

MEDYCYNA WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CHASOPISMO POŚWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN — sekretarz naukowy.

RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZEBSKI, prof. dr Lech JASKOWSKI, dyr. dr Zbigniew JARZĘBSKI, doc. dr Adam KĄDZIOLKA, płk dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Stanisław KRAUSS, prof. dr Józef KULCZYCKI, prof. dr. Zdzisław LARSKI, dr Władysław LUTYŃSKI, dyr. dr Henryk OBERFELD, prof. dr Wincenty PEZACKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI.

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

JERZY WIŚNIEWSKI

Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na wirus pryszczycy

Zakład Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii w Zduńskiej Woli
Kierownik: prof. dr T. KOBUSIEWICZ

Jednym z podstawowych elementów walki z pryszczycą jest zniszczenie źródła zakażenia. Zadanie to spełnia odkażanie (9), które przy pomocy środków fizycznych i chemicznych prowadzi do całkowitego zniszczenia wirusa.

Przy produkcji szczepionek, podczas inaktywacji wirus jest także pozbawiony zjadliwości i zdolności do namnażania, ale zachowuje zdolność adsorpcji i przenikania do komórki (23).

Wirus pryszczycy jest jednym z najmniej szkodliwych a jednocześnie najbardziej zjadliwych zarazków, opornym na działanie czynników termicznych. Zarazek ma kształt kulistych cząstek o wymiarach 22—25 m μ . Kompletny wirion składa się z centralnie położonego kwasu nukleinowego RNA i zewnętrznej otoczki proteinowej zwanej kapsydem, utworzonej z 32 podjednostek białkowych — kapsomerów. W kwasie rybonukleinowym zakodowane są wszystkie właściwości genetyczne wirusa. Pojedyncze kapsomery widoczne są, przy użyciu mikroskopu elektronowego, w formie cząstek 7—8m μ (8).

Aby wirus został unieczynniony musi ulec rozbiciu jego kwas nukleinowy. W procesie unieszkodliwiania wirusa niektóre czynniki mogą działać bezpośrednio na kwas nukleinowy, nie uszkodzając otoczki proteinowej. W ten sposób działają promienie ultrafioletowe, a z czynników chemicznych: acetyletylenamina, beta-propiolakton, glicydaldehyd i hydroxylamina (23). Temperatura powyżej 50°C oraz formalina działają przede wszystkim uszkodzająco na o-

czkę białkową, a wtórnie na kwas nukleinowy. Inne środki uszkodzają tylko otoczkę proteinową, pozostawiając nieuszkodzony kwas nukleinowy. Oddziaływanie takie wywiera kwaśne środowisko. Mechanizm tej reakcji jest następujący: w środowisku kwaśnym otoczka proteinowa wirusa pryszczycy rozpada się uwalniając kwas nukleinowy. Cząstki 22 m μ zostają rozbite w cząstki 7 m μ (13). Chociaż kwas nukleinowy w środowisku kwaśnym w przeciwieństwie do kompletnego wirusa jest stabilny, nie wywołuje on infekcji, gdyż w zwykłej temperaturze jest bardzo chwiejny i ulega rozkładowi przez ferment rybonukleazę komórkową (cyt. za 23). W ten sposób kwaśne środowisko przez rozbicie otoczki proteinowej działa inaktywująco na wirus pryszczycy.

Działanie temperatury. Podstawowym czynnikiem wpływającym na trwałość konserwacji wirusa jak i szczepionek jest odpowiednia temperatura. Dzięki zamrożeniu roztworów wirusowych, względnie pęcherzy pryszczycowych, wirus można przetrzymywać przez kilka lat w temperaturze od -40° do -70°C, bez straty infekcyjności. Wirus przechowuje się gorzej w temperaturze -15 do -40°C. Najlepsze warunki konserwacji zapewnia proces liofilizacji. Dzięki zamrożeniu i wysuszeniu w próżni można przechowywać wirus w 4°C co najmniej 1 rok bez straty miana infekcyjnego (8).

W miarę wzrastania temperatury wirus traci moc infekcyjną. W temperaturze od 10 do 15°C

wirus utrzymuje się miesiącami, w 20 — 25°C tygodniami. Temperatury do 43°C wywierają wpływ głównie na RNA, dlatego wirus traci infekcyjność, ale zachowuje immunogenność. Temperatury wyższe działają na białko. W 56°C cząstki 22 m μ rozpadają się w cząstki 7 m μ uwalniając RNA ze stratą mocy immunogennej (Bachrach cyt. za 8).

