

Nolewajka E., Kapp Z., Szurman J., Szaflarski J. — **Trial of photodynamic inactivation of attenuated strain of the Teschen disease virus.**

Acridine orange does not make sensitive the Teschen disease virus (TDV) to the day light. The TDV multiplied in the presence of acridine orange has gained photosensitivity to the day light. All the

same, some particles of the TDV are resistant to the day light. The resistance persists even after 3 passages of the TDV in the presence of acridine orange. The RES cells exposed to acridine orange before the virus infection release the photosensitive particles of the TDV. In this case the resistant fraction to the light exposure has been observed.

JERZY GÓRSKI

Studia nad zakaźnym zapaleniem mózgu lisów (wątroby psów) w Polsce

IV. Oporność wirusa na działanie czynników fizycznych

Badawcza Pracownia Wirusologiczna Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego
Kierownik Pracowni: dr J. GÓRSKI

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Zdolność przeżywania infekcyjnego wirusa poza organizmem (w środowisku) ma poważny wpływ na rozprzestrzenianie choroby. Badania wykonane w kraju (5, 7, 10, 16, 17) i za granicą (1, 2, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15) wykazały, że choroba Rubarth'a (ch.R.) występuje stosunkowo często we wszystkich prawie krajach świata. Jest to uwarunkowane szerokim spektrum zakaźności wirusa, oraz prawdopodobnie także znaczną jego opornością na działanie czynników fizyko-chemicznych. Poznanie wrażliwości w.ch.R. na działanie czynników fizycznych posiada zatem poważne znaczenie dla ustalenia najważniejszych metod postępowania przeciwepidemiotycznego, a zwłaszcza dewastacji zarazka.

Celem niniejszej pracy było przebadanie żywotności wirusa w różnych temperaturach, oraz wpływu wielokrotnego zamrażania. W wykonanych badaniach starano się ponadto zgromadzić niezbędne dane do opracowania metodyki produkcji i kontroli swoistych preparatów immunologicznych przeznaczonych do zwalczania ch.R.

Materiał i metody

Użyto 2 szczepów w.ch.R. — atenuowanego (h) Hep i zjadliwego LJG namnażanych na hodowli komórek nerki psa (HKNP) (4). Miano szczepu (w log. HKID₅₀) (h)Hep wynosiło ok. 7,0 a LJG ok. 6,0. Przebadano działanie temperatur: 100°, 56°, 37°, 20—22°, 4° i —70°C. Próbkę płynu wirusowego w zatopionych cienkościennych ampulkach poddawano działaniu określonej temperatury w określonym czasie i wysiewano na HKNP dla ustalenia żywotności i miana zakaźnego. W przypadku ujemnego wyniku wykonywano dodatkowo 2 ślepe pasaże. Wyniki obliczono wg Reeda i Muencha i podano w log. HKID₅₀/ml. Miareczkowanie wirusa wykonywano przy inoculum 0,1 ml w przedziale 1 log, z użyciem 6 probówek HKNP na każde rozcieńczenie.

Wyniki i omówienie*)

Wpływ temp. 100°. W 5-krotnie wykonanych badaniach 1-minutowe ogrzewanie

płynu wirusowego z HK — szczepów (h)Hep i LJG wykazało całkowitą jałowość. Odmienne wyniki osiągnięte przez innych autorów, a podane przez Steffenową (15), być może związane były z użyciem do badań materiału wirusowego w postaci grubych wycinków narządów.

Wpływ temp. 56°. Temperatura ta ma istotne znaczenie przy inaktywacji surowic odpornościowych. Badanie miało na celu ustalenie czy zwykle stosowane 30-minutowe ogrzewanie wystarcza dla zabicia wirusa. Wykazano, że w tych warunkach następuje jedynie wyraźne obniżenie miana. Pełną inaktywację w 56° osiągnęto dopiero po 4—5 godzinach ogrzewania (tab. 1). Osiągnięte wyniki

Tab. 1. Wpływ ogrzewania w temp. 56°C na żywotność wirusa Rubarth'a

Szczep	Nr badania	log miana wirusa po ogrzaniu (minut)							
		0	10	30	60	120	180	240	300
(h)Hep	I	+ (7,4)	x	+ (2,15)	+ (2,15)	+ (2,15)	x	—	x
	II	+ (7,5)	+ (3,0)	+ (3,5)	+ (3,2)	+ (1,5)	+ (3,2)	+ (1,5)	x
	III	+ (7,5)	+ (3,3)	+ (2,7)	+ (4,5)	+ (3,5)	+ (1,0)	+ (1,0)	—
LJG	I	+ (5,5)	x	+ (2,15)	+ (2,15)	+ (2,15)	x	—	x
	II	+ (5,7)	+ (2,6)	+ (2,5)	+ (1,5)	+ (0,6)	+ (0,6)	—	x
	III	+ (5,7)	+ (3,0)	+ (2,5)	+ (2,5)	+ (1,3)	—	—	x

