

19. VAN DER MERWE, S.: Some remarks on the "tampani" of the *Ornithodoros moubata* complex in Southern Africa. *Zoolog. Anz.* 181, 280–289 (1968).
20. VARMA, M. G. R.: Transmission of relapsing fever spirochaetes by ticks. *Symp. zool. Soc. Lond.*, No. 6, pp. 61–82 (1962).
21. WHITMAN, L., and T. H. G. AITKEN: Potentiality of *O. moubata* as a reservoir of West Nile virus. *Ann. trop. Med. Parasitol.* 54, 192–204 (1960).

Authors' address: Dr. W. PLOWRIGHT, East African Veterinary Research Organization, Muguga, P.O. Kabete, Kenya, East Africa.

Archiv für die gesamte Virusforschung 31, 51–60 (1970)

© by Springer-Verlag 1970

## Charakterisierung eines vom Rhinoceros isolierten Hühnerpockenvirus<sup>1</sup>

Von

A. MAYR und H. MAHNEL

Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Ludwig Maximilians-Universität, München, BRD  
(Vorstand: Prof. Dr. ANTON MAYR)

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 31. Januar 1970

### Zusammenfassung

Ein vom Rhinoceros isolierter Pockenvirusstamm konnte als Hühnerpockenvirus charakterisiert werden. Das Virus unterschied sich von den bisher bekannten Hühnerpockenstämmen in mehrfacher Hinsicht. Es vermehrte sich nicht in Zellkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten mit einem cytopathogenen Effekt, die Pockenherdbildung auf der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos und die parallel laufenden entzündlichen Prozesse verliefen gewebefreundlich und die Inkubationszeit im Eintagsküken betrug bei relativ starker Virulenz 3 bis 4 Wochen.

Die Tatsache der Haftung und Vermehrung eines Geflügelpockenvirus in einem Säugetier und die möglichen Ansteckungswege werden aufgezeigt. Dabei wird auf die epidemiologische Bedeutung von Arthropoden als Zwischenwirte bei Pockeninfektionen aufmerksam gemacht.

### Summary

#### Characterization of a Fowlpox Virus Isolated from a Rhinoceros

A poxvirus strain isolated from a rhinoceros was characterized as a fowlpoxvirus. This virus differed in several aspects from the fowlpox strains known so far. It did not multiply in cell cultures from chicken embryo fibroblasts with cytopathic effect, also the pocks on the chorioallantoic membrane of the chicken embryo as well as the inflammatory reactions developed less intensively and the incubation period in infected newborn chicken lasted 3 to 4 weeks showing a relatively high virulence.

The attachment and multiplication of an avian poxvirus in a mammalian host and the possible modes of infection were indicated. In this connection the epidemiological importance of arthropods as intermediate hosts in poxvirus infections was pointed out.

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. Dr. C. HALLAUER zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

## 1. Einleitung

1968 diagnostizierten GRÜNBERG und BURTSCHER (5) eine pockenartige Erkrankung bei einem 30 Jahre alten Rhinoceros des Wiener Tiergartens Schönbrunn. Das Tier verendete wenige Tage später. Auf Grund der Sektion wurden Infektkachexie und Herzinsuffizienz nach chronischer Rhizopus-Mykose der Lunge als Todesursache festgestellt.

Klinik, pathologische Anatomie und Histopathologie der Hautveränderungen sprachen für eine Infektion des stark geschwächten Tieres mit einem Erreger der Pockengruppe. Aus den Hautveränderungen züchteten GRÜNBERG und BURTSCHER über das Hühnerbrutei ein Pockenvirus, das sich auf der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos mit typischen, herdförmigen Veränderungen weiterpassieren und nur auf Hühner kutan übertragen ließ.

Zusammen mit dem Nachweis von Einschlußkörperchen wurde der Verdacht auf eine Infektion mit einem Virus der Subgruppe Avipoxvirus geäußert. Die Möglichkeit einer Kontamination bei der Entnahme und Anzüchtung des Materials wurde verneint.

