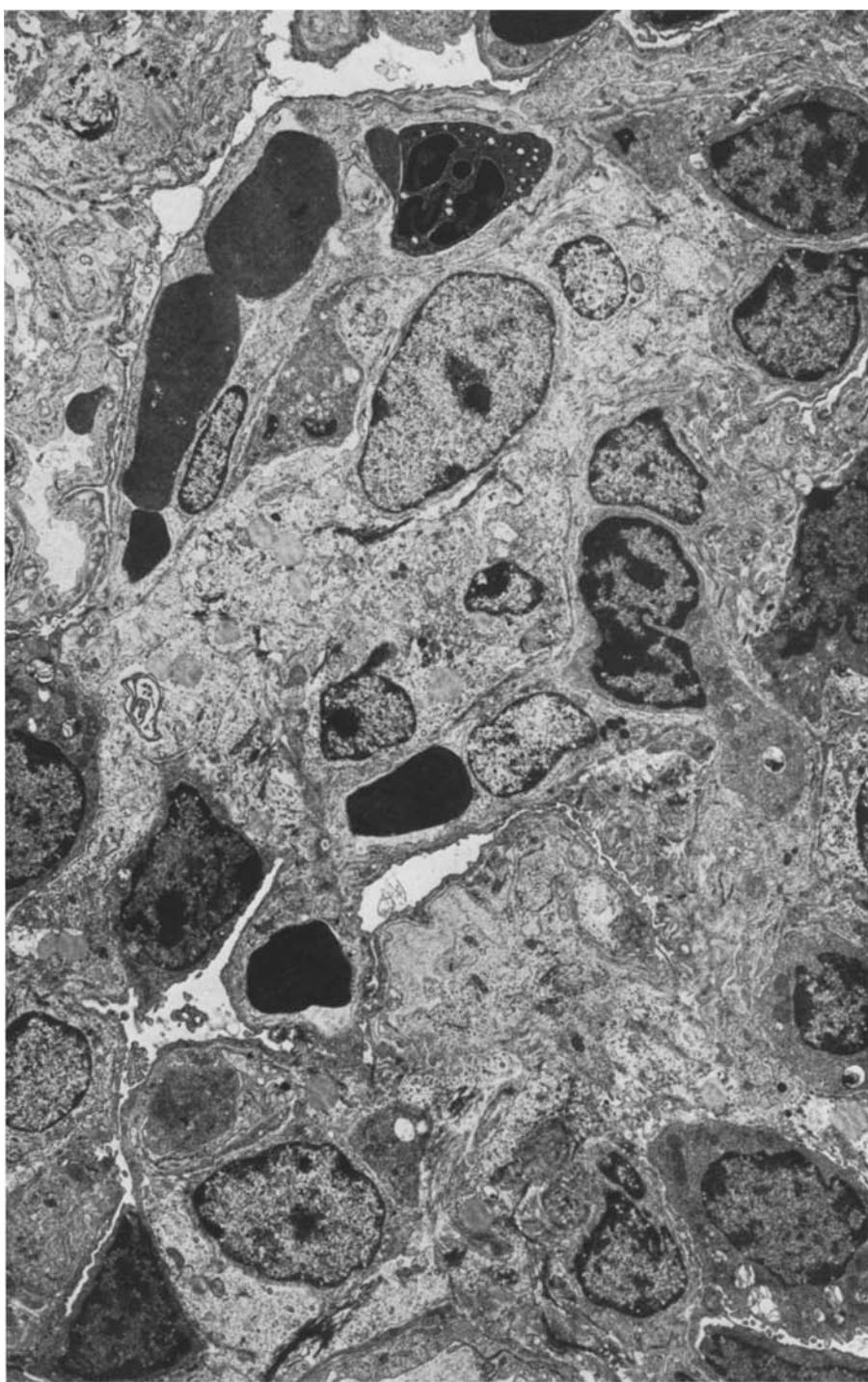


Abb. 2. Interstitielle Infiltrate und spaltförmige, zellfreie Alveolarlichtung 5 Tage nach Inoculation von BeAn 67949. Elektronenmikr.: 1800; Gesamtvergr.: 30400

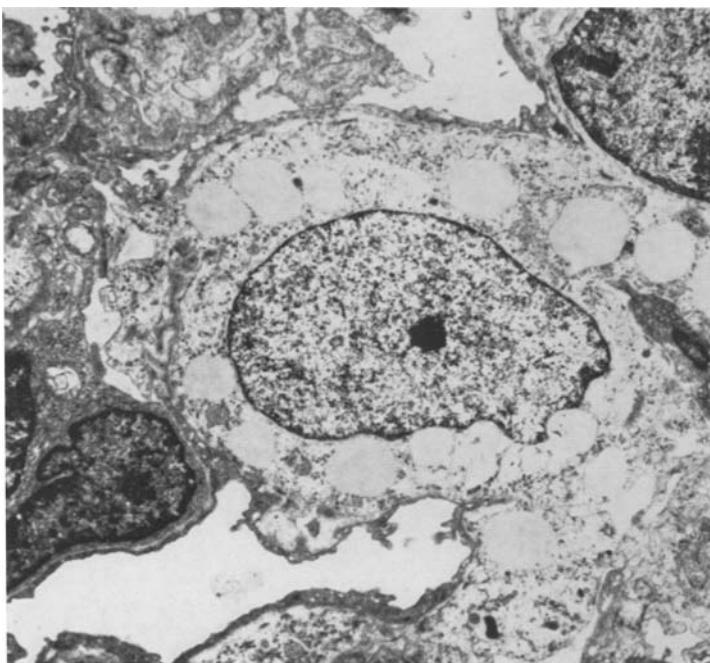


Abb. 3. Septale Zelle mit zahlreichen cytoplasmatischen Fetttröpfchen 6 Tage nach Inoculation von BeAn 67949-Virus. Elektronenmikr.: 2500; Gesamtvergr.: 9500

mit der anderen außerhalb der Membran liegen, sind wiederum nachweisbar. Die Endothelzellen der Capillaren sind weiterhin hypertrophiert. Gefäße, perivenöse Herzmuskelfasern, Nerven und einige Ganglien zeigen keine Veränderungen.