Objaśnienia: + = żyje, — = nie żyje, x = nie badano

są zgodne z badaniami Hodgmana i Larina (6), a nie pokrywają się z wynikami uzyskanymi przez Fastiera (3), wg których wirus HCC ginie w 56° już w ciągu 10—28 minut. Przyczyną odmiennych wyników tego autora (3) mogła być zbyt krótka obserwacja posiewów i nie wykonanie ślepych pasaży. Należy przy tym podkreślić, że Fastier operował tylko 1 szczepem. W badaniach własnych pomimo, że użyto tylko 2 szczepów, wykazano możliwość jednakowej ciepłooporności.

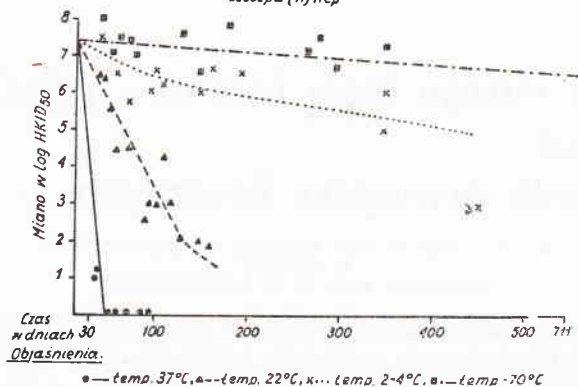
W świetle osiągniętych wyników należy sądzić, że surowice lecznicze, zwłaszcza psie, wprowadzane do obrotu w krótkim czasie po wyprodukowaniu, winny być poddawane, poza normalnym badaniem na jałowość, badaniu wirusologicznemu na HKNP.

Wpływ temp. 37°. Badanie wpływu tej temperatury ma bardzo poważne znaczenie przy namnażaniu wirusa na HK. Poza tym

*) W pracy wykorzystano niepublikowane fragmenty dysertacji doktorskiej autora p.t. „Właściwości szczepu h/Hep w.ch.R. i jego przydatność do uodporniania zwierząt” — promotor prof. dr T. Jastrzębski.

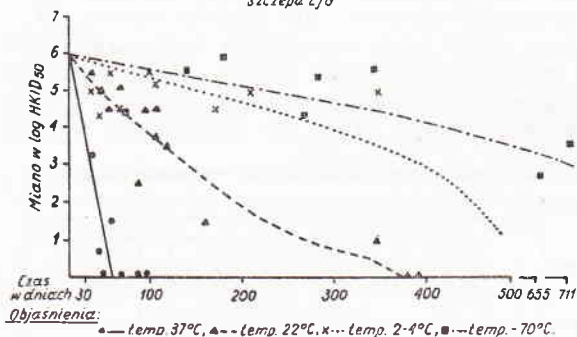
temp. 37° jest temperaturą ciała większości ssaków, a zatem może mieć wpływ na czas przeżywania zarazka nie związanego z komórką ustroju. Wykazano, że badane szczepy są bardzo wytrzymałe (ryc. 1 i 2) i zachowują w

Ryc. 1. Wpływ temperatury przechowywania na żywotność wirusa Rubarth'a szczepu (h) Hep



tych warunkach żywotność przez co najmniej 38 dni, a szczep LJG nawet (w 1 przypadku) przez 54 dni. Dopiero po upływie 69 dni przechowywania w 37° nie stwierdzono nigdy obecności żywego wirusa.

Ryc. 2 Wpływ temperatury przechowywania na żywotność wirusa Rubarth'a szczepu LJG



Wpływ temp. 20—22°. Wyniki badania (ryc. 1 i 2) wskazują, że obydwa szczepy pozostały żywe przez co najmniej 159 dni — szczep LJG nawet 346 dni. Należy zaznaczyć, że w dostępnym piśmiennictwie badań w takim zakresie dotąd nie wykonano. Stwierdzona wysoka trwałość wirusa HCC budzi podejrzenie, że samoodkażenie przyborów i klatek po zwierzętach padłych na zzml (wp), nawet w razie usunięcia zwierząt z hodowli na cały rok, może nie nastąpić. Oczywiście twierdzenie to wymaga dalszych badań, z użyciem środowiska odpowiadającego warunkom naturalnym. Jednak obserwowany przez jednego z lekarzy w terenie przypadek zzml w nowo zakupionym stadzie lisów, umieszczonym po rocznej przerwie w klatkach po zwierzętach padłych na ch.R., w świetle niniejszych badań mógł być spowodowany przez utrzymujący się w środowisku zewnętrznym wirus z epizootii roku poprzedniego.