Über die Charakterisierung des im Hühnerbrutei angezüchteten Virus wird berichtet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Virusstämme

Der von GRÜNBERG und BURTSCHER (5) isolierte Virusstamm führte die Bezeichnung „X 77/67“. Er wurde in unserem Institut dreimal im bebrüteten Hühnerbrutei über die Chorioallantoismembran (CAM) weiterpassiert. Die Ernte der 4. Münchener Passage (etwa 30 stark positive CAM) diente nach Verreibung mit PBS im Verhältnis 1:10 und niedertouriger Abzentrifugierung als Virusausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen. Der Virusgehalt lag bei  $2,5 \times 10^6$  PBE/ml bzw.  $10^{6,6}$  EID<sub>50</sub>/ml. Für Vergleichszwecke wurden der Hühnerpockenvirusstamm HP-1, der Taubenpockenvirusstamm TP-1, der Kanarienvirusstamm KP-1 und der Vaccinevirusstamm CVA (infizierte CAM-Verreibungen oder hochtitrige Virusernten aus Hühnerfibroblastenkulturen) eingesetzt (9).

### 2.2. Viruszüchtung

Die Vermehrung des Stammes X 77/67 und der Vergleichsviren erfolgte in 11 Tage alten Hühnerembryonen, die aus seuchenfreien und nichtgeimpften Beständen stammten. Die Bruteier wurden auf die gesenkte CAM geimpft.

Ferner verwendeten wir primäre Zellkulturen embryonaler Hühnerfibroblasten (FHE) (9). Als Erhaltungsmedium diente reine Rinderammoniumflüssigkeit (RAF) mit Zusatz von Phenolrot und Antibiotika.

### 2.3. Virustitrierungen

Sie wurden in 11 Tage alten Hühnerembryonen durch Verimpfung von Verdünnungsreihen in Zehnerpotenzen auf die gesenkte CAM durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der Herdzählmethode (Primärherde). Die Titer errechneten wir in pockenbildenden Einheiten (PBE) pro ml.

### 2.4. Immunsereen

Die in den serologischen Reaktionen eingesetzten Immunsereen und das Normalserum stammten von erwachsenen Hühnern.

### 2.5. Neutralisationsteste

Sie wurden sowohl als Virus- als auch als Serum-Neutralisationen durchgeführt. Die *in vitro*-Gemische wurden in 11 Tage alten Hühnerembryonen ausgewertet.

In den Virus-Neutralisationen verdünnten wir 1:200 vorverdünntes Stammvirus in Zweierpotenzen weiter und setzten dann den jeweiligen Verdünnungsreihen einheitlich 1:2 verdünnte Seren zu. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Virus-Serungemische à 0,2 ml verimpft. Eine Reduzierung der Primärherdzahl um 50% gegenüber der Normalserumkontrolle bewerteten wir als positiv.

Bei den Serum-Neutralisationen arbeiteten wir mit einer Standard-Virus suspension, die etwa 50 PBE pro 0,1 ml enthielt. Davon wurden gleiche Mengen jeweils mit den Serumverdünnungen gemischt, wie vorher inkubiert und anschließend verimpft. Auch hier galt die Serumverdünnungsstufe mit einer Reduzierung der Herdzahl um 50% gegenüber der Kontrolle als Titer.

## 2.6. Elektronenoptische Untersuchungen

Das Virusausgangsmaterial des Stammes X 77/67 (CAM-Verreibungen) wurde durch fraktionierte Ultrazentrifugation partiell gereinigt und gleichzeitig im Volumenverhältnis 200:1 eingengt. Das Konzentrat kontrastierten wir mit Phosphorwolframsäure 2%ig bei pH 6,7. Von infizierten Hühnern gewonnenes Virusmaterial wurde unter Zusatz von etwas Aqua bidest. mit Ultraschall aufgeschlossen und direkt mit PWS kontrastiert.

Die Durchmusterung der Präparate erfolgte in einem Siemens Elmiskop I bei einer Arbeitsvergrößerung von 40.000.

