

ESPERIENZE E RICERCHE

Studio al microscopio elettronico del ciclo di sviluppo di un virus erpetico bovino

DANIELA SANTOLI (*), GIUSEPPE ARANCIA e ITALO ARCHETTI
Laboratori di Fisica e Laboratori di Microbiologia

Riassunto. — Gli stadi sequenziali dello sviluppo di un virus erpetico bovino (69/1 LO), molto simile antigenicamente a quello della mammillite erpetica bovina, sono stati studiati in colture di cellule di rene di embrione bovino. Quasi tutte le fasi osservate non differiscono in modo sostanziale da quelle già descritte per molti altri virus del gruppo erpetico. Non si sono avuti risultati sufficientemente probativi per quanto riguarda le fasi di assorbimento e di penetrazione della particella virale nella cellula ospite; sembra che la fuoriuscita del virus dalla cellula avvenga per protrusione della particella attraverso la membrana cellulare, e non per un processo di fagocitosi inversa. Sono state viste numerose particelle extracellulari, di forma rotondeggiante e molto dense, presenti dalle 16 ore dopo l'infezione in poi: il loro significato e la loro natura non sono ancora stabiliti.

Summary (*Electron microscopic study of the development cycle of a bovine herpes virus*). — The sequence of events in the development of a bovine herpes virus (69/1 LO), antigenically very similar to the bovine herpes mammillitis virus, was studied in bovine embryonic kidney cell cultures. Almost all the stages observed do not substantially differ from those previously described in other viruses of the herpes group. No clear results were obtained about the entry of the virus particle into the host cell; the egress of virus from the infected cell seems to happen by protrusion through the cell membrane and not by a process of reverse phagocytosis. Numerous extracellular particles of round shape and very dense were found starting 16 hours postinfection: their significance is not yet clear.

(* Borsista dei Laboratori di Microbiologia.

INTRODUZIONE

CASTRUCCI *et al.* (1970) hanno isolato un agente citopatogeno, dagli AA. chiamato 69/1 LO, da una lesione di tipo ulceroso della mucosa orale di un vitello morto in seguito a disturbi alimentari. Lo studio delle proprietà biologiche di questo agente dimostrò che si trattava di un virus del gruppo erpetico e più precisamente di un virus molto simile a quello della mammillite erpetica dei bovini: tali conclusioni vennero avvalorate dai risultati preliminari ottenuti con il microscopio elettronico.

Poiché, ad eccezione delle accurate osservazioni di MARTIN *et al.* (1969), ben poco si conosce della morfologia e delle fasi dello sviluppo intracellulare del virus della mammillite o del virus di Allerton, considerato il prototipo del gruppo (POLSON & KIPPS, 1967), si è ritenuto opportuno esaminare con maggiore dettaglio al microscopio elettronico il virus 69/1 LO: questa nota riporta i risultati ottenuti in tale studio.

MATERIALI E METODI

Virus.

È stato usato il ceppo 69/1 LO, gentilmente inviatoci dal Prof. V. Cilli dell'Università di Perugia, come sospensione virale di coltura in cellule di rene di embrione bovino.

Cellule.

Sono state sempre adoperate cellule primarie di rene di embrione bovino, preparate nei Laboratori di Veterinaria del nostro Istituto. Il terreno di crescita era costituito da soluzione tampone di Hanks addizionata del 10 % di siero di vitello e 0,5 % di idrolisato di lattalbumina con antibiotici (100 U di penicillina, 100 γ di streptomina e 3 γ di fungizone per ml). Il terreno di mantenimento era formato da soluzione tampone di Earle contenente il 2 % di siero di agnello, 0,5 % di idrolisato di lattalbumina e antibiotici.

Inoculo.

Quando il monostrato cellulare nelle bottiglie di Kolle risultava completo, il virus veniva inoculato previo allontanamento del terreno di crescita, con una molteplicità variabile fra 10 e 30 DCP₅₀/cellula. Dopo 2 ore di assorbimento a 37° C veniva aggiunto il terreno di mantenimento e ad intervalli stabiliti una bottiglia veniva prelevata e le cellule fissate e trattate per lo studio al microscopio elettronico.

Preparazione per la microscopia elettronica.

Previo allontanamento del terreno di mantenimento, le cellule venivano raccolte dopo 10, 15, 20, 30, 60 minuti e 4, 7, 16, 23 e 48 ore dall'infezione, prefissate in glutaraldeide 2,5 % in tampone Millonig 0,13 M, pH 7,4 (MILLONIG, 1961) a 4°C per 10 minuti; quindi lavate in tampone per 10 minuti e fissate in OsO₄ 1 % per un'ora a temperatura ambiente. Dopo disidratazione in serie crescente di alcool etilico le cellule venivano staccate e centrifugate e dopo trattamento con acetone, incluse in araldite. Le sezioni ottenute con ultramicrotomo Porter-Blum MT1 venivano doppiamente colorate prima con soluzione satura di acetato di uranile e poi con idrossido di piombo secondo KARNOVSKY (1961) e osservate al microscopio elettronico Siemens Elmiskop IA.