Am 9. Tag sind die Herde mit vermehrten septalen Zellen vielfach nekrotisch (Abb. 8). Die Capillaren, die trotz der Vergrößerung der Endothelzellen intakt blieben, zeigen Endothelzellkerne mit Einschlußkörpern und Viruspartikeln. Nur einmal gelang es, die Viruspartikel im Cytoplasma der Endothelzellen zu beobachten. Am 9. Tag treten auch polymorphe Leukocyten auf, die teils in Capillaren, teils im nekrotischen Gewebe liegen.

Erörterung

Unsere morphologischen Untersuchungsergebnisse lassen keine Aussage darüber zu, wo das Virus eintritt. Da wir weder in den Nerven noch in den weißen oder roten Blutkörperchen (Todd, 1928; Traub, 1938; Mackerras et al., 1940; Fenner u. Woodroffe, 1953; Mims, 1956; Gresser u. Lang, 1966; Jordan u. Doughty, 1969) oder in den Trombocyten (Schulz, 1968) Viren gefunden haben, vermuten wir, daß bei den inoculierten Erregern — wie bei anderen Viren — der Plasmatransport eine wesentliche Rolle spielt (Hamre et al., 1956; Powick, 1937; Mims, 1964). Die Fähigkeit der Endothelzellen zur Aufnahme von Lipiden (Suter u. Majno, 1965), von Proteinen und zum Transport dieser Substanzen von Blut zum pericapillären Raum ist bekannt (Browne et al., 1963): Es ist also

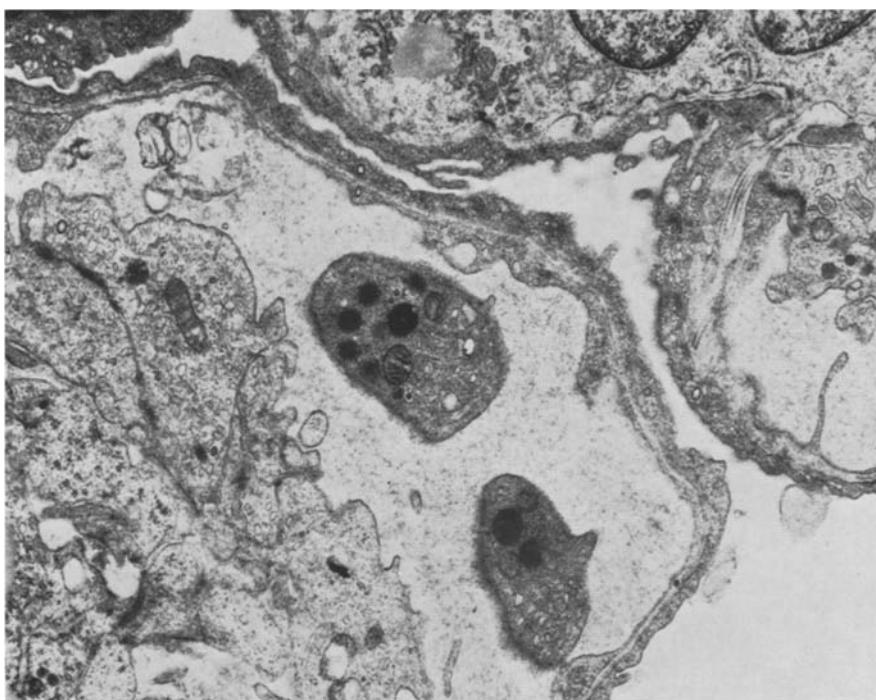


Abb. 4. Capillaren mit hypertrophiertem Endothelzelle, 6 Tage nach Inoculation von BeAn 67949-Virus. Elektronenmikr.: 3200; Gesamtvergr.: 12200

zu vermuten, daß nach einer initialen Virämie die Aufnahme des BeAn 67949-Virus durch die Endothelzellen der Lungencapillaren erfolgt und von dort aus ein schneller Transport in das Interstitium und zu den septalen Zellen erfolgt. Diese frühe Phase des Virus-Transports konnten wir in unseren Experimenten nicht darstellen. Das BeAn 67949-Virus gehört zu der Gruppe von Viren, die eine gewisse Neigung zur Ausbrütung in Bindegewebszellen zeigen, wie es bereits bei der Erythromelie (Roberts, 1963) nachgewiesen wurde. Die Befunde bestätigen Untersuchungsergebnisse von Braga Dias (1970), der lichtmikroskopisch einen besonders ausgeprägten Befall des Bindegewebes gesehen hat.

Fetttröpfchen im Cytoplasma und im Kern stellen einen geläufigen Befund bei verschiedenen Virusinfektionen, am häufigsten bei kleinen RNS-Viren wie Polio- oder Mengo-Virus (Morgan et al., 1960; Müssgay, 1964; Morgan u. Huber, 1967; Koestner et al., 1968; Lavillaureux u. Nezelof, 1970; David, 1970; Minkowitz u. Berkovich, 1970). Das intranukleäre Fett kann als Kondensat fetthaltiger Karyosphäriden aufgefaßt werden (Altmann u. Pfeiffer, 1969). Die Anwesenheit der Fetttröpfchen nur in den frühen Stadien der Infektion (sie verschwinden, wenn die Einschlußkörper auftreten) beweist, daß sie nur ein Stoffwechselstörungsprodukt und keine Anzeichen der progredienten Zellschädigung darstellen.

