

**Osservazioni al microscopio elettronico sul ciclo di sviluppo  
e sulla morfologia del virus rabico**

GIUSEPPE ARANCIA, ITALO ARCHETTI, FULVIA ROSATI VALENTE e DARIA STEVE  
BOCCIARELLI

*Laboratori di Fisica e di Microbiologia*

**Riassunto.** — È stato condotto uno studio, al microscopio elettronico, dello sviluppo intracellulare e della morfologia di un ceppo di virus rabico adattato a crescere in cellule di linea BHK 21. Viene dato uno schema della particella virale completa, molto simile a quello del virus della stomatite vescicolare, che rappresenta il prototipo del gruppo dei rabdovirus.

**Summary** (*Electron microscope study of the development and morphology of rabies virus*). — The development of a rabies virus strain, adapted to grow on BHK 21 cell line, was studied with the electron microscope. Sections of infected cells were stained with  $UO_2$  acetate and Pb citrate, and single particles obtained after rupture of the infected cells by osmotic shock were observed on the specimen supporting film in negative contrast.

The viral particles appear in the cytoplasm of the treated cell three days after infection (Plate 1 and 5) and are situated near the characteristic matrix which contains the specific antigens of the virus (Hummeler *et al.*, 1968). At times they are found near the nucleus and occasionally between the nuclear membranes. Bundles of thin filaments, which seem to derive from mitochondria (Plate 6), are also present.

The particles appear to be released from the cells through a rarefied zone of the cell membrane (Plate 7-9).

An outline of the virus structure based on the observations reported in this paper is given in Fig. 1. This is in keeping both with that proposed by SIMPSON & HAUSER (1966) and by NAKAI & HOWATSON (1968) for the vesicular stomatitis virus, and with the data obtained by HUMMELER *et al.* (1968) on the rabies virus.

## INTRODUZIONE

Il virus rabico appartiene al gruppo dei rabdovirus (da *rhabdos*=*bastoncello*), il cui prototipo è il virus della stomatite vescicolare; contiene RNA, ha la forma allungata a proiettile (*bullet-shape*) caratteristica del gruppo a cui appartiene, ed è estremamente labile; quindi è difficile isolarlo integro.

In questa Nota sono riportati alcuni dati sul processo di riproduzione e di fuoriuscita dalla cellula ospite relativi al virus rabico, ed i risultati di uno studio morfologico del virus stesso.

## MATERIALI E METODI

*Virus.*

È stato adoperato il ceppo VFSS di virus rabico fisso, gentilmente inviatici dal dott. P. E. Valensin dell'Istituto Sieroterapico Selvo di Siena e da lui attenuato adattandolo, con successivi passaggi, a crescere nelle cellule BHK21, dove si moltiplica, senza causare alcun effetto citopatico evidente.

*Cellule.*

Come substrato cellulare è stata usata una linea stabilizzata, ottenuta da reni di criceto siriano neonato (BHK21). Il terreno di crescita era costituito da MEM (Eagle's minimal essential medium), addizionato del 10 % di siero di vitello; quello di mantenimento da MEM più il 2 % di siero di vitello.

*Infezione delle cellule in vitro.*

È stato impiegato il virus prodotto in BHK21 al suo 45°-47° passaggio e avente un titolo in topo, dopo inoculazione intracerebrale, di  $10^6$  LD50/ml. Per favorire l'adsorbimento e la penetrazione delle particelle infettanti, le cellule venivano tenute in sospensione, agitandole, di tanto in tanto, per 1 h a 37°C, dopo di che si lasciava che le cellule aderissero al vetro del recipiente (piccole bottiglie con una superficie utile di circa 20 cm<sup>2</sup>), che venivano tenute alla stessa temperatura. La molteplicità di infezione è sempre stata bassa, almeno per quanto si può dedurre in rapporto al titolo del virus in topo: quindi, quando si dice 1, si intende il numero non determinato di particelle corrispondenti ad una LD50.