Per l'osservazione in contrasto negativo del virus libero, la raccolta è stata fatta dopo 12, 24 e 34 ore dall'infezione. La sospensione virale veniva centrifugata per 30 minuti a 2000 rpm per eliminare il materiale più grossolano e quindi il soprannatante veniva centrifugato per un'ora a 40.000 rpm. Una goccia del sedimento, risospeso in acqua distillata, veniva mescolato con un ugual volume di PTA al 2 %, pH 7,2; una goccia della miscela veniva quindi posta su griglia di rame ricoperta con film di carbone e l'eccesso veniva allontanato con carta bibula.

RISULTATI

Sezioni sottili.

Ben poco si è notato nelle preparazioni ottenute sino alla 4^a ora dopo l'infezione. Dopo 20 min dall'infezione si osservano alcune particelle virali complete, ancora extracellulari, talvolta molto vicine alla membrana citoplasmatica, mai tuttavia in fase evidente di penetrazione (Fig. 1 e 2). Dopo 30 min dall'infezione si notano alcuni nucleocapsidi, ormai all'interno del citoplasma e completamente privi di involucro (Fig. 3); questi sono chiaramente inclusi nella trama citoplasmatica, vicino a formazioni del reticolo endoplasmatico, ma sicuramente non in vacuoli.

Alla 4^a ora si nota nel nucleo una marginazione della cromatina che si rende più evidente nei tempi successivi, mentre il nucleo nel suo insieme appare meno compatto e meno denso agli elettroni.

Alla 7^a ora cominciano a comparire le prime particelle nel nucleo: sono ancora forme incomplete, con il capsido non del tutto costituito e con il nucleo centrale (core) ancora poco denso (Fig. 4).

Alla 16^a ora le particelle endonucleari sono più numerose, ma raramente si presentano raggruppate, mai in formazione di tipo pseudocristallino. Le

particelle appaiono sempre molto regolari, di forma tondeggianti o ovulare con un diametro medio di circa 900 Å. In condizioni di osservazione favorevole si ha la visione della struttura relativa alla disposizione dei capsomeri e la porzione centrale delle particelle, corrispondente all'acido nucleico, appare più o meno densa in dipendenza della colorazione o della fase di maturazione del virus (Fig. 5). Sono presenti anche numerose forme extracellulari di dimensione variabile tra 800 e 1200 Å quindi, in media, leggermente più grandi dei nucleocapsidi presenti nel nucleo cellulare (Fig. 6): esse sono uniformemente opache agli elettroni, di forma tondeggianti, mai ovalari e nella grande maggioranza prive di una struttura rilevabile; in alcune forme parzialmente svuotate sembra ci sia una membrana limitante. La grandezza variabile potrebbe forse essere dovuta all'effetto del taglio. Appare chiara la loro fuoriuscita dalla cellula per semplice protrusione; alcune di esse sono infatti ancora unite mediante un peduncolo alla membrana citoplasmatica mentre non vi è mai una immagine che faccia pensare alla presenza di canalicoli o vacuoli. Queste forme non sono state mai identificate con certezza nel citoplasma.

Le particelle sicuramente virali che si osservano nella cellula sono prevalentemente forme nude (Fig. 7): non mancano però quelle che fuoriescono dal nucleo circondandosi di una membrana che origina da quella nucleare (Fig. 8 e 9). Alcune di queste particelle complete, provviste cioè di involucro, si notano libere nel citoplasma mentre sono ancora rarissime all'esterno delle cellule. Il loro diametro esterno è di circa 1800 Å. Per quanto riguarda la struttura cellulare vi è un apparente aumento della trama citoplasmatica, con una maggiore ricchezza del reticolo endoplasmatico e un apparato del Golgi più sviluppato: non sembra che ci sia un aumento particolare del numero dei ribosomi, espressione di una accresciuta sintesi proteica. I sincizi, espressione dell'azione citopatica del virus, sono molto numerosi (Fig. 10).

Nelle sezioni delle cellule osservate dopo 23 ore dall'infezione si notano molte forme extracellulari, del tutto simili a quelle riscontrate nelle cellule fissate dopo 16 ore (Fig. 11 e 12). In alcuni nuclei vi sono, oltre alle solite particelle nude, gruppi di granulazioni raccolti in zone apparentemente meno dense e corrispondenti verosimilmente alla matrice virale (Fig. 13). La cromatina è molto ridotta, spesso limitata perifericamente ad una sottile fascia marginale. Le particelle nude si notano frequentemente anche nel citoplasma, a volte molto vicine alla membrana citoplasmatica. Continuano a vedersi particelle che si completano della loro membrana attraversando quella nucleare, ma se ne osservano anche nel citoplasma circondate o in procinto di esserlo dalle cisterne dell'apparato del Golgi o da tubuli del reticolo endoplasmatico (Fig. 14-16). Vi sono forme complete vicine alla membrana citoplasmatica, prossime ad uscire dalla cellula o già extracel-

lulari, ma ancora unite alla membrana cellulare mediante sottili peduncoli; anche in questo caso non si è mai riscontrata la presenza di vacuoli o di tubuli, che possano fare supporre che l'uscita delle particelle avvenga attraverso queste strutture (Fig. 17-20).

