

72. Z. ORFEI, A. D'AMORE, L. RAVAIOLI, V. MAZZARACCHIO e B. CASTAGNOLI.
**Il virus aftoso su coltura di tessuti "in vitro", - VII. Resistenza
alle variazioni di pH e temperatura.**

Riassunto. — Viene saggiata la resistenza del virus aftoso, coltivato su cellule renali tripsinizzate di suino alle variazioni di pH (da pH 1,7 a pH 11,2) e di temperatura (4°C. - 22°C. - 37°C. - 56°C.).

I risultati e le conclusioni che gli Autori traggono da tali esperienze sono:

1) il virus viene distrutto in pochi secondi nella zona del pH acido (da pH 1,70 a pH 6,10) mentre resiste senza manifestare alcuna alterazione per 30' nella zona lievemente acida, neutra ed alcalina (da pH 6,15 a pH 9,60). A pH fortemente alcalino (pH 11,20) si ha inattivazione in pochi minuti;

2) la resistenza dell'attività infettante del virus al calore varia nel tempo in relazione all'aumento della temperatura; è massima a 4°C. (fino a 13 settimane) e minima a 56°C. (fino a 25').

Résumé. — On essaie la résistance aux variations de pH (de pH 1,7 à pH 11,2) et de température (4°C - 22°C - 37°C - 56°C), du virus aphteux cultivé sur des cellules rénales de porc tripsinisées. Les résultats et les conclusions auxquels le auteurs sont parvenus par ces expériences sont les suivants:

1) le virus est détruit en quelques secondes dans la zone du pH acide (de pH 1,70 à pH 6,10) tandis qu'il résiste pendant 30' sans manifester aucune variation, dans la zone légèrement acide, neutre et alcaline (de pH 6,15 à pH 9,60). Si le pH est très alcalin (pH 11,20) l'inactivation se vérifie dans quelques minutes;

2) la résistance à la chaleur de l'activité infectante du virus, varie dans le temps par rapport à l'augmentation de la température: à 4°C elle atteint son maximum (jusqu'à 13 semaines) et à 56°C son minimum (jusqu'à 25').

Summary. - The resistance of foot and mouth disease virus, grown on trypsinised porcine kidney cells, to variations of pH (from pH 1.7 to pH 11.2) and temperature (4° - 22° - 37° - 56°) has been tested.

The results and conclusions drawn from these experiments are:

1) The virus is destroyed in a few seconds in the acid pH zone (from pH 1.70 to pH 6.10), but resists 30 min. in the feebly acid neutral

and alkaline zone (from pH 6.15 to pH 9.60) without showing any change. A strongly alkaline pH (pH 11.20) causes inactivation within a few minutes.

2) The resistance of the infective capacity of the virus to heat varies in time with respect to the increase in temperature. It is maximal at 4° (up to 13 weeks) and minimal at 56° (up to 25 min.).

Zusammenfassung. — Die Widerstandsfähigkeit des auf tripsinisierten Schweinsnierenzellen gezüchteten Virus der Maul und Klauenseuche gegenüber Schwankungen des pH (von pH 4,7 bis pH 11,2) und der Temperatur (4°C - 22°C - 37°C - 56°C) wird untersucht.

Die Ergebnisse und die von den Verfassern gezogenen Schlüsse sind:

1) der Virus wird in der sauren Zone des pH (pH 4,70 - pH 6,40) innerhalb weniger Sekunden zerstört, während er in der leicht sauren, in der neutralen und der leicht alkalischen Zone (pH 6,45 - pH 9,60) nach 30 Minuten keinerlei Veränderungen aufweist. In der stark alkalischen Zone (pH 11,20) wird er innerhalb weniger Minuten wirkungslos;

2) das Ansteckungsvermögen des Virus erhält sich je nach der Temperatur verschiedenermassen lang; die längste Erhaltung hat man bei 4°C (bis 13 Wochen) die kürzeste bei 56°C (bis 25 Minuten).

Il virus aftoso viene considerato un agente infettivo molto resistente. Solo in tale maniera infatti si spiega la sua diffusione e la sua permanenza nell'ambiente per lunghi periodi di tempo. Le ricerche di laboratorio condotte fino a qualche anno fa hanno confermato in gran parte tale concetto. Va però tenuto presente che queste ricerche erano eseguite con materiali molto eterogenei quali linfa, vescicole, latte, epiteli, escreti e secreti varii, tutte sostanze queste che possono proteggere per lungo tempo il virus dagli agenti esterni alterando e modificando in maniera sensibilissima la reale resistenza dell'agente infettivo. Tutto ciò e la difficoltà di una esatta titolazione « in vivo » era causa di risultati non sempre concordi ed alle volte addirittura contrastanti ⁽¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁾.

Solo recentemente la coltura di tessuti « in vitro » si è dimostrata un sistema molto sensibile per una esatta valutazione delle resistenze del virus. BACHRACH e Coll. ⁽⁷⁾, usando colture di cellule renali tripsinizzate di bovino, hanno saggiato la resistenza del virus aftoso verso alcuni agenti fisico-chimici.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di apportare un contributo a queste ricerche saggiando la resistenza del virus aftoso a concentrazioni idrogenioniche diverse ed a varie temperature.