## MICROSCOPIA ELETTRONICA

a) *Inclusioni.*

Le cellule infettate e quelle di controllo venivano prefissate in glutaraldeide 2,5 % in tampone di Millonig (MILLONIG, 1962) 0,13 M per 15 minuti. Dopo un lavaggio con lo stesso tampone, venivano fissate in OsO<sub>4</sub> 1 %

per 1h. Durante il processo di disidratazione nella serie degli alcool, in quello a 70 % veniva di solito aggiunto acetato di uranile 1 % e la preparazione tenuta per 1h in questa diluizione. Dopo l'alcool assoluto ed un passaggio in acetone, si procedeva all'inclusione in araldite. Le cellule venivano staccate dalle Kolles quando si trovavano in alcool assoluto. Le sezioni, ottenute con un ultramicrotomo Porter Blum MT2, venivano colorate con Pb (REYNOLDS, 1963) ed osservate al microscopio elettronico Siemens Elmiskop I o AEI EMB6.

b) *Contrasto negativo.*

Data la difficoltà di ottenere un preparato di virus liberi a causa della fragilità e labilità delle particelle, si è ricorso all'osservazione di frazioni cellulari da cellule distese in monostrato, modificando la tecnica originale di Monroe (MONROE, SCHIDLOVSKY & CHANDRA, 1967), poichè con questa il preparato veniva completamente distrutto. La metodologia da noi eseguita è stata la seguente: prelevate con un'ansa le cellule dal terreno di coltura, si ponevano direttamente sulla reticella portaoggetti, ricoperta da una pellicola di carbone. Prima che il preparato si prosciugasse completamente, si aggiungeva una goccia di molibdato di ammonio 2 % pH 6,6. Tale soluzione è sufficientemente ipotonica da determinare lo scoppio della cellula, senza tuttavia danneggiarla troppo. Dopo pochi secondi, il molibdato veniva allontanato, prosciugando la reticella con carta da filtro; il preparato era così pronto per l'osservazione al microscopio elettronico.

## RISULTATI

*Sviluppo del virus.*

Le particelle virali appaiono nel citoplasma delle cellule infettate in quantità rilevante al terzo giorno dopo l'infezione (Tav. 1 e 5); si formano di solito al margine della zona costituita da materiale finemente disperso, corrispondente alla cosiddetta matrice o viroplasma e nella quale (HUMMELER *et al.*, 1968) è stata dimostrata, col metodo degli anticorpi coniugati con ferritina, la presenza di antigeni specifici del virus. Talvolta si trovano a ridosso del nucleo (Tav. 2) e, più raramente, tra i due strati della membrana nucleare (Tav. 3). Non compaiono quasi mai entro vacuoli, ma alla loro presenza è frequentemente associata quella di tratti di membrane, per lo più lisce (Tav. 4), ma talvolta ricche di ribosomi (Tav. 5). Alcune di queste membrane sembrano continuarsi con la parete esterna della particella virale (Tav. 4); non appaiono mai ispessite, come si osserva nel processo di gemmazione di molti virus dalla membrana citoplasmatica. Nelle cellule infette sono numerosissimi i ribosomi e i poliribosomi, espressione della notevole attività proteino-sintetica nel citoplasma. Si osservano inoltre

molti sottili filamenti, già precedentemente descritti (HUMMELER *et al.*, 1967; MATSUMOTO & KAWAI, 1969), che non si direbbero però associati alla formazione del virus, in quanto si notano, se pure meno frequentemente e meno numerosi, anche nelle cellule non infettate. Sembra degno di nota il fatto che spesso questi filamenti pare abbiano origine, o siano in stretta relazione, con i mitocondri (Tav. 6). Il nucleo della cellula sembra non partecipare al processo di formazione del virus: non si notano in esso modificazioni morfologiche evidenti e non appare nè ingrandito, nè addensato.