## 2.7. Tierversuche

Als Versuchstiere verwendeten wir 10 bis 12 Wochen alte Hühner sowie Eintagsküken (weiße Leghorn) aus seuchenfreien, nichtgeimpften Zuchtbeständen. Die Infektion der Eintagsküken erfolgte nach der von MAYR (7) beschriebenen Technik. Weitere methodische Einzelheiten werden im Text vermerkt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Vermehrung im Hühnerbrutei

Auf der CAM 11 Tage vorbebrüteter Hühnerembryonen vermehrte sich der Stamm X 77/67 unter Ausbildung proliferativer Primärherde. Sie blieben im Durchmesser relativ klein (um 3 mm) (Abb. 1). Auch kam es an den proliferierenden Zellschichten nicht zu Abschilferungen oder Nekrosen. Die peripheren sowie die mesodermalen, entzündlichen Prozesse verliefen weit weniger heftig, als es bei den bekannten HP- und TP-Stämmen der Fall ist.

Nach Beimpfung mit mehr als 100 PBE pro CAM generalisierte der Stamm im Hühnerembryo. Die Generalisierung war in ihrer Stärke und dem prozentualen Auftreten dosisabhängig, ebenso die Absterberaten (Tabelle 1). Der Zeitpunkt der Generalisierung lag zwischen 130 und 160 Stunden p. inf. Die Ausbildung der Sekundärherde erfolgte (bei 2+ und mehr Quantität) in mehreren Schüben.

Nach Beimpfung in die Allantoishöhle mit 500 PBE haftete der Stamm nicht.

### 3.2. Verhalten in Zellkulturen

In FHE-Kulturen entwickelte sich nach der Verimpfung des Stammes X 77/67 (Eimaterial) in der Dosis von  $10^5$  bis  $10^6$  PBE ab dem 2. Tag p. inf. ein partieller, cytopathogener Effekt. Er schritt nur bis zum 5. Tag langsam fort und bestand in etwa 20 bis 50% Abkuglung und Lysis. Die Gesamtkultur (Medium mit Zellphase) hatte bei diesem Status einen Virusgehalt von  $10^2$  bis  $10^3$  PBE/ml. Animpfungen unter  $10^5$  PBE/ml führten zu keinem cytopathogenen Effekt.

Bei der 2. Passage des Stammes in FHE-Kulturen konnte keinerlei cytopathogener Effekt mehr beobachtet werden. Das Medium enthält am 5. Tag p. inf. nur noch wenig Virus (einige PBE). Nach weiteren 5 Blindpassagen (ohne sichtbare Kulturveränderungen) mißlang die Rückisolierung des Virus.

Eivirus wurde unverdünnt auch auf Schweinenieren- und BHK 21-Kulturen verimpft. Auch hier entstanden in der 1. Passage unvollständige cytopathogene Effekte, die sich von der 2. Passage ab nicht mehr reproduzieren ließen.

### 3.3. Elektronenoptische Untersuchung

Partiell gereinigte Viruskonzentrate enthielten Partikel vom echten Pocken-typ (Abb. 2). Die Darstellung gleicher Partikel gelang auch aus diphtheroiden Rachenbelägen experimentell mit dem Stamm X 77/67 infizierter und erkrankter

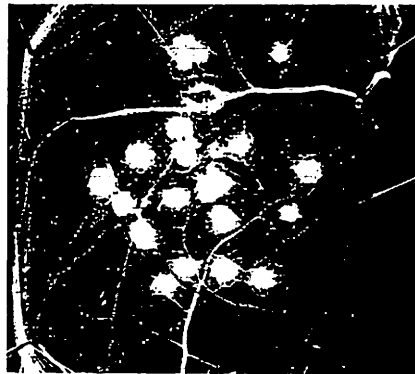


Abb. 1. Hühnerpockenvirus des Stammes X 77/67 auf der Chorioallantois-membran des Hühnerembryos am 6. Tag p. inf. (Vergr.: 1,5fach)

Hühner. Anhand der Oberflächenstruktur (nach Negativfärbung) lassen sich die Geflügelpockenviren nicht von anderen Pockenpartikeln des Vaccinotyps unterscheiden. Aus jahrelangen Beobachtungen glauben wir aber, daß die Geflügel-pockenviren im Durchschnitt etwas größer und, was deutlicher in Erscheinung tritt, von weniger quaderförmiger, etwas runderer Form sind. Dies fiel auch bei der Durchmusterung der Partikel des Stammes X 77/67 auf.