MATERIALE E METODO

Virus. - Il virus impiegato è il tipo « O » coltivato su colture di cellule renali tripsinizzate di suino in fiasche di Roux secondo la tecnica già descritta da uno di noi ⁽⁸⁾. Il virus, con dose citopatogena ₅₀ (TCID₅₀) di $10^5/0,1$ cm³ occorrente per le esperienze, è stato raccolto dopo 18 ore di sviluppo, distribuito in fiale e conservato a -25°C .

pH usati. - Per portare la sospensione virale (pH 8) alla concentrazione di ioni idrogeno desiderata si sono usate diverse soluzioni tampone: per valori di pH da 1,25 a 3,10 e da 8,58 a 11 si è usato un tampone alla glococolla (secondo Sørensen) M/10; per valori di pH da 5,20 a 8 un tampone di fosfati (KH_2PO_4 ed $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) M/15; per valore di pH 11,4 si è usata la soluzione « Titrisol » Merck.

Tali diverse soluzioni aggiunte in volumi uguali alla sospensione virale, ci hanno permesso di saggiare valori di pH uguali a 1,70 - 2,50 - 3,10 - 4 - 6,10 - 6,15 - 6,20 - 6,40 - 6,80 - 6,90 - 7,30 - 7,90 - 8,20 - 8,50 - 8,70 - 8,90 - 9,20 - 9,60 - 11,20. I valori di pH sono stati determinati con apparecchio Metrohm Ag. E 150 A.

Tali mescolanze, dopo un contatto a temperatura ambiente (22°C circa) di 1' - 5' - 10' - 20' - 30', sono state inoculate in 5 tubi per ciascun valore di pH e di tempo nella quantità di 0,2 cm³ per tubo-cultura. Contemporaneamente sono stati eseguiti controlli inoculando tubi con soluzione tampone ai diversi pH saggiati e tubi con solo virus. Le letture dei tubi-cultura si sono eseguite dopo 24-48-72 ore dalla inoculazione.

Temperature. - Le temperature saggiate sono state: 4° , 22° , 37° , 56°C per tempi diversi. L'attività del virus veniva quindi titolata su tubi-cultura inoculati (cm³ 0,1) con diluizioni scalari in base 10. Le letture sono state eseguite dopo 24-48-72 ore ed il titolo calcolato secondo il metodo di REED e MUENCH ⁽⁹⁾.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

L'inattivazione del virus aftoso a variazioni del pH si manifesta, in base alle nostre esperienze, in una ristretta zona del pH acido ed esattamente tra pH 6,10 e 6,20. In tale zona infatti si ha inattivazione

totale del virus in pochi secondi e tale rapida inattivazione si mantiene in tutta la zona acida (da pH 1,70 a pH 6,10). Oltre pH 6,20 in tutta la zona neutra ed alcalina fino a valori di pH 9,60 il virus resiste senza manifestare alcuna alterazione per 30'. A pH 11,20 l'inattivazione totale del virus si manifesta dopo 10'. (Vedi tab. N. 1).

TABELLA N. 1.

Resistenze a diversi pH

pH	Effetto citopatogeno						
	tempo in minuti						
	30"	1'	2'	5'	10'	20'	30'
1,70	—						
2,50	—						
3,10	—						
4,00	—						
6,10	—						
6,15	+	+	+	+	+	+	+
6,20	+	+	+	+	+	+	+
6,30	+	+	+	+	+	+	+
6,40	+	+	+	+	+	+	+
6,80	+	+	+	+	+	+	+
7,30	+	+	+	+	+	+	+
7,90	+	+	+	+	+	+	+
8,20	+	+	+	+	+	+	+
8,50	+	+	+	+	+	+	+
8,70	+	+	+	+	+	+	+
8,90	+	+	+	+	+	+	+
9,20	+	+	+	+	+	+	+
9,60	+	+	+	+	+	+	+
11,20	+	+	+	+	—	—	—

+ effetto citopatogeno

— assenza di effetto citopatogeno

I nostri risultati concordano in linea di massima con quelli di BACHRACH e Coll. (7). Essi notano infatti come la massima stabilità del virus si abbia a valori di pH 7-7,5 per periodi di tempo assai lunghi (più di 5 settimane a 4°C) e come l'inattivazione del virus avvenga meno lentamente (da 1 a 3 settimane) nella zona tra pH 8 e pH 9, mentre nella zona anche solo lievemente acida (pH 6-5) l'inattivazione del 90% dell'attività virale si manifesta in pochi minuti. A pH nettamente acido (pH 2-3-4) l'inattivazione è totale ed istantanea. I risultati di BACHRACH (7) ed i nostri contrastano con quanto riferiscono RANDRUP (10) ed altri Autori (2-4) che, con tessuti epiteliali infetti di bovino e cavia, avrebbero constatato la massima stabilità del virus aftoso a pH 7,6 ed a pH 3.