#### *Fuoriuscita del virus dalla cellula ospite.*

Non è stato da noi riscontrato, per lo meno in maniera chiara, il processo di fuoriuscita del virus per gemmazione dalla membrana cellulare, che inizia con un ispessimento della membrana stessa, come è stato descritto da vari ricercatori. Secondo le nostre osservazioni, la particella si avvicina al bordo della cellula in posizioni varie (Tav. 7), ma fuoriesce con l'estremità a ogiva, protrudendo da una zona piuttosto rarefatta che ispessita della membrana citoplasmatica (Tav. 7-9). Il distacco avviene progressivamente con l'apparente formazione di una specie di peduncolo, lasciando forse per un certo tempo la membrana parzialmente interrotta. La fuoriuscita della particella completa avviene spesso attraverso uno dei molti villi che sono quasi sempre presenti sulla superficie cellulare (Tav. 10 e 11).

#### *Aspetti morfologici della particella virale.*

La particella virale, nelle sezioni longitudinali, appare come un cilindro allungato che ha una estremità ogivale, mentre l'altra è piana, donde la somiglianza con un proiettile: il diametro della parte cilindrica è di circa 70 nm, la lunghezza media della particella intera è 160-180 nm. Sono molto frequenti le forme abbinatae per la punta, più rare quelle costituite da più particelle disposte in serie, collegate tra di loro, quelle a stella, o comunque ramificate, descritte da HUMMELER *et al.* (1967). La superficie esterna del capsido virale, ad eccezione della superficie piana terminale, è ricoperta da una serie regolare di proiezioni o « spikes », lunghe circa 10 nm, ispessite verso l'esterno fino a raggiungere una larghezza di circa 5 nm. Alcune immagini sembrano indicare che la superficie esterna presenti un andamento elicoidale nella disposizione delle spikes (Tav. 15), il che fa presumere che andamento analogo abbia la struttura che le sostiene. La zona centrale del virus, nelle sezioni trasversali (Tav. 12 e 19), appare notevolmente più trasparente agli elettroni della zona perimetrale: questa è costituita da due sottili membrane che racchiudono uno spazio trasparente agli elettroni. Sulla membrana esterna sono attaccate le spikes e all'altra è addossata internamente una corona circolare del diametro esterno di circa 45 nm e dello spessore di circa 5 nm, che appare fortemente contrastata. In alcune sezioni

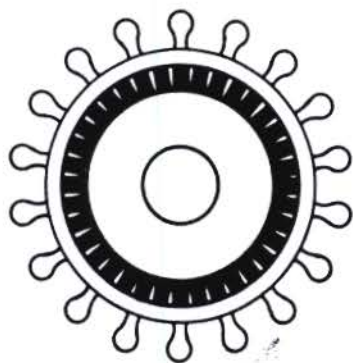
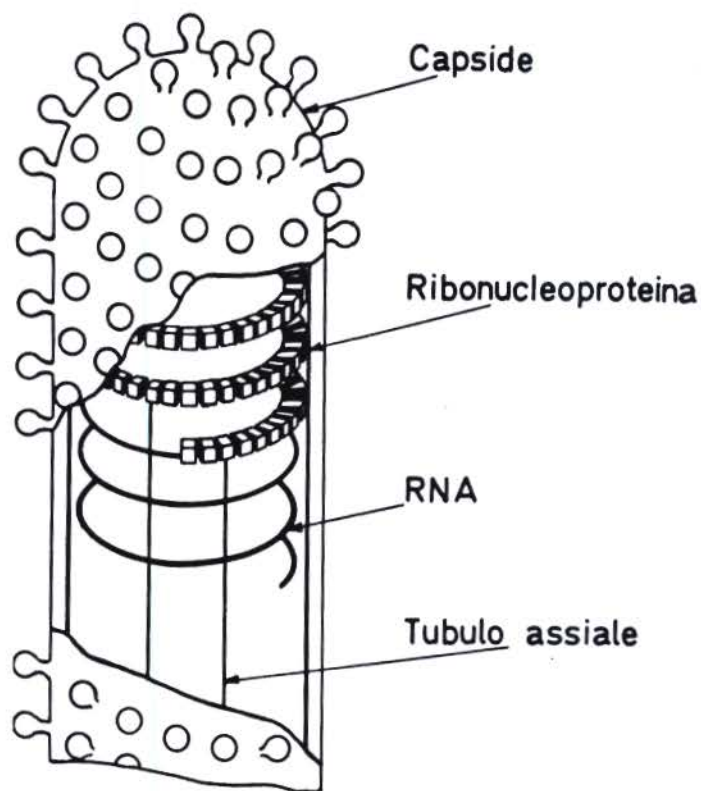