### 3.4. Einschlußkörperchen

In Schnitten durch die Primärherde von CAM wurden zahlreiche, große, intraplasmatische Einschlußkörperchen vom Typ A gefunden. Sie färbten sich intensiv mit Fettfarbstoffen (Sudan III).

### 3.5. Verhalten am Huhn

10 bis 12 Wochen alte Hühner wurden mit konzentriertem CAM-Virus kutan (Federfollikelmethode) am Bein infiziert. Es entwickelten sich unter starker Schwellung und Entzündung der Federfollikel Impfreaktionen, wie sie für Hühner-

pockenvirus typisch sind. Am Höhepunkt der Reaktion traten teilweise Nekrosen auf. Schließlich verkrusteten die Follikel und heilten langsam ab. Vom 14. bis 19. Tag p. inf. erkrankten alle geimpften Tiere generalisiert mit Pockenherdbildungen an den Extremitäten, am Kamm und z. T. am Kehllappen. Auch diphtheroide Rachenbeläge konnten nachgewiesen werden, in denen elektronenoptisch Pockenpartikel diagnostiziert wurden. Die erkrankten Hühner waren nach 4 Wochen wieder gesund.

Zwei Hühner wurden mit  $10^{4.7}$  PBE des Stammes X 77/67 intracerebral (à 0,05 ml) infiziert. Dieser Versuch diente gleichzeitig zur Kontrolle einer eventuellen Kontamination des Impfmateri- als mit neuropathogenen Virusarten. Keines dieser Tiere erkrankte.

Tabelle 1. Absterberaten und Generalisierung im Hühnerembryo nach Beimpfung der CAM mit Stamm X 77/67

Animpfdosis in PBE	Absterberaten bis 9. Tag p. inf. gesamt/tot	Generalisierung		Stärke <sup>1</sup> der Generalisierung
		Zahl der Brut- eier	Davon generalisiert	
Bis 10	16/0	16	0	—
Bis 100	22/0	22	0	—
Bis 1000	23/0	23	5	1 bis 2+
Bis 10.000	14/6	25	20	2 bis 4+
Bis 100.000	19/16	19	19	2 bis 4+

- <sup>1</sup> 1+ = bis 10 Sekundärherde auf der CAM.  
 2+ = bis 30 Sekundärherde auf der CAM.  
 3+ = bis 100 Sekundärherde auf der CAM.  
 4+ = über 100 Sekundärherde auf der CAM.

### 3.6. Verhalten im Eintagsküken

24 Eintagsküken wurden mit  $10^{3.5}$  PBE (über CsCl-Gradientenzentrifugierung gereinigtes CAM-Virus) intravenös infiziert. In der 4. Woche p. inf. erkrankten davon 11 Tiere an generalisierten Pocken, 5 erlagen der Infektion. Alle Tiere entwickelten Pocken an der Impfstelle, 13 Tiere daneben Effloreszenzen an der geimpften Extremität.

8 intramuskulär mit  $10^5$  PBE infizierte Eintagsküken erkrankten nicht. Sie entwickelten jeweils nur eine Primärreaktion an der Impfstelle.

### 3.7. Kreuzimmunität an Hühnern und Eintagsküken

2 Hühner wurden intracerebral mit  $10^{4.7}$  PBE des Stammes X 77/67 infiziert. Sie zeigten 3 Wochen lang keinerlei Krankheitserscheinungen. Nach 24 Tagen wurden diese Hühner mit einer hochtitrigen Virussuspension des Stammes HP-1 nach der Federfollikelmethode kutan reinfiziert. Entsprechende, nicht geimpfte Kontrollen liefen parallel. Die mit dem Stamm X 77/67 vorgeimpften Tiere reagierten auf die Reinfektion negativ, während die Kontrolltiere eine typische und heftige Hühnerpockenreaktion entwickelten.