Dopo 48 ore dall'infezione le cellule appaiono sensibilmente danneggiate. In quasi tutti i nuclei vi sono molte forme nude, mai raccolte a pseudocristallo ma raggruppate più o meno irregolarmente e distribuite spesso in mezzo alla cromatina, che ora è più abbondante e come vacuolizzata (Fig. 21). Si osserva frequentemente al centro del nucleo una struttura costituita da fini granuli e che corrisponde verosimilmente alla inclusione nucleare tipica dei virus erpetici (Fig. 22 e 23). Nel citoplasma sono presenti numerose forme complete raggruppate ed avvolte da un sistema di membrane (Fig. 24).

Contrasto negativo.

I risultati ottenuti dalle osservazioni delle particelle virali estratte dalle cellule infettate ed osservate in contrasto negativo sembrano confermare, per quel che riguarda il ciclo di sviluppo del virus, quanto si è visto nelle sezioni delle cellule infettate. Infatti nella preparazione ottenuta dopo 12 ore dall'infezione la quasi totalità delle particelle sono nude (Fig. 25) e non mancano alcune forme che per aspetto e dimensioni sono identificabili alle forme extracellulari descritte (Fig. 26). Nelle preparazioni dopo 24 ore dall'infezione aumentano le forme complete di membrana che diventano la maggior parte dopo 34 ore (Fig. 27).

DISCUSSIONE

Lo studio dello sviluppo di questo virus è stato suggerito dalle scarse conoscenze che si avevano su di esso: come già dal lavoro di MARTIN *et al.* (1969) così anche dalle nostre osservazioni, appare che il suo ciclo di sviluppo è molto simile a quello descritto per i virus erpetici in generale. Come risulta evidente dai molti lavori fatti ed in particolare da quelli con il virus dell'herpes simplex, il ciclo di sviluppo del virus varia in dipendenza del grado di permissività delle cellule usate per l'infezione, nonostante che alcuni aspetti fondamentali dello sviluppo restino identici.

Dalle nostre osservazioni non si può dedurre nulla di preciso sulla fase di penetrazione della particella virale, in quanto non siamo riusciti a sorprendere nessuna particella in fase certa di penetrazione nella cellula. Tuttavia è stata dimostrata la presenza di particelle prive di membrana nel citoplasma dopo 30 minuti dall'infezione (Fig. 3) e ciò potrebbe essere fa-

vorevole all'ipotesi espressa da MORGAN *et al.* (1968) che il virus dell'herpes simplex penetri nella cellula non per fagocitosi o viropessi ma per fusione della membrana virale con quella citoplasmatica e passaggio diretto del nucleocapside nel citoplasma. Infatti le particelle da noi viste non sono contenute in vacuoli ma immerse nella trama citoplasmatica; inoltre le poche particelle virali in fase probabile di penetrazione che si notano dopo 20 minuti dall'infezione, sembrano già a contatto con la membrana cellulare e non si notano processi di fagocitosi (Fig. 1 e 2).

Sono ben evidenti i vari stadi dello sviluppo del virus all'interno del nucleo nel corso dell'infezione che coincidono con quanto descritto da molti AA. per i virus erpetici studiati. Nelle prime ore dell'infezione si notano numerose particelle mature ma prive di membrana nel citoplasma: le forme complete cominciano ad apparire verso la 16^a ora, si fanno via via più numerose e diventano praticamente le uniche verso la 48^a ora dopo l'infezione. Queste particelle complete di membrana non appaiono tutte ugualmente strutturate: infatti, come già avevano osservato NII *et al.* (1968), lo spazio compreso tra il capsido e la membrana appare di diversa densità (Fig. 16, 19 e 20). Questa caratteristica sarebbe forse in dipendenza del diverso modo di formazione del rivestimento virale. Il virus può infatti acquistare la propria membrana o uscendo dal nucleo, utilizzando così la membrana nucleare (Fig. 8, 9 e 14) o attraversando il citoplasma, utilizzando le vescicole del reticolo endoplasmico e del Golgi (Fig. 15 e 16). Per quanto riguarda la fuoriuscita delle particelle complete, provviste di membrana, le nostre osservazioni fanno ritenere che avvenga per semplice protrusione attraverso la membrana cellulare e non per un processo di fagocitosi inversa, quale viene descritto per altri virus del gruppo erpetico. Nelle sezioni ottenute a partire dalla 16^a ora di infezione in poi, sono evidenti forme extracellulari di grandezza variabile, a volte molto numerose, di forma tondeggianti, costituite da un complesso molto denso, apparentemente amorfe e prive di una membrana di rivestimento: solo in alcuni rari casi in cui queste particelle sono parzialmente svuotate sembra che sia presente un involucro esterno. La loro provenienza dalla cellula è chiaramente dimostrata dal fatto che si osservano alcune di esse ancora legate con un peduncolo alla membrana citoplasmatica: tuttavia mentre esse appaiono a volte numerosissime nello spazio extracellulare, la loro presenza all'interno del citoplasma rimane dubbia poiché anche nei pochissimi casi in cui si sono notate forme endocellulari simili, non è affatto certo che rappresentino la stessa struttura. Esse non sono mai state viste nelle cellule di controllo o nelle prime ore dall'infezione, compaiono verso la 16^a ora contemporaneamente alle prime particelle virali prive di membrana nel citoplasma, sono molto numerose alla 23^a ora e sembrano diminuire, sino quasi a scomparire, nelle ore più avanzate quando invece la maggior parte delle particelle virali

extracellulari sono complete di membrana. Sulla vera natura di queste particelle si possono fare a nostro parere diverse ipotesi:

1) Che esse siano particelle del virus erpetico prive di membrana e che, essendo particolarmente instabili (NII *et al.*, 1968), fuoriuscendo dalla cellula assumerebbero questa loro forma particolare. Questa ipotesi può essere confermata dal fatto che si sono viste moltissime particelle prive di membrana nel citoplasma e mai nella loro forma caratteristica al di fuori della cellula; inoltre la quantità di queste particelle extracellulari sembra essere, come detto precedentemente, strettamente correlata con quella delle forme virali prive di membrana nel citoplasma.