Fig. 1. — Schema della morfologia del virus rabico.

longitudinali della particella (Tav. 13) si può notare un sottile filo assiale; in altre (probabilmente in dipendenza del piano di taglio) i fili sembrano due, come se delimitassero le pareti di un tubicino posto lungo l'asse maggiore della particella stessa: la Tav. 14 mostra un taglio perfettamente assiale della particella, in cui compare questa struttura. In alcune sezioni trasversali tale struttura è rappresentata molto nitidamente da un cerchietto centrale, che può mostrarsi circondato da un alone stellato (Fig. 9 e 12). La ragione per cui questa struttura interna non compare in tutte le sezioni trasversali può dipendere sia dal fatto che essa non si estende lungo l'intera particella — come mostrano alcune immagini ottenute in contrasto negativo (Tav. 17) — sia dalla possibile esistenza di particelle incomplete, dato confermato dalla presenza di molte sezioni longitudinali di virus nelle quali la particella appare vuota.

Le osservazioni che si possono fare sulle immagini in contrasto negativo (Tav. 17 e 18) confermano quanto si può ricavare dalle sezioni. Le dimensioni trasversali della particella sono leggermente superiori (80-90 nm), forse a causa di un appiattimento della particella libera sul film portaoggetti, e forse anche a causa della ben nota lieve retrazione della resina includente all'atto della polimerizzazione.

Lo schema della morfologia della particella virale completa quale si può desumere dalle nostre osservazioni è rappresentato nella Tav. 20.

La corona circolare, fortemente contrastata, che si nota nelle sezioni trasversali (Tav. 19), corrisponde alla spirale ribonucleoproteica virale. Ciò è confermato sia dal fatto che in molte sezioni longitudinali si nota una regolare striatura trasversale (Tav. 16), sia perchè viene intensamente colorata anche dal solo acetato di uranile, come la cromatina e il nucleolo delle cellule ospiti. Sulla superficie esterna della particella sono impiantate le proiezioni. All'interno è la struttura tubulare di circa 15 nm di diametro, costituita forse anch'essa da una nucleoproteina. In sezione trasversale lo spazio compreso tra la superficie interna della corona e la struttura tubulare è molto più trasparente agli elettroni del resto della particella, ma a volte è presente nella porzione centrale addossata alla struttura tubulare la forma irregolarmente stellata, suggerita dalle Tav. 9, 12 e 13.

Lo schema della Fig. 1 è molto simile a quelli proposti da SIMPSON & HAUSER (1966) e da NAKAI & HOWATSON (1968) per il virus della stomatite vescicolare, ed in accordo con i dati ottenuti da HUMMELER *et al.* (1968) nel virus rabico.

Gli AA. desiderano ringraziare E. Chessa per il lavoro fotografico e L. Pierangeli per il disegno.