Die Hypertrophie und Hyperplasie des Golgi-Apparates ist bei anderen Arbovireninfektionen (Nunes-Montiel et al., 1962; Kovac et al., 1962) zu finden

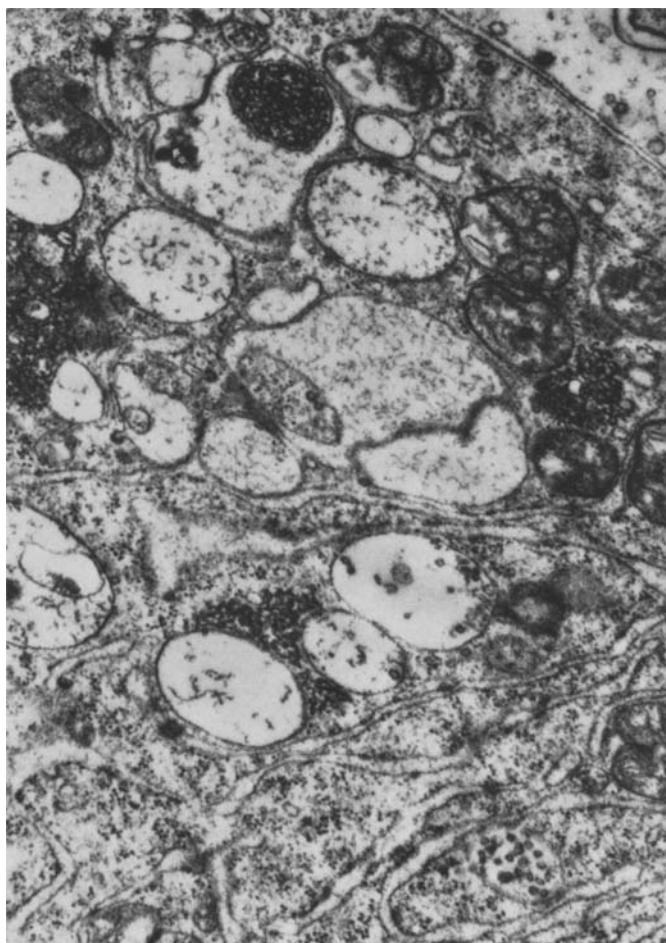


Abb. 5. Cytoplasmatische Einschlußkörper mit vorwiegend vesiculärer Struktur; unten die sog. CPV-I nach Griemley, 8 Tage nach Inoculation von BeAn 67949-Virus. Elektronenmikr.: 8500; Gesamtvergr.: 32300

und sollte als unspezifische, vielleicht parallel zur Virussynthese verlaufende Alteration anzusehen sein.

Die Hypertrophie des Capillarendothels ist deutlich von einer einfachen Schwellung (Hausamen u. Poche, 1965; Nassari et al., 1967) zu unterscheiden. Die Hypertrophie war nicht immer von degenerativen Veränderungen begleitet, wie sie unter toxischem Einfluß zu sehen sind (Giesecking, 1958; Morgenroth et al., 1969; Allen u. Carsten, 1970). Es ist daran zu denken, daß die Endothelveränderungen Folge einer Hypoxie der Alveolarwand bei erschwerter Diffusion durch Verdickung des Blut-Luft-Weges sind und sich anschließend als Folge der Hypoventilation durch den Kollaps der Alveolen weiter entwickeln. Eine direkte Einwirkung des Virus auf die Endotelzellen scheint pathogenetisch nicht bedeutsam zu sein, da die Befunde sich nicht unter der Virusmanifestation ausbilden. Das

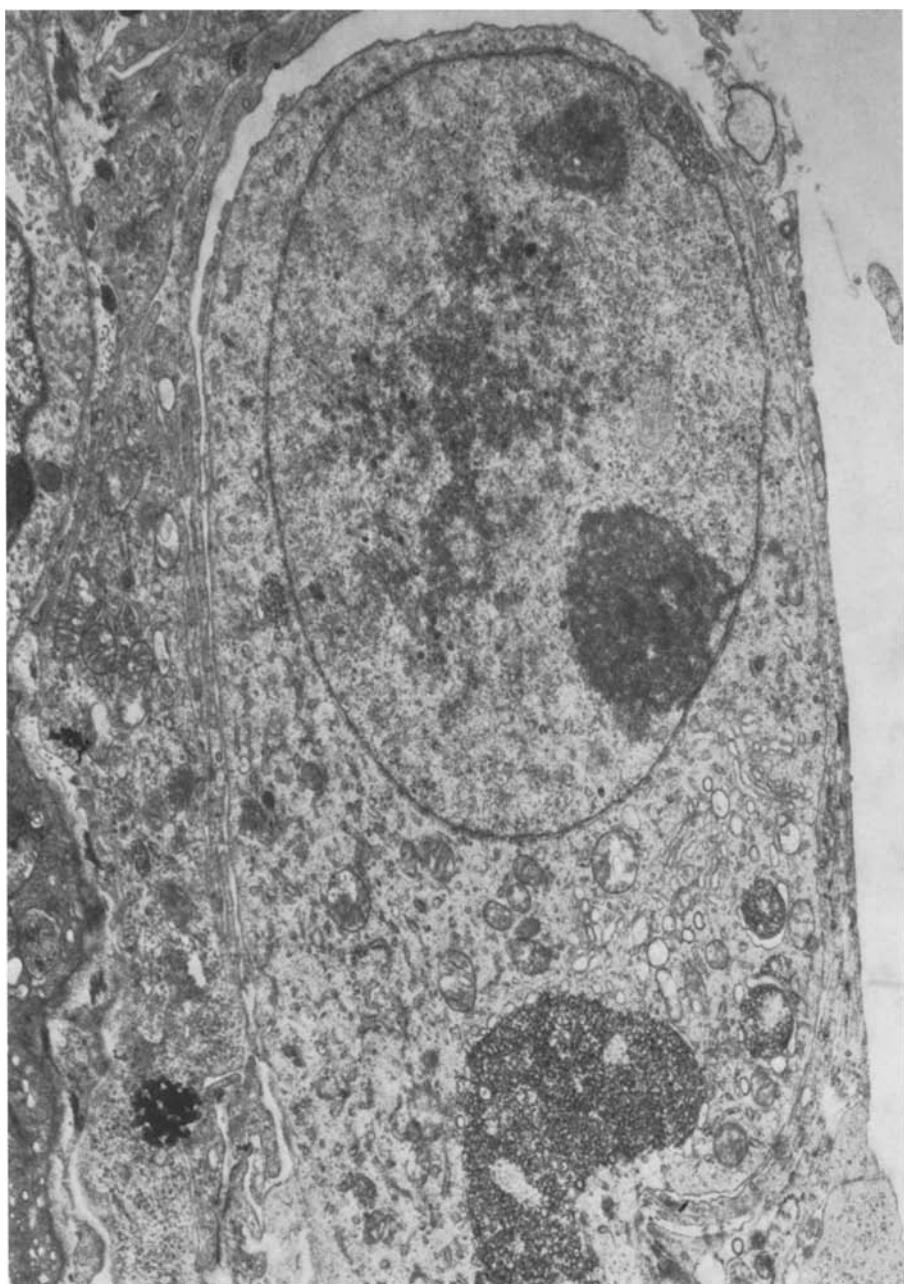


Abb. 6. Endothelzelle mit cytoplasmatischem und nucleärem Einschlußkörper sowie zahlreichen Viruspartikeln, 8 Tage nach Inoculation von BeAn 67949-Virus. Elektronenmikr.: 3200; Gesamtvergr.: 12200