2) Che esse siano particelle virali di altro tipo indotte dal virus erpetico in seguito all'infezione.

3) Che corrispondano alle forme descritte da STEVE BOCCIARELLI *et al.* (1966) per il virus erpetico IBR. Questi AA. hanno osservato, oltre alle normali forme con o senza membrana, altre particelle di dimensioni maggiori e che si può valutare contengano non meno di 8 molecole di DNA. Le particelle in questione da noi osservate potrebbero corrispondere per dimensioni, aspetto morfologico e reazione alla colorazione, alle forme suddette.

4) Che siano un qualche cosa di simile ai « dense bodies » descritti da CRAIGHEAD *et al.* (1972) durante l'infezione con cytomegalovirus e che potrebbero essere antigenicamente correlati alle particelle virali del virus erpetico bovino da noi studiato.

Per capire meglio la natura di queste particelle ci proponiamo di eseguire altre ricerche, come per esempio l'uso della tecnica di immuno-elettromicroscopia, per vedere se tali forme sono antigenicamente correlate col virus, o cercare di isolare tali forme dalle particelle virali normali per poterle meglio studiare morfologicamente e soprattutto studiarne la capacità infettiva. Ci proponiamo inoltre di variare le tecniche di fissazione e di inclusione usate per la microscopia elettronica per vedere se queste particelle appaiono ugualmente e nella stessa forma.

Gli AA. desiderano ringraziare la Prof.ssa Daria Steve Bocciarelli per gli utili suggerimenti, il Sig. Gherardo Bartoletti per la preparazione delle colture cellulari ed il Sig. Egidio Chessa per il lavoro fotografico.

Ricevuto il 30 gennaio 1974.

Accettato il 28 settembre 1974.

BIBLIOGRAFIA

- CASTRUCCI, G., B. PEDINI, V. CILLI & C. ARANCIA, 1970. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, **49**, 477.
- CRAIGHEAD, J. E., R. E. KANICH & J. D. ALMEIDA, 1972. *J. Virol.*, **10**, 766.
- KARNOVSKY, M. J., 1961. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 729.
- MARTIN, W. B., Z. H. JAMES, I. M. LAUDER, M. MURRAY & H. M. PIRIE, 1969. *Amer. J. Vet. Res.*, **30**, 2151.
- MILLONIG, G., 1961. *J. Appl. Physiol.*, **32**, 1637.
- MORGAN, C., H. M. ROSE & B. MEDNIS, 1968. *J. Virol.*, **2**, 507.
- NIH, S., C. MORGAN & H. M. ROSE, 1968. *J. Virol.*, **2**, 517.
- POLSON, A. & A. KIPPS, 1967. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **20**, 198.
- STEVE BOCCIARELLI, D., Z. ORFEL, G. MONDINO & A. PERSECHINO, 1966. *Virology*, **30**, 58.

Fig. 1. e 2. — Sezioni di cellule dopo 20 min dall'infezione. Si notano due particelle virali con membrana a contatto con la membrana citoplasmatica (60.000x).

Fig. 3. — Sezione di cellula dopo 30 min dall'infezione. Sono ben evidenti nel citoplasma due nucleocapsidi privi di membrana (100.000x).