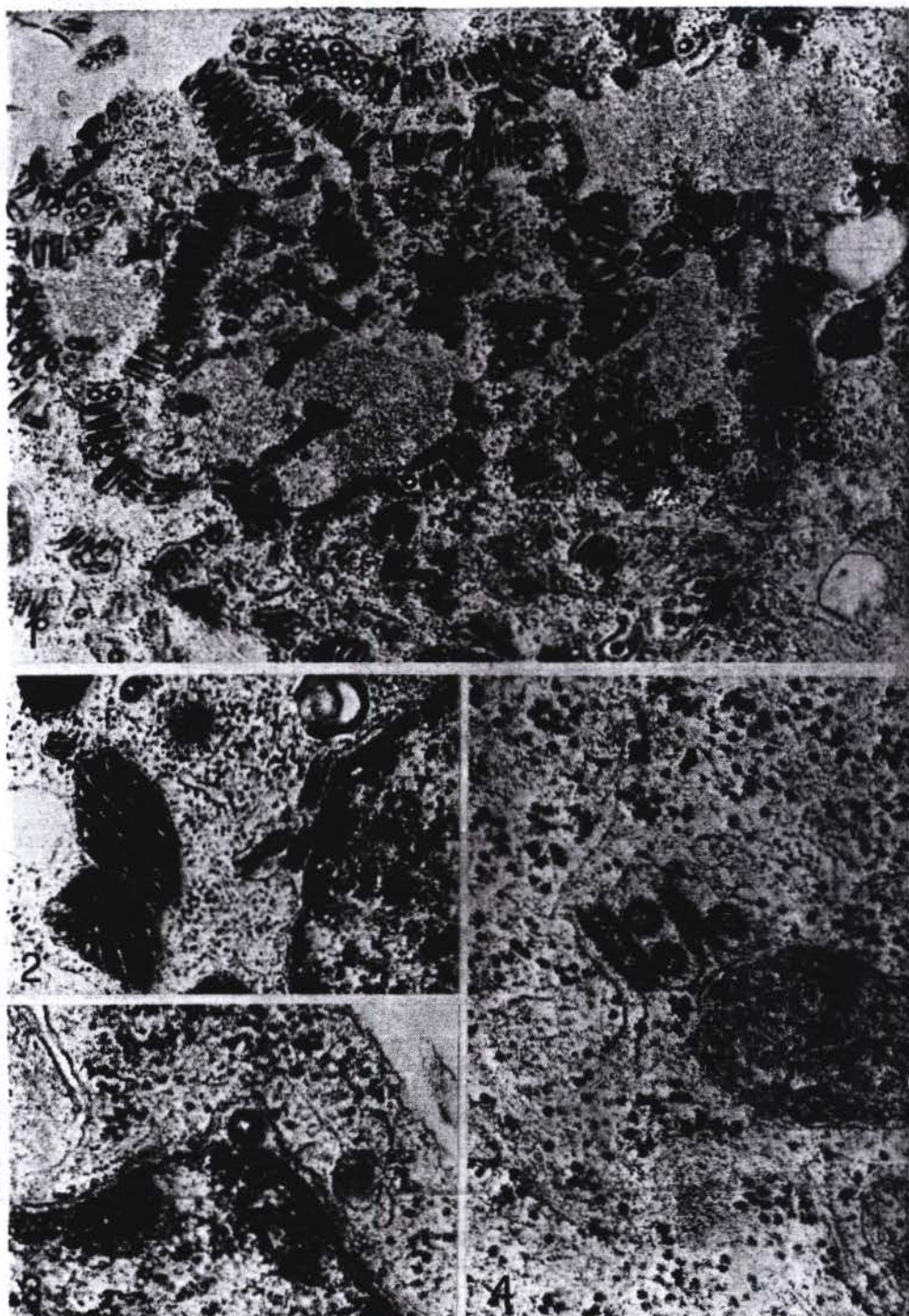
Ricevuto il 4 giugno 1973.

Accettato il 27 giugno 1973.