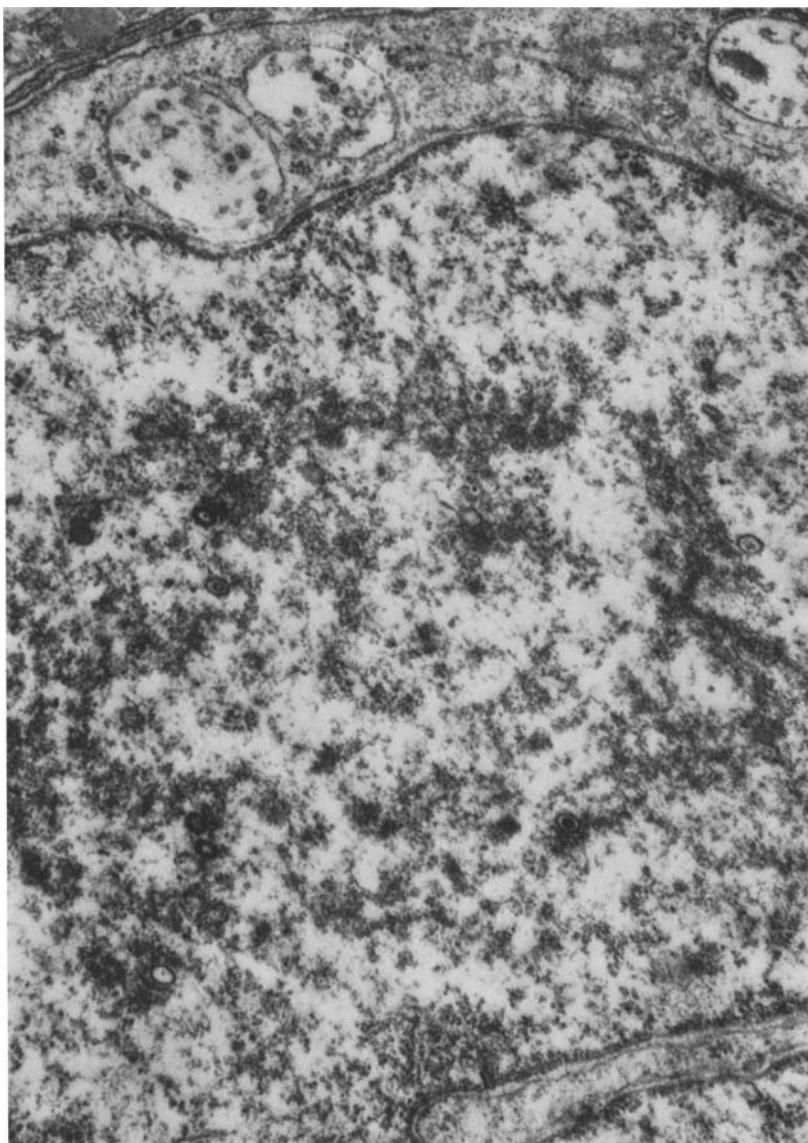


Abb. 7. Intranukleäre Reifung des Virus in einer septalen Zelle mit drei Arten von Partikeln, 8 Tage nach Inoculation von BeAn 67949-Virus. Elektronenmikr.: 8500; Gesamtvergr.: 12200

Alter der Mäuse und die kurze Entwicklungszeit der Schädigungen sprechen gegen die Bedeutung einer Immunreaktion in der Pathogenese (Finger, 1964; Morgenroth, 1970).

Die dargestellten Viruspartikel, die höhere Durchmesser (100 N) als andere Arboviren erreichen, sind denen bei Herpes simplex (Morgan et al., 1960; Swanson et al., 1966; Siegert u. Falke, 1966; Nil et al., 1968; Nil et al., 1968a), von experi-