8 Eintagsküken wurden mit dem Stamm X 77/67 à 0,1 ml (Dosis  $10^5$  PBE) intramuskulär infiziert. Außer einer nach 2 Wochen abheilenden Impfreaktion an der Injektionsstelle zeigten die Tiere keine Erkrankung. 24 Tage später wurden je 2 der Küken mit den Stämmen X 77/67, HP-1 und CVA per Federfollikelmethode am Bein testinfiziert. Entsprechende nichtinfizierte Kontrollen liefen parallel. Nur bei den mit dem Vaccinevirus testinfizierten Küken kam es bei den Versuchs- und Kontrolltieren zu voll ausgebildeten, für dieses Virus typischen

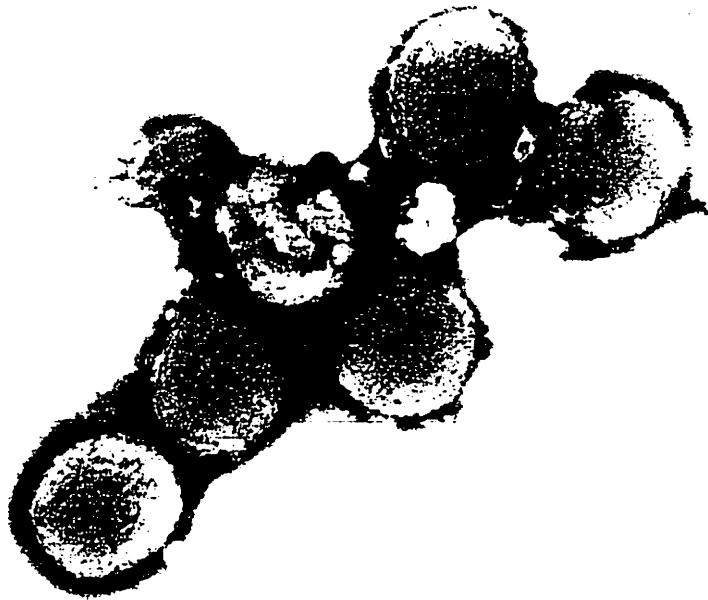


Abb. 2. Hühnerpockenvirus Stamm X 77/67 (Negativ-Färbung pH 6,7; Vergr.: 100.000fach)

Impfreaktionen. Die mit den anderen Stämmen testinfizierten Küken zeigten nur abortive Follikelreaktionen (Immunitätsreaktionen), während die nach dem gleichen Modus infizierten Kontrollen voll ausgebildete reife Pockenreaktionen an den Federfollikeln aufwiesen.

### 3.8. Neutralisationsteste

Mit dem Stamm X 77/67 setzten wir Virusneutralisationsteste gegen Hühnernormalserum sowie gegen Immunsereen der Stämme X 77/67, HP-1, TP-1, KP-1 und Vaccinevirus an. Der Neutralisationsindex (Neutralisierung gegenüber dem Normalserum-Test) lag beim X 77/67- und HP-1-Immunserum bei mehr als  $2^5$ . Das Immunserum gegen TP-1, KP-1 und Vaccinevirus zeigte keine neutralisierende Wirkung.

In Serumneutralisationstesten gegen 50 PBE wirkte das X 77/67- und das HP-1-Serum bis zur Verdünnung 1:8 eindeutig. Höhere Verdünnungen wurden nicht geprüft. TP-1-, KP-1- und Vaccineserum unterschieden sich in ihrer Wirkung nicht gegenüber der Normalserumkontrolle.

### 3.9. Sonstige biologische Prüfungen

Verreibungen infizierter CAM agglutinierten Erythrozyten von Huhn, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Goldhamster nicht.

Negativ verlief auch die Vermimpfung des Stammes X 77/67 auf die 5 Tage alten Babymäuse i.p., auf erwachsene Mäuse s.c. sowie auf Kaninchen kutan und intrakutan.