Wpływ temp. 2—4°. W lodówce żywotność w.ch.R. znacznie wzrasta. Jak widać w załączonych wykresach spadek miana w ciągu 1 roku przechowywania jest stosunkowo niewielki (ca 1—2 log). Obecność żywego wirusa wykazano jeszcze po 446 i 496 dniach (dalej nie badano).

Wpływ temp. — 70°. W kontenerze z suchym lodem miano wirusa spada bardzo powoli. W ciągu około 2 lat miano szczepu (h) Hep spadło z około 7,5 do 6,5, a szczepu LJG z 6,0 do 3,5 (ryc. 1 i 2). Badania wykonane po 4,5 i 6 latach przechowywania wykazały dalszy powolny spadek miana zakaźnego — jednak obecność żywego wirusa zawsze była wykazywana dla (h)Hep 2,0—3,0 dla LJG¹ — 2,0).

Wpływ wielokrotnego zamrażania. Jedną z podstawowych metod uwalniania wirusa z komórek jest zamrażanie i odmrażanie. Badania miały na celu sprawdzenie czy proces zamrażania nie wpływa na obniżenie miana wirusa. Wyniki zebrane w tab. 2

Tab. 2. Wpływ zamrażania i rozmrażania na miano wirusa choroby kuzarków

Szczep	Kolejność zamrażania i rozmrażania				
	0	1	2	3	5
(h) Hep HCC	7,5	8,0	7,4	7,0	7,5
LJG	6,5	5,7	5,75	5,5	5,5

wskazują, że jedno — względnie dwukrotne zamrażanie płynu wirusowego wraz z komórkami w temp. — 40°, zdaje się nie mieć istotnego wpływu na wysokość miana. Nie stwierdzono ujemnego wpływu wielokrotnych zamrażeń w granicach do 10 razy.

Reasumując wyniki badań należy stwierdzić, że w.ch.R. wykazuje wybitną żywotność. W temp. pokojowej może być bez szkody utrzymywany — tygodnie, w lodówce — miesiące, a w kontenerze z suchym lodem — lata. Ten ostatni punkt zdaje się mieć istotne znaczenie przy utrzymywaniu szczepów, gdyż wskazuje na możliwość zachowania ich przy życiu przez dłuższy okres czasu również bez liofilizacji. Wysoka trwałość³ wirusa wydaje się być jednym z czynników sprzyjających utrzymywaniu się choroby w środowisku i jak należy przypuszczać wpływającym na szerokie jej rozprzestrzenienie.

Piśmiennictwo

- Coffin D. L.: J. Am. Vet. Med. Ass. 11, 355, 1948.
- Czerniak W. Z., Kuprtie O. H., Własowa L. P.: Weterinaria 32, 59, 1955.
- Pastier L. B.: Vet. Rec. 70, 623, 1958.
- Górski J.: Medycyna Wet. 21, 652, 1965.
- Górski J., Jastrzębski T., Górski C.: Medycyna Wet. 25, 471, 1969.
- Hodgman S. F. J., Larin N. M.: Vet. Rec. 65, 447, 1953.
- Jastrzębski T., Wawrzkiwicz J.: Medycyna Wet. 21, 531, 1965.
- Iran E.: Vet. Med. 9, 267, 1964.
- Motohashi T.: N. J. B. S. Bul. Biol. Res. 5, 25, 1960.
- Cyrzanowska J.: Pol. Arch. Vet. 9, 1, 1965.
- Resang A. A.: Hamera Zoa 64, 105, 1957.
- Rubarth S.: Acta Path. Microb. Scand. 63, 1, 1947.
- Saxer E.: Schweizer Arch. Tierheilk. 90, 562, 1948.

14. Smith D. L. T.: Am. J. Vet. Res. 12, 38, 1951.
 15. Steffen J.: Choroby zwierząt futerkowych (skrypt Sp. Fotografika, Bielsko Biala, 1964).
 16. Stryszak A.: Medycyna Wet. 6, 147, 1950.
 17. Taylor K.: Biul. Inst. Med. Morsk., Gdańsk, 9, 89, 1958.
 18. Whitem J. H., Blood E. C.: Austr. Vet. J. 25, 166, 1949.

Adres autora: dr Jerzy Górski, Puławy — Michałowka 3/9.

Гурски Е. — Исследования по инфекционному воспалению мозга лисиц (печени собак) в Польше. IV. Выносливость вируса при воздействии физических факторов.

Исследования провели на аттенуированном штамме (h)Нер и на вирулентном LJG. Установили, что оба штаммы вируса болезни Рубарта в жидкости культуры клеток почек собаки погибают в температуре 100° во время до 1 минуты, а в 56° — между 4 а 5 часом экспозиции. В 37° жизнеспособность вируса (h)Нер сохранялась 38 суток (штамм LJG 69 суток); в комнатной температуре (20—22°) — выше 159 суток (штамм LJG даже 346), в холодильнике — выше 1 года а в контейнере с сухим льдом — выше 6 лет. Вирус оказался нечувствительным на многократное замораживание и оттаивание. Автор обсуждает возможное влияние высокой выно-

сливости вируса на широкое распространение и от-носительно частое появление болезни Рубарта у животных.