Dimopoulos i wsp. (4) wykazali obecność żywego, resztkowego wirusa w zawiesinach pęcherzy pryszczycowych bydła przetrzymywanych przez 6 godzin w 70°C. Przy użyciu dużej dawki inokulatu autorzy wyizolowali infekcyjny wirus jeszcze po 4 godzinach działania 85°C. Znaczna wytrzymałość wirusa na działanie ciepła przysparza wiele kłopotu przy sterylizacji ścieków w laboratoriach operujących zarazkiem pryszczycy.

Działanie promieni ultrafioletowych i ultradźwięków. Promienie ultrafioletowe wywołują różną inaktywację, w zależności od długości fali. Po napromieniowaniu wirus zachowuje właściwości wiązania dopełniacza i seroprecypitacji. Metoda inaktywacji wirusa przez promienie ultrafioletowe nie znalazła zastosowania przy produkcji szczepionki przeciwpryszczycowej, ale jest powszechnie stosowana do dezynfekcji pomieszczeń laboratoryjnych (8).

Ultradźwięki o energii 33 watów przy 960 kHz zastosowane do lepszej ekstrakcji wirusa z tkanek nie niszczyły zarazka w ciągu 4 godzin (Girard, Maćkowiak cyt. za 8).

Działanie pH. Wirus pryszczycy jest jednym z najbardziej wrażliwych wirusów na zmianę koncentracji jonów wodorowych środowiska. Optymalne warunki stabilności zapewnia zarazkowi pH od 7,0 do 7,8 (1, 20, 24, 26). Zmiana pH w kierunku kwaśnym poniżej 6,0 powoduje szybką inaktywację zarazka. Bachrach i wsp. (1) stwierdzili przetrwanie milionowej części populacji wirusa przez 60 minut przy pH 6,0. W środowisku o pH 3—4 nie stwierdzono żadnej infekcyjności już po 15 sekundach. W strefie pH 8—9 strata infekcyjności jest bardzo powolna, a wirus utrzymuje się kilka tygodni. W miarę wzrastania alkaliczności następuje przyspieszenie inaktywacji. Przy pH 10 wirus zachowuje infekcyjność w ciągu kilku dni. W środowisku o pH 11 inaktywacja następuje w czasie kilku minut. Dopiero pH 13—14 niszczy całkowicie wirus w ciągu jednej — dwóch minut (23).

Działanie środków chemicznych. Ogólnie można powiedzieć, że spośród środków dezynfekcyjnych najbardziej skuteczne są te, których działanie powoduje największe zmiany odczynowe w kierunku alkalicznym lub kwaśnym.

Z licznej grupy środków chemicznych, które cechują się działaniem wirusobójczym na wirus pryszczycy, praktyczne zastosowanie do odka-

żania znalazły: soda żrąca, węglan sodu, krzemian sodu, wapno chlorowane, wapno świeżo gaszone, formol, kwas cytrynowy, kwas mlekowy, kwas octowy, kwas siarkowy.

Soda żrąca jest jednym z najstarszych i najskuteczniejszych środków odkażających. Jej zaletą jest szybkie i pewne unieczynnienie wirusa, natomiast wadą zbyt silne działanie żrące w następstwie którego przy wielokrotnym jej stosowaniu dochodzi do uszkodzenia naskórka rąk oraz przedmiotów dezynfekowanych. Roztwór ługu sodowego o pH 13—14 zabija wirus pryszczycy w ciągu jednej minuty. W warunkach odkażania zimowego dla obniżenia punktu zamarzania roztworu sody Poljakow i Nauryzbajew (17) oraz Boczarow (2) polecają dodawać przy temperaturze poniżej 15°C 15%, natomiast przy -5 do -15°C 10% chlorku sodu. 5% gorący roztwór węglanu sodu zabija wirus w ciągu 15 minut, natomiast soda o temperaturze pokojowej niszczy wirus zawarty w tkance po 4 godzinach.

Formalina jest znacznie słabszym środkiem odkażającym niż soda żrąca. W rozcieńczeniu 1:50 inaktywuje wirus pryszczycy w płynie pęcherzowym po 3 godzinach. Do unieczynnienia wirusa w tkance trzeba użyć rozcieńczenia 1:20 (6). 10% formalina zabija wirus z hodowli komórkowej po 10 minutach (23). 2% roztwór formaldehydu znalazł zastosowanie do dezynfekcji pomieszczeń w postaci aerosolu w dawce 15 ml na 1 m³. Po odkażaniu pomieszczenie musi być zamknięte przez 24 godziny (10, 17, 23). Rozow stosował roztwór formolu z dodatkiem chlorofosu, bądź trójchlorometafosu w koncentracji 0,2%. Działanie wirusobójcze występowało po 1 godzinie, natomiast insektobójcze po 5 minutowym kontakcie z dezynfekowaną powierzchnią (18).