## BIBLIOGRAFIA

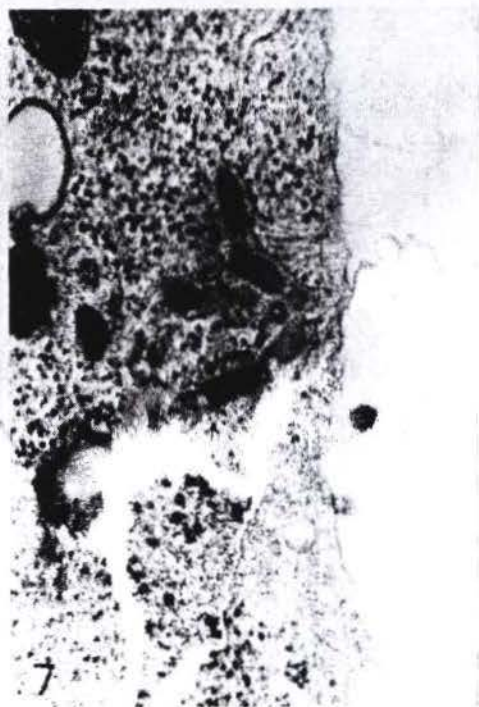
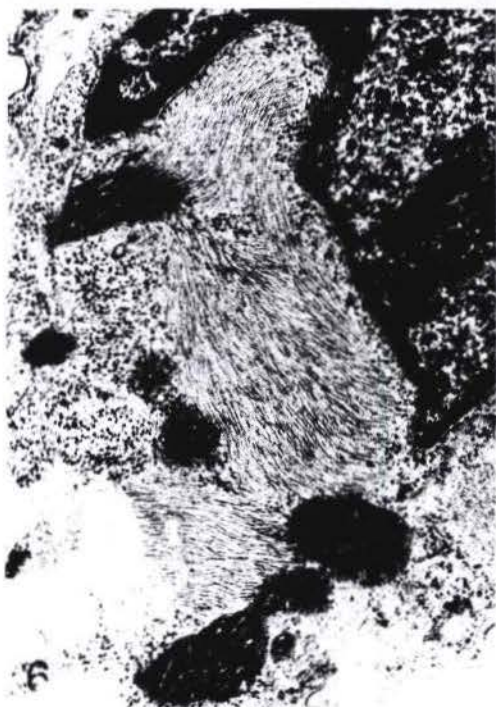
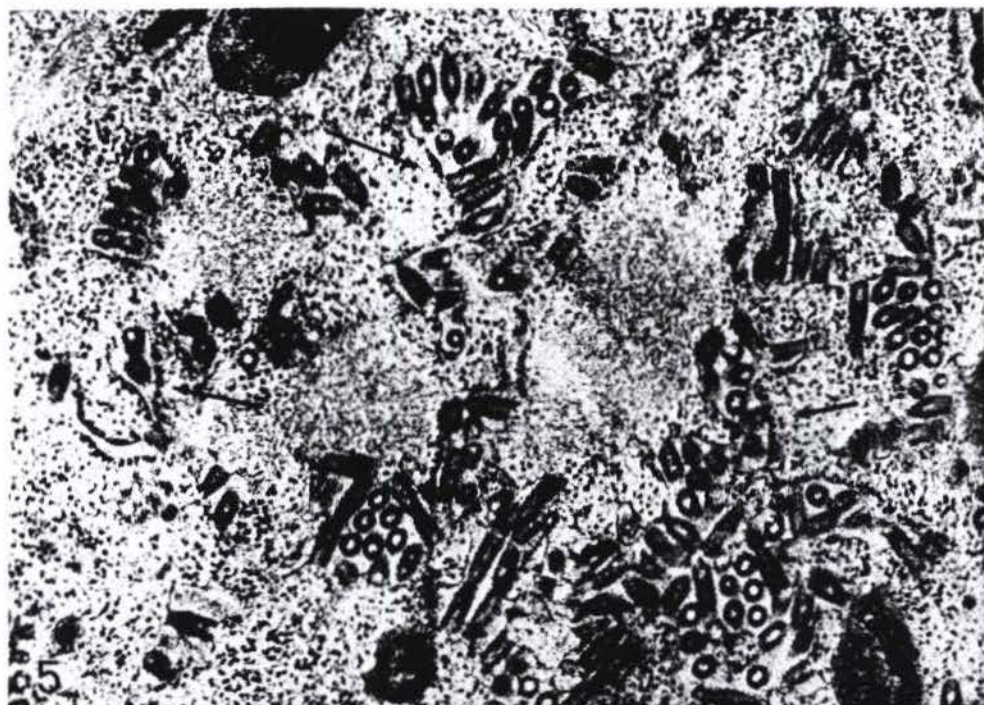
- HUMMELER, K., H. KOPROWSKI & T. J. WICTOR, 1967. *J. Virol.*, **1**, 152.
- HUMMELER, K., N. TOMASSINI, F. SOKOL, E. KUWART & H. KOPROWSKI, 1968. *J. Virol.*, **2**, 1191.
- MATSUMOTO, S. & A. KAWAI, 1969. *Virology*, **30**, 449.
- MILLONIG, G. 1962. In: *From Molecule to Cell*. P. Buffa, Ed., C.N.R., Roma, 317.
- MONROE, J. H., G. SCHIDLOVSKY & S. CHANDRA, 1967. *J. Ultrastruct. Res.*, **21**, 134.
- NAKAI, T. & A. F. HOWATSON, 1968. *Virology*, **35**, 268.
- REYNOLDS, E.S., 1963. *Cell Biol.*, **17**, 208.
- SIMPSON, R. W. & R. E. HAUSER, 1966. *Virology*, **29**, 654.