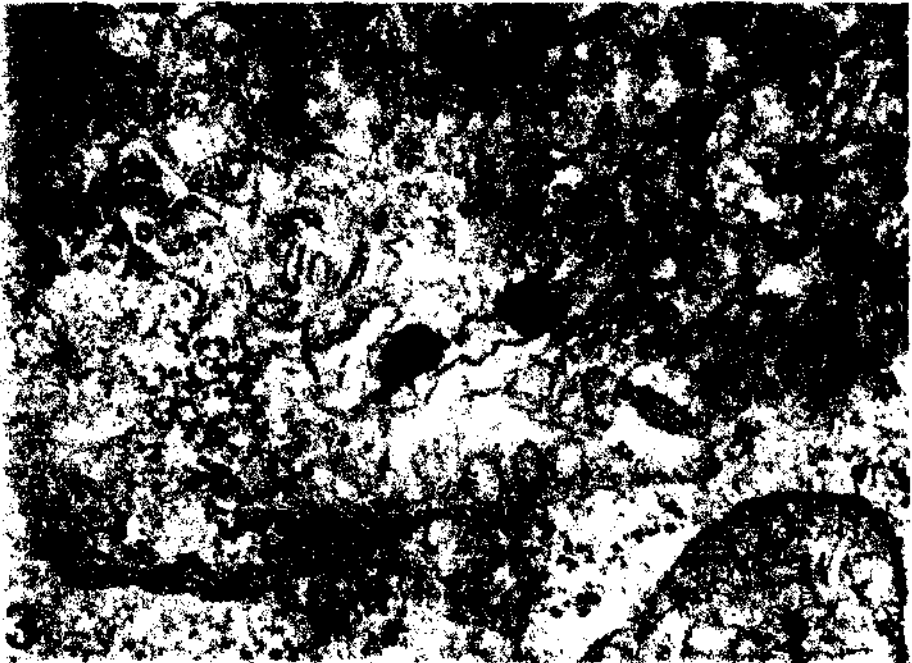
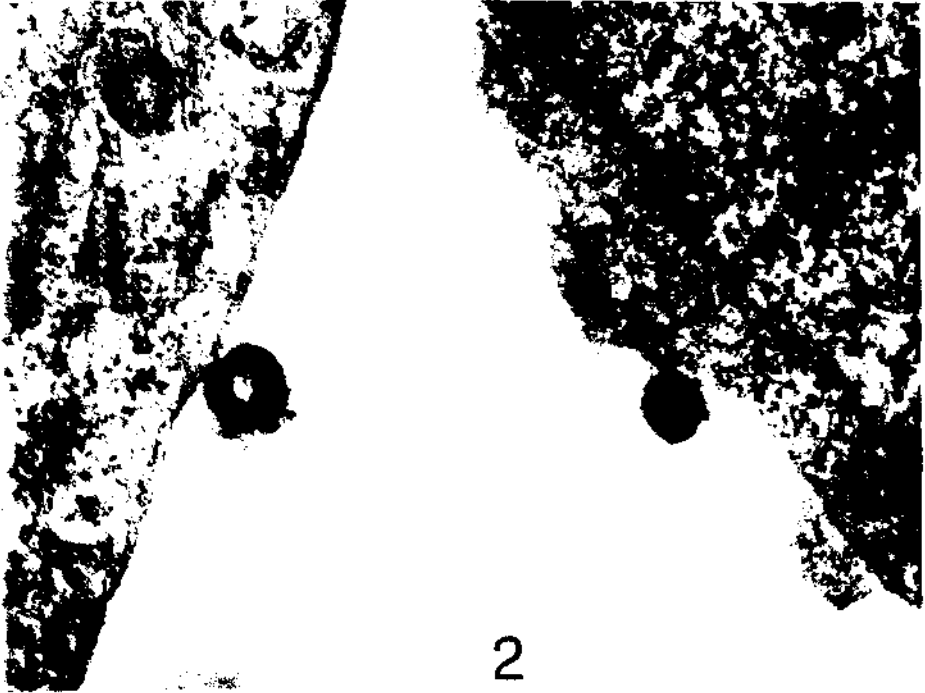


Fig. 4. — 7^a ora di infezione. Si notano nel nucleo alcune particelle virali immature (40.000x).

Fig. 5. — 16^a ora di infezione. Particelle virali nel nucleo. In alcune si scorge abbastanza chiaramente la disposizione dei capsomeri e la struttura dell'acido nucleico (70.000x).