Górski J. — Studies on infectious encephalitis of foxes (hepatitis in dogs) in Poland. IV The resistance of a virus on the action of physical agents.

The investigations with the use of attenuated strains (h)Hep and virulent LJG have revealed that Rubarth's disease virus in the dog kidney cell culture medium perishes earlier than within 1 min at 100°C and between 4—5 hr at 56°C. The both investigated strains were alive for 38 days at 37°C and LJG even for 69 days. At room temperature (20—22°C) the both strains were alive for over 159 days (LJG even for 246 days). The virus has not lost its infectivity after one year at refrigerator temperature, and in dry ice after 6 years. The investigations indicate to the existence of some differences as to the thermostability of individual strains. The virus was also resistant to repeated freezing and thawing. The influence of long lasting infectivity of the virus on its wide spreading and relatively often incidences of Rubarth's disease is discussed.

EWA MASŁOWSKA

Określenie aktywności hemolitycznej dopełniacza (C') u owiec

Zakład Epizootiologii Ogólnej Instytutu Weterynarii w Puławach
 Kierownik: prof. dr S. KRAUSS

Dopełniacz (komplement, C') jest kompleksem białek znajdujących się w surowicy krwi wszystkich kręgowców (4). Odgrywa on istotną rolę w wielu zjawiskach biologicznych takich jak hemoliza krwinek czerwonych, odczyn wiązania dopełniacza, właściwości bakteriobójcze surowicy krwi, odczyn fagocytarny i immunoadhezyjny.

Przez wiele lat sądzono, że dopełniacz składa się z 4 oddzielnych komponent C'1, C'2, C'3, C'4. Ostatnio wykazano, że dopełniacz jest kompleksem przynajmniej 9 oddzielnych komponent (1), które działając w określonej kolejności powodują lizę komórek. Działanie dopełniacza w immunologicznej hemolizie zachodzi poprzez skomplikowane stadia, w których jedna komponenta, początkowo obecna w nieczynnej formie, staje się aktywna i działa na następną powodując jej aktywację. Proces ten można określić jako kaskadowy (6). Ostatecznym substratem działania dopełniacza jest błona komórkowa i wszystkie stadia służą do wytworzenia czynnika lub czynników zdolnych do zniszczenia błony komórkowej. Uszkodzenia błony komórkowej erytrocytów powodują zmianę ciśnienia osmotycznego, pobieranie wody przez erytrocyty i hemolizę krwinki. Przypuszczano, że uszkodzenia w błonie komórkowej erytrocytów powstają w postaci oddzielnych dziur. Ostatnio zostało to potwierdzone przy pomocy mikroskopu elektronowego (1, 6).

Badania aktywności dopełniacza opiera się na jego zdolności rozpuszczania krwinek czerwonych uczulonych swoistym przeciwciałem — amboceptorem.

Większość badań nad aktywnością hemolityczną dopełniacza wykonano przy użyciu dopełniacza świnki morskiej i zawiesiny krwinek czerwonych barana uczulonych swoistym amboceptorem króliczym.

Stwierdzono, że hemolityczna aktywność dopełniacza zależy od gatunku zwierzęcia, od którego otrzymuje się krwinki jak i przeciwciała. Stwierdzono różną aktywność z przeciwciałami i krwinkami różnych zwierząt. Surowice koni, krów i owiec słabo hemolizują krwinki baranie uczulone przeciwciałami króliczymi, hemolizują natomiast dobrze krwinki królicze uczulone przeciwciałami wyprodukowanymi na owcach (3). Dopełniacz koni hemolizuje dobrze krwinki czerwone krowy, uczulone przeciwciałami kota (3).

Podstawowy mechanizm dopełniacza jest jednakowy u wszystkich zwierząt. Różnice są przede wszystkim ilościowe tzn. dopełniacze poszczególnych gatunków zwierząt różnią się od siebie aktywnością poszczególnych komponent. Istnieją także różnice jakościowe. Stwierdzono, że C'1 i C'3 krów i koni mogą zastępować te same komponenty dopełniacza świnek morskich w układzie hemolitycznym, lecz nie mogą zastępować ich komponent C'2 i C'4 (2).

Przy badaniu poszczególnych parametrów odporności naturalnej u owiec w innym doświadczeniu, napotkano na trudności w uzyskaniu informacji dotyczących aktywności dopełniacza u tych zwierząt. Podjęto więc pracę, której celem było określenie aktywności hemolitycznej dopełniacza u tych zwierząt.