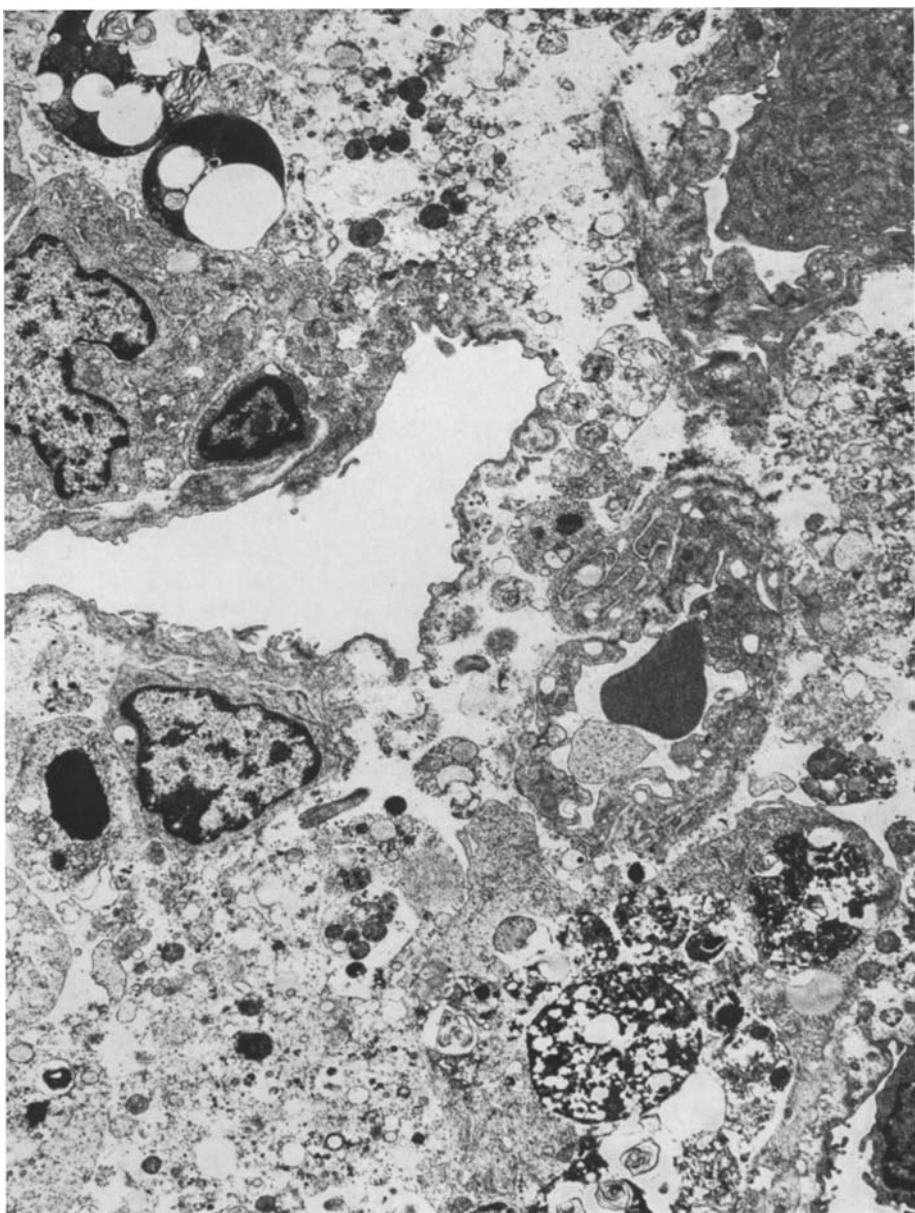


Abb. 8. Ausgedehnte Nekrose im Interstitium 9 Tage nach Inoculation von BeAn 67949-Virus. Elektronenmikr.: 1800; Gesamtvergr.: 6900

mentellen Tiertumoren (Scherrer, 1968) und denen von Typ C (Swartzendruber et al., 1967) ähnlich. Trotzdem kann das BeAn-Virus 67949 einfach von den genannten anderen Viren unterschieden werden: Es besitzt eine mehr ellipsoide Form und seine Capside sind deutlich zu erkennen; der Binnenkörper ist oft

exzentrisch gelagert (die anderen Viren sind entweder rund oder sechseckig und durch eine nicht so scharfe Hülle begrenzt). Es wurden außerdem leere Viruspartikel („coreless particles“) gefunden, wie es bei Picorna- (Plummer, 1965), Reo- (Rhim et al., 1961), Papova- (Crawford et al., 1962; Breedis et al., 1963; Noyes, 1964; Black et al., 1964), Adeno- (Smith, 1965) und Herpesvirus (Watson et al., 1963) schon beschrieben ist; diesen Partikeln wird keine infektiöse Bedeutung zugeschrieben, da sie keine RNS enthalten. Die Vermutung von Horne u. Wildy (1961), daß diese leeren Viruspartikel von reifen Viruspartikeln stammen, konnte durch uns morphologisch bestätigt werden. Wir konnten beobachten, daß über den capsidähnlichen Schalen die Nucleinsäurepartikel halb innen und halb außen lagen. Wir müssen trotzdem erwähnen, daß diese Bilder auch einen umgekehrten Vorgang sowie untergehende oder atypische Virusformen darstellen können. Eine Umhüllung der Viruspartikel durch Zellmembranen sahen wir nicht.

Die Virussynthese im Kern ist hervorzuheben, da bei Arboviren regelmäßig das Cytoplasma als Reduplikationsort angegeben wird (Mussgay, 1964; Moritsch, 1965; Blaskovic u. Libikova, 1967; Tournier, 1970). Nur ausnahmsweise ist eine Reduplikation im Kern zu sehen (Bykovsky et al., 1969; Oynagi, 1969). Wir müssen allerdings hinzufügen, daß bis heute fast alle Untersuchungen nur mit Arboviren der Gruppe A durchgeführt wurden (Mussgay, 1964). Die Beschreibung einer Reifung von BeAn 67949-Viruspartikel in der Leber wie in der Lunge am 8. Tag nach der Inoculation (Huth u. Araujo, 1971) ist eine Bestätigung für die seit langem bekannte Beobachtung, daß das Virus in verschiedenen Zellen gleichartige Veränderungen hervorrufe (Thomas, 1960). Wir konnten weder die kettenförmige noch eine kristallähnliche Anordnung (typisch für Gruppe A-Arboviren), noch eine Häufung von Viren im stark veränderten endoplasmatischen Reticulum (typisch für Gruppe B-Arboviren) (Murphy et al., 1968) nachweisen.

Die Einschlußkörper gehören weder zur Gruppe reiner Degenerationsformen — wie es bei Pocken — (Kato et al., 1959), Warzen- (Williams et al., 1961), Rift-Valley-Fieber- (McGavran u. Eastearday, 1963) und Gelbfiebervirusinfektionen (Baruch et al., 1963) der Fall ist —, noch zu reinen Reduplikationsorten der Viren — wie z.B. die Negri-Körperchen bei Infektionen mit Tollwutvirus (Jenson, 1968), die Feulgen-positiven Bezirke bei Adeno- (Morgan et al., 1960), Pocken- (Kato et al., 1959; Patrizi u. Middelkamp, 1969) oder Papovavirusinfektionen (Williams et al., 1961) und die Viroplasmaherde bei Herpes- (Love u. Wildy, 1963) und Myxovirus (Tawada et al., 1961). Wir nehmen an, daß sich die Bedeutung der Einschlußkörper während des Infektionsablaufes ändert, wir konnten nämlich nicht nur die CPV-I („cytopathic vacuole“) von Griemley et al. (1968), sondern auch Herde wie bei Herpes-Infekt (Chou et al., 1967) und Einschlußkörper darstellen, die zu den Phagolysomen und Cytolysomen Beziehungen haben.