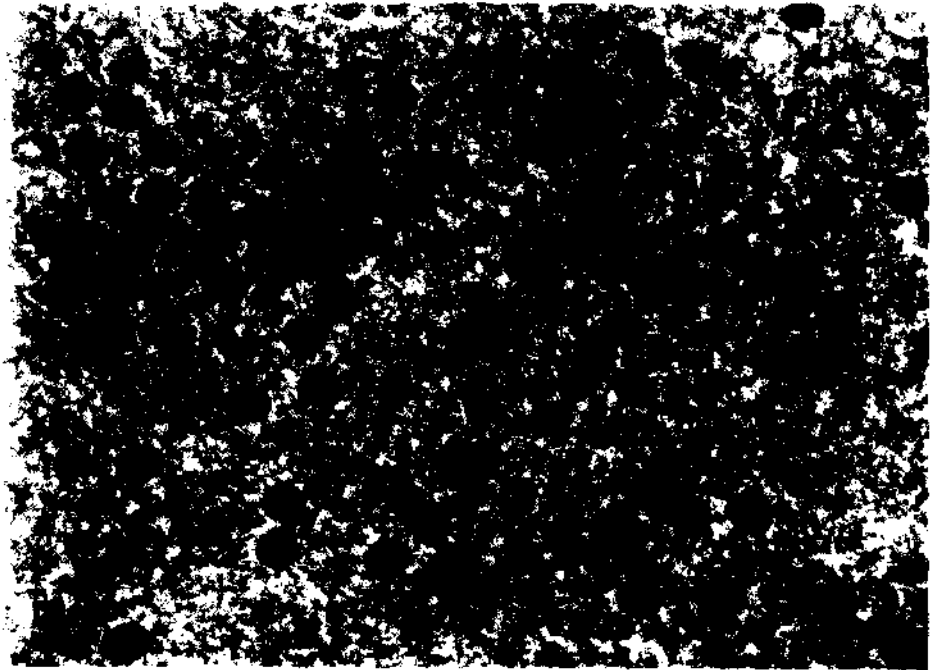
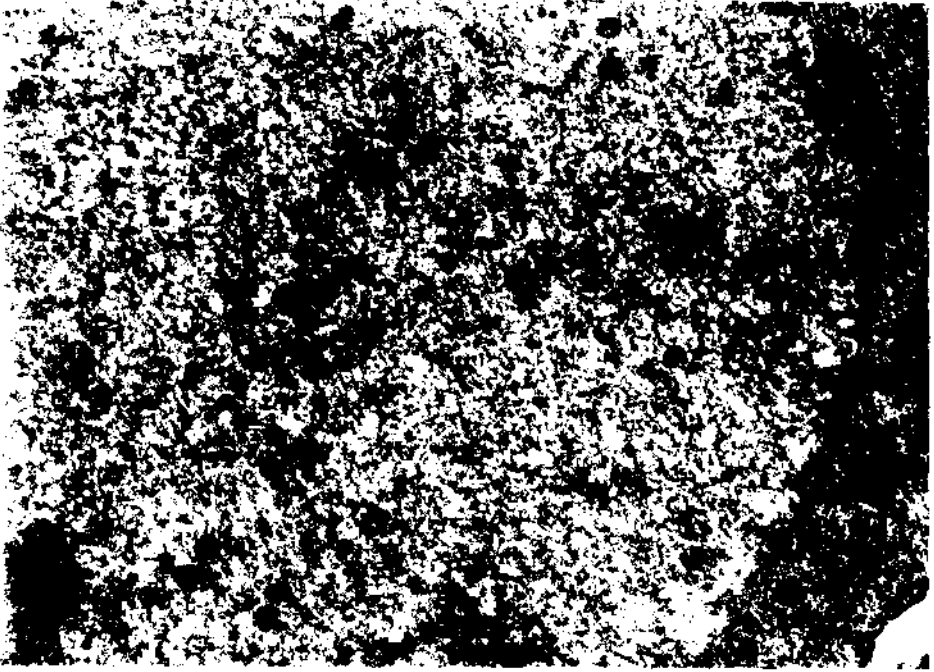


Fig. 6. — 16^a ora di infezione. Forme extracellulari, alcune delle quali ancora in fase di fuoriuscita, di aspetto tondeggiante, molto dense agli elettroni e senza una membrana limitante ben visibile (93.000x).

Fig. 7. — 16^a ora di infezione. Forme mature ma prive di membrana nel citoplasma e due particelle extracellulari come quelle della Fig. 6. (70.000x).

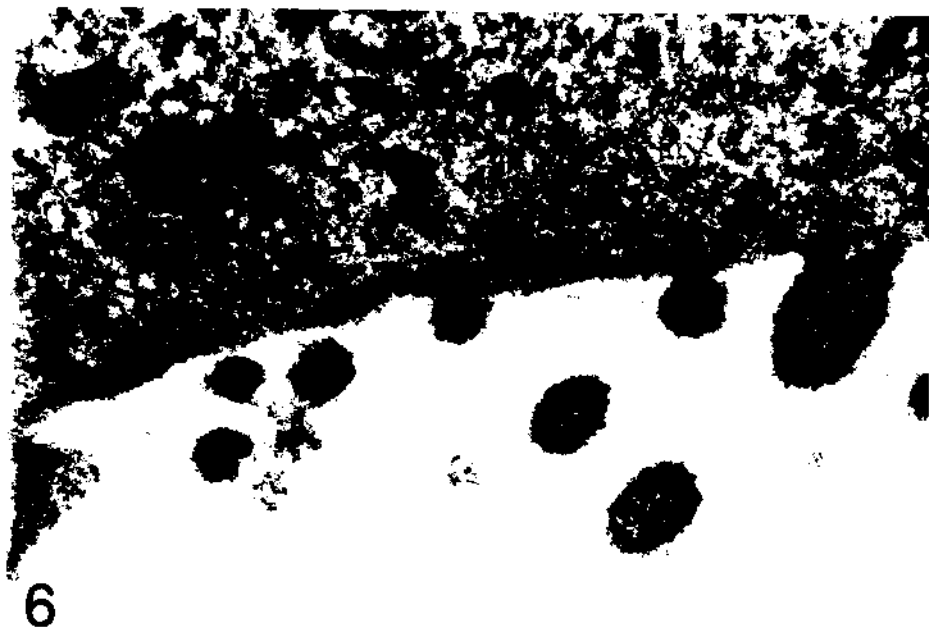
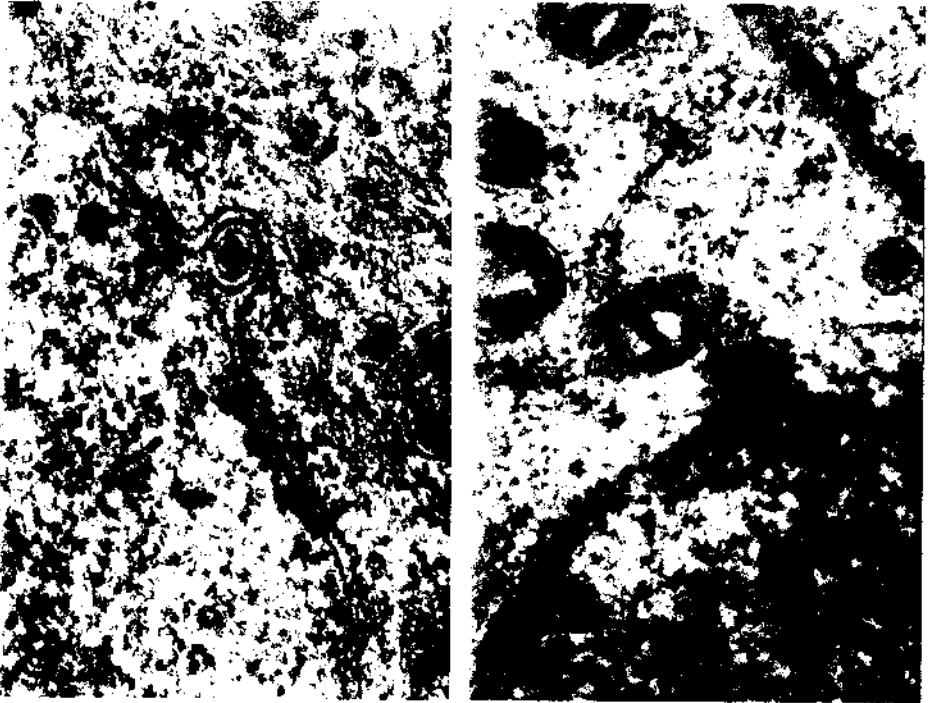