### 4. Besprechung der Ergebnisse

Der von GRÜNBERG und BURTSCHER (5) aus einem Rhinoceros isolierte Stamm X 77/67, den wir in Form von infizierten und spezifisch veränderten Chorioallantoismembranen erhielten, ließ sich als Hühnerpockenvirus (*Avipoxvirus gallinae*) charakterisieren. Die Diagnose wurde durch das biologische Verhalten des Virus in Hühnern und Eintagsküken sowie durch Kreuzimmunitäts- und Kreuzneutralisationsteste untermauert. Der Stamm zeigte keine Beziehung zum Taubenpocken- und Kanarienvirus. Sein Verhalten im Hühnerembryo spricht gegen das Vorliegen eines Putenpockenstammes. Die Zugehörigkeit zur Untergruppe *Avipoxvirus* wurde ferner durch elektronenoptische und histologische Untersuchungen abgesichert.

Dem Vorbericht nach waren auch Infektionen mit anderen Pockenvirusarten, z. B. mit dem Vaccinevirus oder mit originären Tierpockenviren, in Betracht zu ziehen. Sie können anhand der Untersuchungsergebnisse mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Der neu isolierte Stamm weist einige besondere biologische Eigenschaften auf. Er ließ sich nicht in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen fortlaufend vermehren und erzeugte keinen cytopathogenen Effekt, wie er normalerweise für Geflügel-pockenviren charakteristisch ist. Nur MAYR und KALCHER (9) beschrieben bisher einen Hühnerpockenstamm, der sich ebenfalls anfangs nur schwach in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen vermehrte, dann aber nach 6 bis 9 Passagen cytopathogen wurde. Auch dieser Stamm hatte, ähnlich dem Stamm X 77/67, eine lange Inkubationszeit, war jedoch stark virulent für Hühner und Küken.

Die Geflügel-pockenviren bilden innerhalb der Gruppe der echten Pockenviren eine besonders charakterisierte Untergruppe. Untereinander lassen sie sich mit Hilfe biologischer und serologischer Verfahren gut differenzieren (7, 8). Als biologisches Charakteristikum galt bisher für alle Geflügel-pockenviren, daß sie als Krankheitserreger nur bei Vögeln vorkommen, die als einzige Wirte bekannt waren. Die Haftung und Vermehrung des Hühnerpockenstammes X 77/67 in einem Rhinoceros weist darauf hin, daß möglicherweise auch noch andere Wirte bzw. Zwischenwirte für die Epidemiologie von Hühnerpocken Bedeutung besitzen und eine Infektkette in Gang halten können.

Zunächst muß man jedoch nach derartigen überraschenden Isolierungsergebnissen an eine Kontamination des Untersuchungsmaterials, an ein "pick up" des diagnostizierten Erregers denken. Diese Möglichkeit kann aber sicher ausgeschlossen werden. Schon am erkrankten Rhinoceros stellten GRÜNBERG und

BURTSCHER klinisch und pathohistologisch ein für Pocken charakteristisches Exanthem mit typischer Lokalisation und Generalisierung auch über den Magen-Darm-Trakt fest. Das Originalmaterial wurde von typisch veränderten Hautstellen gewonnen. Am isolierenden Institut wurde seit Jahren nicht mehr mit Pockenviren gearbeitet. Wir übernahmen den Stamm anschließend als steriles Material der 1. Eipassage. Schließlich lag ein Stamm mit den beschriebenen abweichenden Eigenschaften bisher nicht vor.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß wir vor Jahren in einem ähnlich gelagerten Fall Hühnerpockenvirus von einem Pferd isolieren konnten. Jener Stamm zeigte ebenfalls besondere, dem Stamm X 77/67 sehr ähnliche Eigenschaften. Der Diagnose war damals aber wenig Beachtung geschenkt worden, weil eine Kontaminierung des Untersuchungsmaterials nicht sicher auszuschließen war. Heute erscheint dieser Befund jedoch in einem neuen Lichte.

Für das Hühnerpockenvirus ist das Rhinoceros sicherlich ein unnatürlicher Wirt. Dies bestätigte sich auch in einem negativ ausgegangenen Übertragungsversuch (5) auf ein gesundes, in sehr engem Kontakt mit dem erkrankten Rhinoceros gehaltenes Nashorn. Das Virus ließ sich ferner in unseren Versuchen nicht auf das zum Rhinoceros in gewisser zoologischer Verwandtschaft stehende Fohlen auf kutanem Wege übertragen, desgleichen nicht auf Schweine (5). Es scheint sich auch am Rhinoceros lokal weniger stark vermehrt zu haben (5), als es in Pockeneffloreszenzen üblich ist. Die Haftung und Infektion am Rhinoceros wurde demnach begünstigt durch die herabgesetzte Resistenz des Tieres, durch die schwere Lungenmykose und vielleicht auch durch die vorangegangenen starken Cortisongaben. In jedem Falle beweisen aber die Untersuchungen, daß Geflügelpockenviren unter besonderen Bedingungen auch andere Tierarten infizieren können.