Durch das Arbovirus BeAn 67949 konnte also eine interstitielle Pneumonie induziert werden, die sich in kleineren Herden entwickelte und zunächst mit einer Verdickung des Blut-Luft-Weges durch Vermehrung septaler Zellen, schließlich auch mit ausgedehnten Nekrosen einherging. Zusammenfassend läßt sich der formale Ablauf der Alterationen folgendermaßen darstellen: zuerst zeigen die vermehrten septalen Zellen eine zunehmende Einlagerung von Lipiden, eine Auflockerung ihres Chromatins und Mitosen; am 7. Tag sind Einschlußkörper

und am 8. Tag eine Reduplikation von Viruspartikeln zu erkennen; am 9. Tag kommt es zu ausgedehnten Nekrosen; in den nekrotischen Herden bleiben lediglich die Endothelzellen weitgehend intakt. Diese Befunde lassen sich von solchen nach Infektion mit Pockenviren (Montasir et al., 1966), Myxoviren (Plummer u. Stone, 1964) und K-Papovavirus (Fischer u. Kilham, 1953; Jordan u. Doughty, 1969) unterscheiden.

Literatur

- Ahlström, C. G.: On the anatomical character of the infectious myxoma of rabbits. *Acta path. microbiol. scand.* **17**, 377—393 (1940).
- Allen, J. R., Carsten, L. A.: Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats. *Exp. molec. Path.* **13**, 159—171 (1970).
- Altmann, H.-W., Pfeifer, U.: Beitrag zur Kenntnis der Karyosphäridien (nuclear bodies). Fetthaltige Sphäridien nach partieller Hepatektomie. *Virchows Arch.Abt. B* **2**, 220—228 (1969).
- American Committee on Arthropod-Borne Viruses Catalogue of Arthropod-born viruses of the world. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* **19**, 1082—1084 (1970).
- Baruch, E., Carbonell, L., Weibel, J.: Fine structure of Councilman bodies in the liver of *Aluatta seniculus* L infected with yellow fever virus. *Exp. Cell Res.* **29**, 50—53 (1963).
- Berghold, G. H.: Structure of 9 arboviruses. *J. gen. Virol.* **5**, 135—140 (1969).
- Black, P. H., Crawford, E. M., Crawford, L. V.: The purification of simian virus 40. *Virology* **24**, 381—387 (1964).
- Blaskovic, D., Libikova, H.: Arbovirus infections. In: *Infektionskrankheiten*, ed. O. Gsell u. W. Mohr. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
- Bonsdorf, C. H. V., Saiku, P., Oker-Blom, N.: The inner structure of Uukuniemi an 2 Bunyamwera supergroup arboviruses. *Virology* **39**, 342—344 (1969).
- Braga Dias, L.: Persönliche Mitteilung, 1970.
- Breedis, C., Berwick, Y., Anderson, T. F.: Fractionation of Shope papilloma virus in cesium chloride density gradients. *Virology* **19**, 340—348 (1963).
- Browne, J. T., Hutt, M. P., Reger, J. F., Smith, S. W.: Localisation of "fibrinoid" deposit in lupus nephritis: An electron microscopic demonstration of glomerular endothelial cell phagocytosis. *Arthr. Rheumat.* **6**, 599—614 (1963).
- Bruno-Lobo, M., Bruno-Lobo, G., Travassos, J.: Estudos sobre arbovírus. *Anais do Instituto de Microbiologia da Universidade do Brasil*. Rio de Janeiro, 1962.
- Bykovsky, A. F., Yershov, F. I., Zhdanov, V. M.: Morphogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J. Virol.* **4**, 496—504 (1969).
- Casals, J., Reeves, W. C.: Arthrop-borne animal viruses. In: *Viral and rickettsial infections of man*, 4th ed., ed. T. M. Rivers, F. L. Horsfall. Philadelphia: Lipincott 1965.
- Casals, J., Whitman, L.: Group C: ab new serological group of hitherto undescribed arthropod-borne viruses. Immunological studies. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* **10**, 250—258 (1961).
- Causey, O. R.: Marco, Timbo and Chaco, newly recognized arboviruses from lizards of Brazil. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* **15**, 239—243 (1966).
- Causey, O. R., Causey, C. E., Maroja, O. M., Macedo, D. G.: The isolation of arthropod-borne viruses including members of two hitherto undescribed serological groups in the Amazon region of Brazil. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* **10**, 227—249 (1961).
- Chou, S. M., Cherry, J. D.: Ultrastructure of Cowdry type A inclusions. I. In Human herpes simplex encephalitis. *Neurology (Minneapolis)* **17**, 575—587 (1967).
- Crawford, L. V., Crawford, E. M., Watson, D. H.: The physical characteristics of polyoma virus. I. Two types of particles. *Virology* **18**, 170—176 (1962).
- David, H.: Zellschädigung und Dysfunktion. In: *Protoplasmatologia*, Bd. X-1. Wien-New York Springer 1970.
- De Paola, D.: Patologia dos vírus tropicais. *Atas Simp. Biota Amaz.* **6** (Patol.), 25—29 (1967).
- Fawcett, D.: Electron microscope observations on intracellular virus-like particles associated with the cells of the Lucké renal adenocarcinoma. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 725—742 (1956).