Fig. 8. e 9. — 16^a ora di infezione. Particelle virali che fuoriuscendo dal nucleo si rivestono utilizzando la membrana nucleare (60.000x).

Fig. 10. — Sezione di un sincizio alla 16^a ora di infezione. Si notano cinque nuclei con cromatina marginata all'interno dei quali sono visibili numerose particelle virali (8.500x).



- Fig. 11. — 23^a ora di infezione. Numerosissime particelle extracellulari di dimensioni variabili simili a quelle osservate nella Fig. 6. Si scorgono due particelle virali provviste di membrana (35.000x).
- Fig. 12. — 23^a ora di infezione. Particelle extracellulari in via di fuoriuscita dalla cellula. In una parzialmente svuotata si nota come una membrana delimitante (60.000x).
- Fig. 13. — Nucleo di una cellula dopo 23 ore dall'infezione. Si notano granulazioni raccolte in zone apparentemente meno dense: corrispondono probabilmente alla matrice virale (17.000x).



Fig. 14. — 23^a ora di infezione. Particelle virali complete di membrana nel citoplasma di cui una in procinto di uscire dal nucleo (50.000x).

Fig. 15. — 23^a ora di infezione. Due particelle virali nel citoplasma che stanno rivestendosi della membrana derivante probabilmente dalle vescicole dell'apparato del Golgi (50.000x).

Fig. 16. — 23^a ora di infezione. Particelle virali complete di membrana nel citoplasma. Le membrane sembrano derivare dai tubuli del reticolo endoplasmatico (80.000x).