- Tav. 1. — Citoplasma di una cellula infetta (dopo tre giorni di infezione) in cui si nota lo sviluppo delle particelle virali attorno al viroplasma (33.000 ×).
- Tav. 2. — Particelle virali in prossimità del nucleo (50.000 ×).
- Tav. 3. — Particelle virali in sezione trasversale tra i due strati della membrana nucleare (90.000 ×).
- Tav. 4. — Particelle virali associate a membrane citoplasmatiche lisce. Si nota la continuità tra le membrane e le pareti esterne delle particelle stesse (100.000 ×).





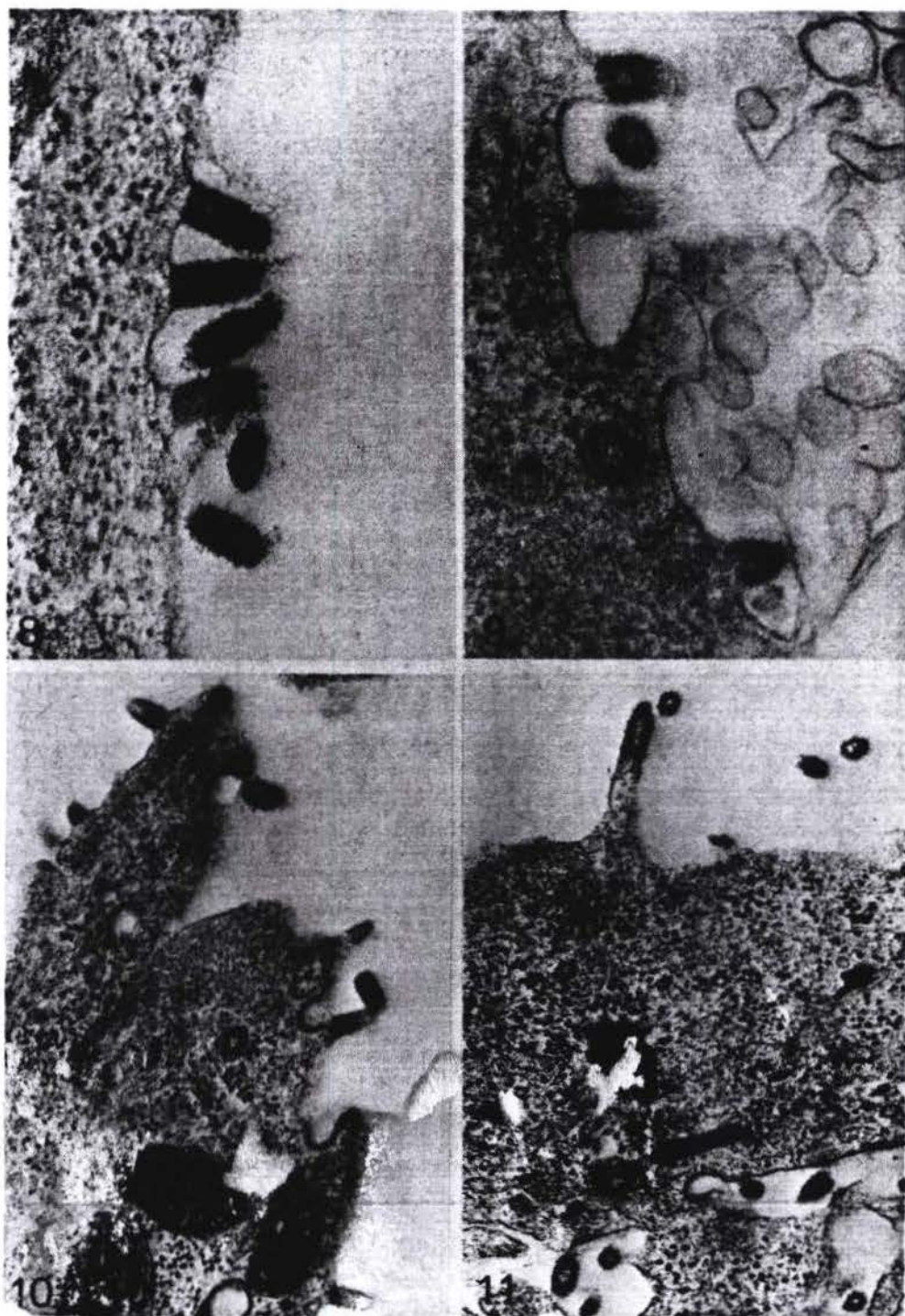
- Tav. 5. — Gruppi di virus attorno al viroplasma. Le frecce indicano l'associazione tra le particelle virali e le membrane ruvide (46.000  $\times$ ).
- Tav. 6. — Lunghi fasci di filamenti che sono in stretta relazione con i mitocondri (30.000  $\times$ ).
- Tav. 7. — Particelle virali prossime al bordo cellulare (55.000  $\times$ ).