- Fenner, F., Marshall, I. D.: A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J. Hyg. (Lond.)* **55**, 149—190 (1957).
- Fenner, F., Woodroffe, G. M.: The pathogenesis of infectious myxomatosis: the mechanism of infection and the immunological response in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Brit. J. exp. Path.* **34**, 400—411 (1953).
- Finger, H.: Das Freundsche Adjuvans, Wesen und Bedeutung. Stuttgart: G. Fischer 1964.
- Fischer, E. R., Kilham, L.: Pathology of a pneumotropic virus recovered from C3 H mice carrying the Bittner milk agent. *Arch. Path.* **55**, 14—19 (1953).
- Gibbs, Jr., Bruckner, C. R., Schenker, E. A., Schenker, S.: A case of Apeú virus infection. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* **13**, 108—113 (1964).
- Giesecking, R.: Das experimentelle Lungenödem im elektronenoptischen Bild. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **42**. Tagg, 344—348 (1964).
- Gresser, I., Lang, D. J.: Relationships between viruses and leucocytes. *Progr. med. Virol.* **8**, 62—130 (1966).
- Griemley, P. M., Berezesky, I. K., Friedman, R. M.: Cytoplasmatic structures associated with an arbovirus infection. Loci of viral ribonucleic synthesis. *J. Virol.* **2**, 1326—1338 (1968).
- Hammon, W. M.: Arthropod-borne viruses. *Med. Sci.* **12**, 753—764 (1962).
- Hamre, D., Appel, J., Loosli, C. G.: Viraemis in mice with pulmonary influenza A virus infection. *J. Lab. clin. Med.* **47**, 182—193 (1956).
- Hanson, R. P.: Arbovirus infections of laboratory workers. *Science* **158**, 1283—1286 (1967).
- Hausamen, T. U., Poche, R.: Die Ultrastruktur des Herzmuskels der Ratte nach einmaligen und wiederholten Unterdruckversuchen. *Virchows Arch. path. Anat.* **339**, 212—224 (1965).
- Horne, R. W., Wildy, P.: Symmetry in virus architecture. *Virology* **15**, 348—373 (1961).
- Huth, F., Araujo, R. de: Elektronenmikroskopische Befunde in der Leber nach Arbovirus BeAn 67949 (im Druck).
- Jordan, S. W., Doughty, W. E.: Ultrastructural pathology of murine pneumonitis caused by K-Papovavirus. *Exp. molec. Path.* **11**, 1—7 (1969).
- Karnovsky, M. J.: Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 729—732 (1961).
- Kato, S., Takahashi, M., Kameyama, S., Kamahora, J.: A study on the morphological and cyto-immunological relationship between the inclusions of variola, cowpox, rabbitpox, vaccinia (variola origin) and vaccinia IHD and a consideration of the term "Guarnieri bodies". *Biken's J.* **2**, 353—363 (1959).
- Koestner, A., Kasza, L., Kindig, O., Shadduck, J. A.: Ultrastructural alterations of tissue cultures infected with a pathogenic porcine adenovirus. *Amer. J. Path.* **53**, 651—665 (1968).
- Kovac, W., Kunz, C., Stockinger, L.: Die elektronenmikroskopische Darstellung des Virus der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in HeLa Zellen. *Arch. ges. Virusforsch.* **11**, 544—567 (1962).
- Lacerda, P. R. S.: Alterações ultraestruturais do fígado na infecção experimental por arbovirus do grupo C, B e 17 (Oriboca). Nota preliminar. *Hospital* **74**, 815—830 (1968).
- Lacerda, P. R. S., Paola, D. de, Bruno-Lobo, M., Bruno-Lobo, G.: Histopatologia das arboviroses do grupo C. *Atas Simp. Biota Amaz.* **6** (Patol.), 113—115 (1967).
- Lavillaureix, J., Nezelof, C.: Les alterations cellulaires propres aux infections virales. *Ann. Anat. path.* **15**, 21—46 (1970).
- Love, R., Wildy, P.: Cytochemical studies of the nucleoproteins of HeLa cells infected with herpes virus. *J. Cell Biol.* **17**, 237—254 (1963).
- Lunger, P.: The isolation and morphology of the Lucké frog kidney tumor virus. *Virology* **24**, 138—145 (1964).
- Lunger, P. D., Darlington, R. W., Granoff, A.: Cell-virus relationship in the Lucké renal adenocarcinoma: an ultrastructural study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **126**, 289—314 (1965).
- Mackerras, I. M., Mackerras, M. J., Burnet, F. M.: Experimental studies of ephemeral fever in Australian cattle. *C.S.I.R.O. Bull.* **136**, 1—116 (1940).
- McGavran, M. H., Easterday, B. C.: Rift Valley fever virus hepatitis. Light and electron microscopic studies in the mouse. *Amer. J. Path.* **42**, 587—607 (1963).