Ein besonders wichtiges Problem betrifft die Frage nach dem Übertragungsweg, über den das Hühnerpockenvirus auf das Rhinoceros gelangte. Eine Infektion durch Aufnahme des Virus aus der Umgebung per os oder über den Atmungsstrakt halten wir für wenig wahrscheinlich. Möglich erscheint uns aber eine Haftung per Inokulation. Dabei wären folgende Infektketten zu diskutieren.

Die Übertragung könnte einmal direkt durch infizierte Vögel erfolgt sein. Aus der Literatur ist bekannt, daß nicht nur Hühnervögel, sondern auch Wildvogelarten wie Spatzen und Finkenvögel (4, 10), Krähen und Kraniche (Weiss, persönl. Mitt.) Träger von Geflügelpockenviren sind. Das Rhinoceros lebt in enger Gemeinschaft mit Madenhackern (*Buphagus*), die ihm Parasiten aus der Haut ablesen. Eine direkte Ansteckung auf diesem oder ähnlichem Wege ist denkbar.

Als zweiter Übertragungsweg muß an eine Ansteckung durch virustragende Insekten gedacht werden. Geflügelpocken-, speziell Hühnerpockenviren, werden häufig durch beißende und blutsaugende Insekten mechanisch übertragen (1, 6), in tropischen Zonen insbesondere durch Moskitos. Dieselbe Infektkette ist auch bei der Fibromatose und Myxomatose der Kaninchen bekannt (2). Als Blutsauger am Rhinoceros gibt es zudem eine Reihe von Zecken, vor allem *Amblyomma*- und *Hyalomma*-Arten. Für die unreifen Formen dieser Zecken sind Vögel der Hauptwirt. Es ist somit vorstellbar, daß Zecken oder andere Arthropoden als mechanische Überträger von Vögeln oder Hühnervögeln auf das Rhinoceros fungiert haben (Abb. 3).

Daneben muß aber auch diskutiert werden, ob Arthropoden nicht auch als biologische Überträger von Pockenviren in Frage kommen. So konnte in jüngster Zeit von Götz und Mitarb. (3) der Beweis für eine Pockeninfektion bei Stechmückenlarven erbracht werden. Das Pockenvirus war insektenpathogen und verbreitete sich seuchenhaft, die Erkrankung ging mit einer weißschekigen Verfärbung der Larven einher. Götz und Mitarb. überließen uns derartige infizierte Stechmückenlarven<sup>2</sup>, die wir über eine alkalische Extraktion für die elektronenoptische Untersuchung präparierten. In den daraus gewonnenen Viruskonzentraten fanden wir massenhaft Viruspartikel vom Typ der echten Pockenviren. In ihren Dimensionen waren diese Virionen etwas kleiner als Geflügelpockenviren.

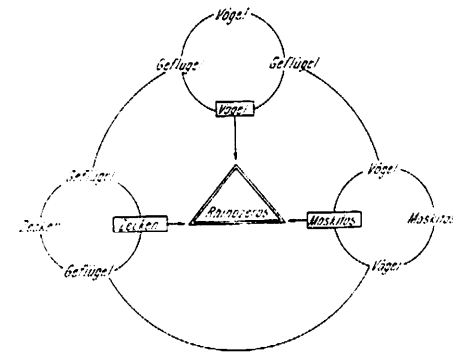


Abb. 3. Infektketten bei den Hühnerpocken und mögliche Übertragungswege auf das Rhinoceros

Die Epidemiologie der Menschen- und Tierpocken ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Die Forschung muß sich deshalb intensiv auch mit der Frage der Arthropoden als Zwischenwirte für Pockeninfektionen befassen.