Do dezynfekcji paszowego ziarna zakażonego wirusem Nauryzbajew poleca 0,8% roztwór formaldehydu w ilości 10 l na 100 kg ziarna. Po zastosowaniu środka odkażającego ziarno musi być przykryte brezentem, a po 24 godzinach dokładnie przewietrzone (14). Mleko wapienne używane do dezynfekcji ma wartość wówczas, gdy jest przygotowywane ze świeżego gaszonego wapna. Wodorotlenek wapniowy posiadający działanie wirusobójcze łatwo wchłania dwutlenek węgla z powietrza i przetwarza się w węglan wapniowy pozbawiony właściwości odkażających (19).

Spśród preparatów chlorowych zastosowanie do dezynfekcji znalazły podchloryn sodu, wapno chlorowane i chloramina (6, 19, 22). Preparaty te ze względu na silny i nieprzyjemny zapach mają ograniczone zastosowanie, gdyż nie mogą być używane w pomieszczeniach gdzie przebywają zwierzęta. Środki odkażające zawierające chlor znalazły zastosowanie do dezynfekcji ścieków (12).

Podchloryn sodu szybko unieszkodliwia wirus pryszczycy, ale zawartość substancji organicznych w środowisku zmniejsza jego aktywność (22). Do odkażania stosowane są również roztwory kwasów jak np.: mlekowego, cytrynowego, siarkowego (7, 11, 15, 22).

Działanie detergentów. Wirus pryszczycy wolny od lipidów nie wykazuje wrażliwości na działanie detergentów (22). Zarówno detergenty anionowe np. siarczan dodecyłu sodu oraz kationowe jak bromek cetylotrimetylamonowy, bądź niejonowe jak Tween 80 nie wywierają działania wirusobójczego (8). Detergenty powodują zmniejszenie napięcia powierzchniowego, zwiększenie nawilżania i chociaż nie działają odkażająco na wirus pryszczycy to rozpraszają jego skupiska. Dodatek detergentu do roztworu kwasu cytrynowego lub octowego, używanych do odkażania rąk, nie osłabiał ich działania dezynfekcyjnego, a przeciwdziałał szorstkości naskórka (22).

Działanie środków inaktywujących, używanych do produkcji szczepionki. Najczęściej używanym środkiem inaktywującym w produkcji szczepionek przeciwpryszczycowych jest formalina. Czas inaktywacji szczepionki jest funkcją koncentracji formolu, temperatury, preparatu wiralnego oraz pH. W temperaturze 4°C inaktywacja jest bardzo powolna. Najczęściej szczepionki inaktywuje się dawką 0,05% formolu, w temperaturze 26°C w ciągu 48 godzin. Po zawartości w szczepionce znacznych ilości substancji organicznych (białka), inaktywacja wirusa może być niekompletna. Wodorotlenek glinu zawarty w szczepionce wzmacnia działanie inaktywujące formaliny (6).

Od kilku lat w produkcji szczepionek znalazły także zastosowanie inne czynniki inaktywujące. Wymienić tu należy acetyletylenaminę (AEI), stosowaną w dawce 0,05%, w temperaturze 37°C przy pH 7,6, która inaktywuje wirus pryszczycy w kilka godzin. Czynnikiem ten działa na RNA, a nie na wiralne białko immunogenne. Beta-propiolaktone (BPL) inaktywuje wirus pryszczycy w stężeniu 0,02–0,05% (8, 21, 25). Inaktywacja niezależna jest od początkowej infekcyjności wirusa. Szybkość inaktywacji wzrasta wraz z temperaturą, a maleje w obecności znacznego poziomu białka i alkalicznego pH. Beta-propiolaktone działa na kwas nukleinowy wirusa i przedstawia tę korzyść, że znika samoczynnie przez hydrolizę w czasie inaktywacji. Szczepionki z beta-propiolaktone, podobnie jak szczepionki inaktywowane acetyletylenaminą, są co najmniej tak skuteczne jak szczepionki z formaliną (5, 6, 25). Martinsen stwierdził, że glicydaldehyd inaktywuje wirus pryszczycy już w dawce 0,01% przy 37°C w przeciągu 2 godzin (cyt. za 8).