- Melnick, J. L., McCombs, R. M.: Classification and nomenclature of animal viruses. *Progr. med. Virol.* **8**, 400—409 (1966).
- Mims, C. A.: Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bact. Rev.* **28**, 30—71 (1964).
- Mims, C. A.: Rift valley fever virus in mice. I. General features of the infection. *Brit. J. exp. Path.* **37**, 99—109 (1956).
- Minkowitz, S., Berkovich, S.: Hepatitis produced by coxsackie virus B 1 in adult mice. *Arch. Path.* **89**, 427—433 (1970).
- Montarsir, M., Rabin, E. R., Philipps, C. A.: Vaccinia pneumonia in mice: a light and electron microscopic and viral assay study. *Amer. J. Path.* **48**, 877—895 (1966).
- Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M., Moore, D. H.: Structure and development of viruses in the electron microscope. II. Vaccinia and fowl pox virus. *J. exp. Med.* **100**, 301—310 (1956).
- Morgan, C., Godman, G. C., Breitenfeld, P. M., Rose, H. M.: A correlative study by electron and light microscopy of the development of the type 5 adenovirus. I. Electron microscopy. *J. exp. Med.* **112**, 373—382 (1960).
- Morgan, C., Eose, H. M., Mednis, B.: Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry. *J. Virol.* **2**, 507—516 (1968).
- Morgan, T. E., Huber, G. L.: Loss of lipid during fixation for electron microscopy. *J. Cell Biol.* **32**, 757—760 (1967).
- Morgenroth, K.: Kapillarveränderungen in der Lunge nach wiederholter Applikation von komplettem Freundschen Adjuvans. *Beitr. path. Anat.* **141**, 301—312 (1970).
- Morgenroth, Jr., Backmann, K., Strohmeyer, A.: Quantität und Qualität des experimentellen Lungenoedems. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **53**. Tagg, 363—367 (1969).
- Moritsch, H. v.: Die Arboviren. In: *Virus- und Rickettsieninfektionen des Menschen* (R. Haas u. O. Vivell, ed.). München: J. E. Lehmann 1965.
- Murphy, F. A., Whitfield, S. G., Coleman, P. H., Calisher, C. H.: California group arboviruses: electron microscopic studies. *Exp. molec. Path.* **9**, 44—56 (1968).
- Mussgay, M.: Growth cycle of arboviruses in vertebrate and arthropod cells. *Progr. med. Virol.* **6**, 193—267 (1964).
- Nasseri, N., Bücherl, E. S., Wolff, J.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Strukturveränderungen der Lunge nach Einwirkung hohen Sauerstoffdruckes. *Virchows Arch. path. Anat.* **342**, 190—198 (1967).
- Nil, S., Morgan, C., Rose, H. M.: Electron microscopy of herpes simplex virus. II. Sequence of development. *J. Virol.* **2**, 517—536 (1968).
- Nil, S., Morgan, C., Rose, H. M., Hsu, K. C.: Electron microscopy of herpes simplex virus. IV. Studies with Ferritin-conjugated antibodies. *J. Virol.* **2**, 1172—1184 (1968).
- Noyes, W. F.: Structure of human wart virus. *Virology* **23**, 65—72 (1964).
- Nunez-Montiel, O., Mussgay, M., Weibel, J.: Citopatología de la infección con reovirus y virus de la encefalitis equina venezolana en células cultivadas. Posible papel del complejo de Golgi en la formación viral. Estudio con el microscopio electrónico. *Rev. lat-amer. Anat. pat.* **6**, 1—8 (1962).
- Olitsky, P. K., Casals, J.: Arthrop-borne group A virus infections of man. In: *Viral and rickettsial infections of man* (T. M. Rivers and F. L. Horsfall, ed.). Philadelphia: J. P. Lippincott 1965.
- Olitsky, P. K., Clarke, D. H.: Arthrop-borne group B virus infections of man. In: *Viral and rickettsial infections of man* (T. M. Rivers and F. L. Horsfall, ed.). Philadelphia: J. P. Lippincott 1965.
- Oyanagi, S., Ikuta, F., Ross, E. R.: Electron microscopic observations in mice infected with Japanese encephalitis. *Acta neuropath. (Berl.)* **13**, 169—181 (1969).
- Patrizi, G., Middelkamp, H. N.: In vivo and in vitro demonstration of nuclear bodies in vaccinia infected cells. *J. Ultrastruct. Res.* **28**, 275—287 (1969).
- Plummer, G.: The picorna virus of man and animals. A comparative review. *Progr. med. Virol.* **7**, 326—361 (1965).
- Plummer, M. J., Stone, R. S.: The pathogenesis of viral influenzal pneumonia in mice. *Amer. J. Path.* **45**, 95—113 (1964).
- Powick, W.: Distribution of hog cholera virus among fractions of virus in blood. *J. Agr. Res.* **54**, 221—233 (1937).

- Rhim, J. S., Smith, K. O., Melnick, J. L.: Complete and coreless forms or reovirus (ECHO 10). Ratio of number of virus particles to infective units in the one-step growth-cycle. *Virology* **15**, 428—435 (1961).
- Roberts, J. A.: Histopathogenesis of mousepox. I. Respiratory infection. *Brit. J. exp. Path.* **43**, 451—461 (1962).
- Roberts, J. A.: Histopathogenesis of mousepox. II. Cutaneous infection. *Brit. J. exp. Path.* **43**, 462—468 (1962).
- Roberts, J. A.: Histopathogenesis of mouse pox. III. Ectromelia virulence. *Brit. J. exp. Path.* **44**, 465—472 (1963).
- Scherrer, R.: Viral and host DNA synthesis in Shop fibroma virus induced cells as studied by means of high resolution autoradiography. *J. Virol.* **2**, 1418—1428 (1968).
- Schulz, H.: Thrombozyten und Thrombose im elektronenmikroskopischen Bild. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Siegert, R., Falke, D.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung des Herpes virus hominis in Kulturzellen. *Arch. ges. Virusforsch.* **19**, 230—249 (1966).
- Smith, K. O.: Studies on adenovirus 12. I. Quantitative correlations between some physical, antigenic and infectious properties. *J. Bact.* **90**, 278—281 (1965).
- Suter, E. R., Majno, G.: Passage of lipid across vascular endothelium in newborn rats. Electron microscopic study. *J. Cell Biol.* **27**, 163—177 (1965).
- Swanson, J. L., Craghead, J. E., Reynolds, E. S.: Electron microscopic observations on herpes virus hominis (herpes simplex virus) encephalitis in man. *Lab. Invest.* **15**, 1966—1981 (1966).
- Swartzendruber, D. C., Ma, B. I., Murphy, W. H.: Localisation of C-type virus particles in lymphoid germinal centers of L 58 mice. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **126**, 731—734 (1967).
- Tawara, J. T., Goodman, J. R., Imagawa, D. T., Adams, J. M.: Fine structure of cellular inclusions in experimental measles. *Virology* **14**, 410—416 (1961).
- Taylor, R. M.: Catalogue of arthropod-borne viruses of the world. 1. ed. U. S. Public Health Service, Publ. No 1760 (1967).
- Thomas, R.: Viruses. In: *The cell* (J. Brachet, A. E. Mirsky, ed.). New York: Academic Press 1960.
- Todd, C.: Experiments on the virus of fowl plague. *Brit. J. exp. Path.* **9**, 19—27 (1928).
- Tournier, P.: Anatomie et classification des virus. *Ann. Anat. path.* **15**, 7—20 (1970).
- Traub, E.: Factors influencing the persistence of choriomeningitis virus in the blood of mice after clinical recovery. *J. exp. Med.* **68**, 229—250 (1938).
- Watson, D. H., Russel, W. C., Wildy, P.: Electron microscopic particle counts on herpes virus using the phosphotungstate negative staining technique. *Virology* **19**, 250—260 (1963).
- Williams, M. G., Howatson, A. F., Almeida, J. D.: Morphological characterization of the virus of the human common wart (*verruca vulgaris*). *Nature (Lond.)* **189**, 895—897 (1961).

Prof. Dr. H. Meessen
Patholog. Institut der Universität Düsseldorf
D-4000 Düsseldorf, Moorenstr. 5
Deutschland