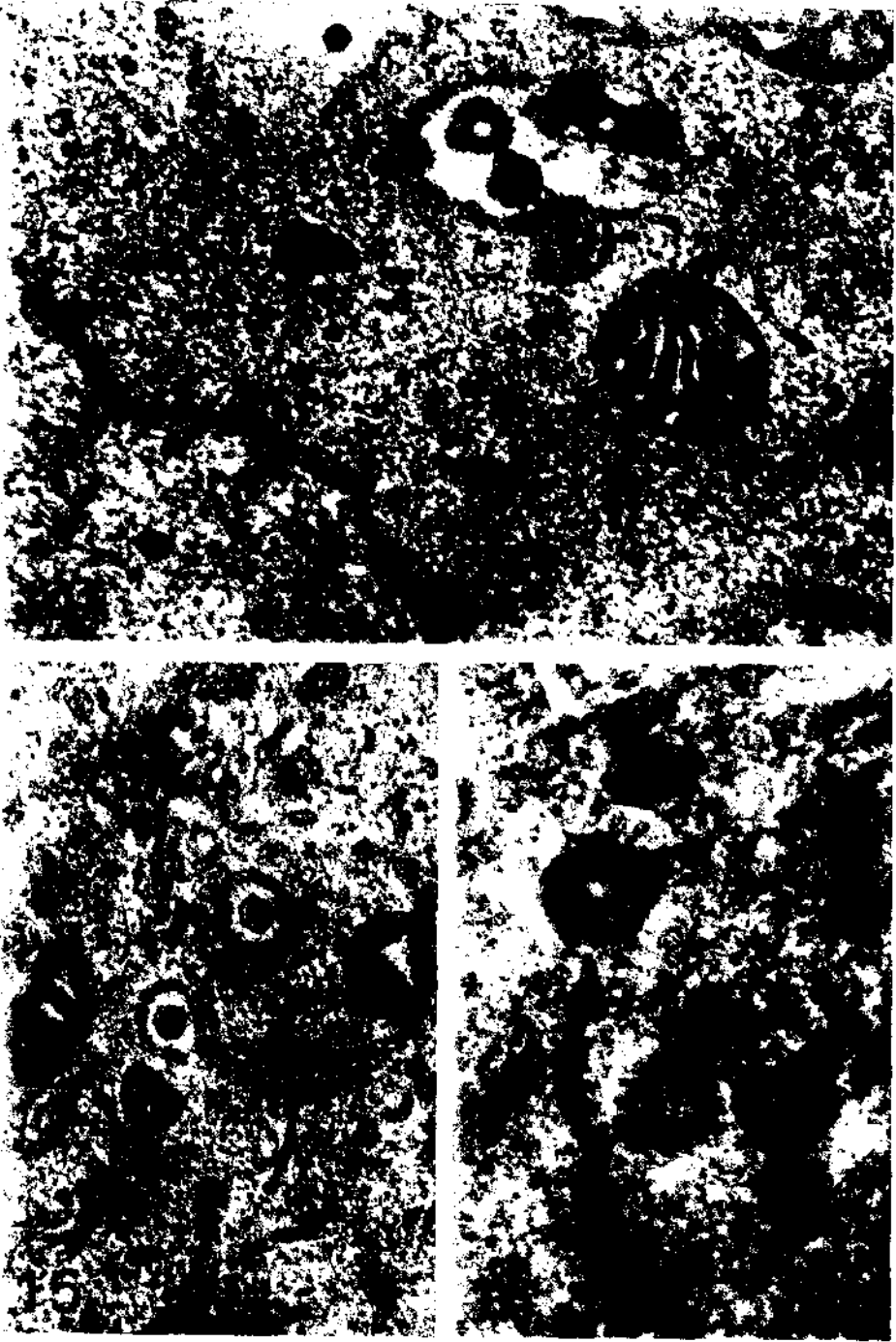
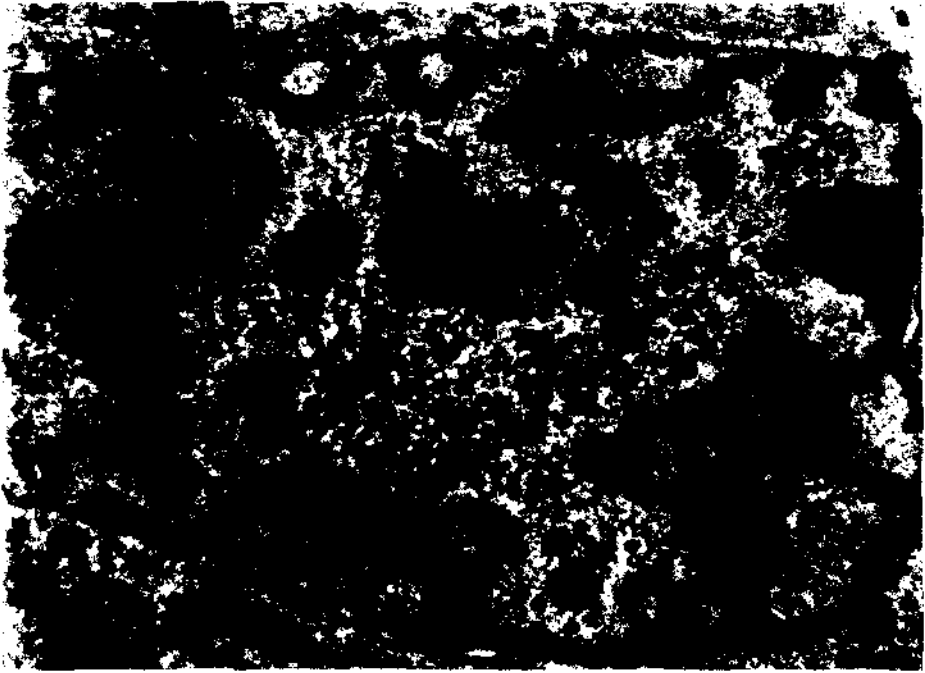


Fig. 17, 18, 19 e 20 — Successivi stadi di fuoriuscita di una particella virale completa di membrana dalla cellula. Non vi è alcuna traccia di vacuolo (100.000x).



Fig. 21, 22 e 23. — Vari aspetti del nucleo dopo 48 ore dall'infezione. Si notano numerose particelle, mai disposte in forme pseudocristalline, in prossimità di granulazioni di diverse densità e dimensioni, verosimilmente corrispondenti alla matrice virale (Fig. 21: 30.000x; Fig. 22: 53.000x; Fig. 23: 26.000x).



- Fig. 24.** — Particelle virali nel citoplasma di cellule dopo 48 ore dall'infezione. Le particelle, complete di membrana, sono circondate a gruppi da un complesso di membrane (75.000x).
- Fig. 25.** — Particelle virali libere prive di membrana osservate in contrasto negativo. Preparazione ottenuta dopo 12 ore dall'infezione. È ben visibile la struttura e la disposizione dei capsomeri (100.000x).
- Fig. 26.** — Forme osservate in una preparazione in contrasto negativo, ottenuta dopo 12 ore dall'infezione, che corrispondono alle forme extracellulari descritte (85.000x).
- Fig. 27.** — Particelle virali libere provviste di membrana in contrasto negativo in una preparazione ottenuta dopo 34 ore dall'infezione. La penetrazione del colorante all'interno del capsido della particella superiore indica che essa è priva dell'acido nucleico (70.000x).