Porównując wyniki badań różnych autorów nad działaniem czynników fizycznych i chemicznych na wirus pryszczycy stwierdza się

niekiedy znaczne rozbieżności. Przyczyną tego może być różne pochodzenie wirusa, stopień jego oczyszczenia, płyny użyte do ekstrakcji, metody badania, rodzaj żywiciela, droga inokulacji, wielkość inokulatu itp. Wirus zawarty w środowisku bogatym w białko jak np. we krwi, surowicy, mleku będzie inaktywowany wolniej (6, 8, 22, 23). Białko absorbuje część środka odkażającego i zmniejsza w ten sposób jego natężenie, ponadto białko działa jako koloid ochronny dla wirusa. Wilgoć wpływa na przyspieszenie inaktywacji wirusa, wysuszenie hamuje ją. W czasie produkcji suszonego mleka wirus wytrzymał działanie 140°C i przetrwał dwa lata (16). Zarazek pryszczycy w suchym mleku uległ inaktywacji dopiero po 30 minutach działania temperatury 120°C. (cyt. za 23).

Szybkość inaktywacji jest uzależniona także od właściwości specyficznych wirusa. Jedne szczepy cechują się dużą wrażliwością na temperaturę ulegając inaktywacji w 50°C po 1 godzinie, inne dopiero po kilku godzinach. Wittmann podaje, że w populacji wirusa istnieje bardzo mała ilość cząstek opornych na działanie ciepła, pH i formaliny, które dadzą się wyrazić stosunkiem 1:10 000 — 1:1 000 000. Z wirusa inaktywowanego przez 5 do 7 godzin w 50°C wyizolowano mutanty odporne na temperaturę, które uległy zniszczeniu dopiero po 17 godzinach. Bachrach stwierdził oporność jedno milionowej populacji wirusa w środowisku o pH 6,0. Według Wittmanna takie mutanty wirusa odporne na temperaturę, pH czy chemikalia mogą być przyczyną niekompletnej inaktywacji szczepionki lub niepełnej dezynfekcji.

Piśmiennictwo

1. Bachrach H., Breese S., Callis J., Hess W., Patty R.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 95, 147, 1957.
2. Boczarow D.: Veterinarija, Moskwa, 41, 99, 1964.
3. Dimopoulos G.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 83, 706, 1960.
4. Dimopoulos G., Fellowes O., Callis J., Poppensiek G., Edward A., Graves J.: Am. J. vet. Res. 20, 510, 1959.
5. Fayet M., Petermann H., Fontaine J., Terre J., Roumiantzeff M.: Annls. Inst. Pasteur, Paris 112, 1, 65, 1967.
6. Fellowes O.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 83, 595, 1960.
7. Gorskij B., Gizatullin H.: Veterinarija, Moskwa, 44, 98, 1968.
8. Joubert L., Mackowiak C.: La Fièvre Aphteuse. Expansion Scientifique Française, 1968.
9. Instrukcja w sprawie zwaczania pryszczycy, PWRL, 1966.
10. Krasnoszczekow W., Ustenko W.: Trudy Vses. Inst. Vet. Sanit. 18, 143, 1962.
11. Lucam F., Dannacher G., Fedida M.: Bull. Off. int. Epizoot. 61, 1589, 1964.
12. Muntiu N.: Informacje ustne.
13. Mussgay M.: Mh. Vet.-Med., 11, 185, 1959.
14. Nauryzbajew I.: Trudy Vses. Inst. Vet. Sanit. 29, 485, 1967.
15. Niggli J.: Schweizer. Arch. Tierheilk. 98, 393, 1956.
16. Nikitin E., Wladimirov A.: Veterinarija, 42, 99, 1965.
17. Poljakow A., Nauryzbajew N.: Vest. sel.-choz. Nauki Mosk. 98, 1968.
18. Rozow A.: Trudy Vses. Inst. Vet. Sanit. 26, 229, 1966.
19. Rozow A.: Veterinarija, Moskwa, 42, 94, 1966.
20. Röhrer H., Pyl G.: Handbuch der Virusforschung, 4, 379, 1958.
21. Röhrer H.: Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Veb Gustav Fischer Verlag Jena.
22. Sellers R.: Vet. Rec. 83, 504, 1968.
23. Wittmann G.: Schweizer Arch. Tierheilk. 109, 313, 1967.
24. Wittmann G.: Mh. Tierheilk. 9, 215, 1957.
25. Wiśniewski J., Baranowski C., Jankowska J., Kobusiewicz T., Szkiłnik S.: Medycyna Wet. 26, 346, 1970.
26. Wiśniewski J.: Pol. Arch. wet. 11, 227, 1968.

Adres autora: dr Jerzy Wiśniewski, Zduńska Wola, ul. Wodna 7.