Tav. 8. — Particelle virali che stanno per uscire dalla cellula (90.000  $\times$ ).

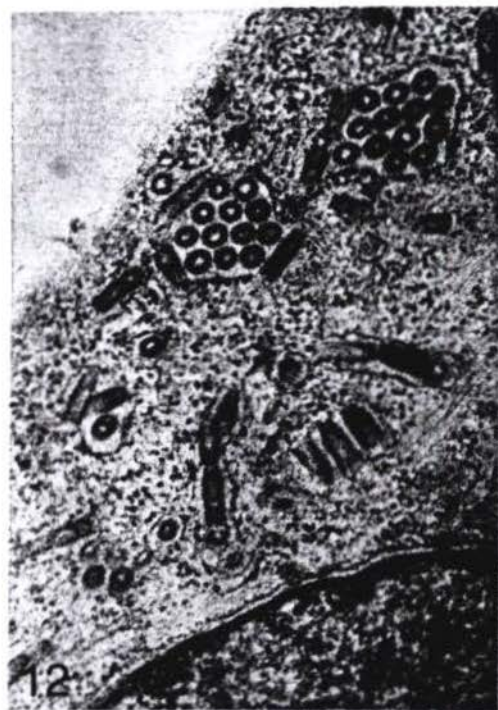
Tav. 9. — Particelle virali che stanno per uscire dalla cellula. Nel citoplasma si nota una particella tagliata trasversalmente in cui è visibile la formazione stellata attorno alla struttura tubulare assiale (120.000  $\times$ ).

Tav. 10 e 11. — Particelle virali che si stanno staccando dai villi cellulari (60.000  $\times$ ).



\*

- Tav. 12. — Gruppi di virus in sezioni trasversali. All'interno di alcuni di essi si nota la formazione stellata attorno alla struttura tubulare assiale (50.000  $\times$ ).
- Tav. 13. — Particelle virali attorno al viroplasma. Le frecce indicano le particelle tagliate trasversalmente, nelle quali compaiono uno o due sottili fili assiali, che fanno ritenere che esista una struttura tubulare assiale (50.000  $\times$ ).
- Tav. 14. — Taglio longitudinale assiale di una particella virale libera. È ben visibile la struttura tubulare interna (90.000  $\times$ ).
- Tav. 15. — La particella virale indicata dalla freccia mostra l'andamento elicoidale della struttura superficiale (120.000  $\times$ ).



Tav. 16. — Particella virale tagliata longitudinalmente, in cui sono ben visibili le proiezioni del capsido e la striatura trasversale interna (100.000  $\times$ ).

Tav. 17 e 18. — Virus liberi in contrasto negativo (80.000  $\times$ ).

Tav. 19. — Gruppo di particelle virali tagliate trasversalmente, a maggiore ingrandimento. È ben visibile la doppia membrana capsidica e la corona circolare interna fortemente contrastata (300.000  $\times$ ).