#### Literatur

1. DA MASSA, A. J.: The role of *Culex tarsalis* in the transmission of fowlpox virus. *Avian Dis.* 10, 57 (1966).
2. FENNER, F., and F. N. RATCLIFFE: *Myxomatosis*. Cambridge Univ. Press, 1965.
3. GÖTZ, P., A. M. HUGER und A. KRIEG: Über ein insektenpathogenes Virus aus der Gruppe der Pockenviren. *Naturwiss.* 56, 145 (1969).
4. GOODPASTURE, E. W., and K. ANDERSON: Isolation of a wild avian poxvirus inducing both cytoplasmic and nuclear inclusions. *Amer. J. Path.* 40, 437 (1962).
5. GRÜNBEPP, W., und H. BURTSCHER: Über eine pockenartige Krankheit beim Rhinoceros (*Diceros bicornis* L.). *Zbl. Vet.-Med. B.* 15, 649 (1969).
6. LEE, D. J., F. FENNER, and J. J. LAWRENCE: Mosquitoes and fowlpox in the Sydney area. *Austr. vet. J.* 34, 230 (1958).
7. MAYR, A.: Verhalten von Hühner-, Tauben- und Kanarienvogelpockenviren im Küken nach intravenöser Impfung. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 179, 149 (1960).

<sup>2</sup> Herrn Dr. Götz danken wir für die Überlassung des Materials.

8. MAYR, A.: Neue Verfahren für die Differenzierung der Geflügelpockenviren. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 76, 316 (1963).
9. MAYR, A., und K. KALCHER: Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur. Arch. ges. Virusforsch. 10, 72 (1960).
10. URSINY, J.: The sparrow (*Passer domesticus*) as a dangerous reservoir for fowlpox. Veterinarstvi 14, 362 (1964).

Anschrift der Verfasser: Prof. Dr. A. MAYR, Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere, Veterinärstr. 13, D-8 München 22.

## Immunogenicity of Oncolysates Obtained from Ehrlich Ascites Tumors Infected with Vesicular Stomatitis Virus<sup>1</sup>

By

J. LINDENMANN

Division of Experimental Microbiology, Institute of Medical Microbiology,  
University of Zürich, Switzerland

Received January 26, 1970

### Summary

Inbred A2G mice could be immunized against Ehrlich ascites (EA) tumor with lysates prepared from EA cells infected with vesicular stomatitis virus (VSV). The immunizing power of such lysates could be abolished by rabbit antiserum directed against egg grown VSV. This inhibition was specific: A chicken anti-fowl plague antiserum inhibited the immunogenicity of fowl plague EA cell lysates, but not of VSV lysates. Conversely, a rabbit anti-VSV antiserum inhibited the immunogenicity of VSV lysates, but not of fowl plague lysates. Pre-immunization of animals with live egg grown VSV resulted in a secondary anti-tumor response upon immunization with VSV tumor cell lysate.

It was concluded that VSV acts as an immunological carrier for EA cell antigens which become incorporated into the coat of the virion.

### 1. Introduction

It is notoriously difficult to immunize mice with nonspecific tumors such as the Ehrlich ascites (EA) tumor. Some of the successful procedures seem to depend on unmasking of hidden antigenic determinants, for instance by treatment of cells with neuraminidase (1, 2), or on association of Ehrlich cell antigens with other antigens, either viral (1, 3) or cellular (4). It has been suggested that, upon infection of EA cells with appropriate strains of influenza virus, cellular antigens are incorporated into the coat of the virion, as a result of which their immunogenicity is greatly increased (3). This incorporation of cellular antigens into virus envelopes is thought to occur during budding of the virus at the tumor cell surface (5).

It seemed important to check whether the phenomenon of enhanced immunogenicity of cellular constituents could be observed with other viruses known to bud at cell surfaces. For several reasons the choice fell upon vesicular stomatitis virus (VSV). This virus is easily adaptable to many different tissues. Its budding at EA cell membranes has been studied in the electron microscope (6) and it is known to contain antigens derived from the host cell (7).

<sup>1</sup> Dedicated to Prof. Dr. Dr. C. HALLAUER on the occasion of his 70th birthday.