Le temperature prese in considerazione per saggiare la resistenza al calore del virus aftoso sono state scelte fra quelle più frequentemente usate in laboratorio: cioè 4°C (frigorifero), 22°C (ambiente), 37°C (termostato) e 56°C (bagno-maria).

Da queste esperienze è risultato che: a 4°C l'attività infettante si mantiene costantemente uguale al titolo originale del virus (10^{-5}) fino alla terza settimana, per poi decrescere fino ad inattivazione quasi completa alla tredicesima settimana ($10^{-1,48}$); a 22°C il titolo infettante diminuisce gradatamente dalla quindicesima ($10^{-4,5}$) alla centonovantaduesima ora, raggiungendo un titolo inferiore a 10^{-1} ; a 37°C in sei ore si ha già diminuita attività ed in ventisettesima ora l'inattivazione è quasi completa; a 56°C l'inattivazione del virus è molto rapida: dopo 5' il titolo infettante è $10^{-3,26}$ e dopo 30' l'inattivazione è totale. I risultati completi sono riportati nella tabella N. 2.

TABELLA N. 2.

Resistenze a diverse temperature

Titolazione del virus a + 4° C		Titolazione del virus a 22° C		Titolazione del virus a 37° C		Titolazione del virus a 56° C	
Giorni	Titolo del virus	Ore	Titolo del virus	Ore	Titolo del virus	Minuti primi	Titolo del virus
1	10^{-5}	5	$10^{-4,66}$	2,30	10^{-5}	5	$10^{-3,26}$
2	10^{-5}	8,30	$10^{-4,66}$	6	$10^{-4,50}$	10	$10^{-2,50}$
4	10^{-5}	15	$10^{-4,50}$	8,30	$10^{-4,50}$	15	$10^{-1,66}$
6	10^{-5}	22	$10^{-4,25}$	13	$10^{-3,00}$	20	10^{-1}
8	$10^{-4,83}$	30,30	$10^{-4,25}$	17	$10^{-2,74}$	25	10^{-1}
12	$10^{-4,83}$	48	$10^{-3,74}$	24	$10^{-1,74}$	30	—
14	10^{-5}	72	$10^{-3,74}$	27	$< 10^{-1}$		
18	$10^{-4,83}$	96	$10^{-3,50}$				
21	$10^{-4,66}$	120	$10^{-2,74}$				
35	$10^{-4,66}$	144	$10^{-2,24}$				
49	$10^{-4,50}$	168	$10^{-1,50}$				
63	10^{-3}	192	$< 10^{-1}$				
77	$10^{-2,48}$						
91	$10^{-1,48}$						

I nostri dati non variano in modo sensibile da quelli di BACHRACH e Coll. (7). Essi infatti ottengono l'inattivazione del 90% del virus a 4°C in 18 settimane, a 20°C in 11 giorni, a 37°C in 21 ore ed a 55°C in 2'.

Dalle nostre esperienze ci è possibile concludere che l'attività del virus aftoso è nettamente distrutta dai pH inferiori a 6,10, ciò che lo differenzia nettamente dai virus poliomielitici che sono ancora stabili a pH 1,50 ⁽¹¹⁻¹²⁾.

La resistenza del virus al calore è da considerarsi elevata a 4°C ed essa va gradatamente diminuendo con l'elevarsi della temperatura

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) HUTYRA F., MAREK J., MANNINGER R. - Patologia Speciale e Terapia degli Animali Domestici - Vallardi III Ed. vol. 4, pag. 333 (1949).
 - (²) LEVADITI C., LÉPINE P., VERGE J. - Les Ultravirus des Maladies Animales - Maloine Paris - pag. 301 (1943).
 - (³) VERDE B. - I Virus Filtrabili in Patologia Umana. - Ist. Sier. Mil. (1948).
 - (⁴) RIVERS T. M. - Viral and Rickettsial Infections of Man - II Ed. Lippincott - London, pag. 665 (1952).
 - (⁵) CURASSON G. - Maladies Infectieuses des Animaux Domestiques. - Vigot Frères Ed., Paris, pag. 167 (1946).
 - (⁶) STAZZI P., MIRRI A. - Malattie Infettive degli Animali Domestici. - XI Ed., Ist. Zoop., Palermo (1956).
 - (⁷) BACHRACH H. L., BREESE S. S., CALLIS J. J., HESS V. R., PATTY R. E. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95: 147 (1957).
 - (⁸) ORFEI Z. - Zooprofilassi, 11: 285 (1956).
 - (⁹) REED L. J., MUENCH H. - Am. J. J. Hyg., 27: 493 (1938).
 - (¹⁰) RANDRUP A. - Physico Chemical and Immunological Studies in the Virus of Foot-and-Mouth Disease and its Host Tissue Microsomes - Eynar Munksgaard, Copenhagen (1957).
 - (¹¹) BACHRACH H. L., SCHWERDT C. E. - J. Immunol., 69: 551 (1952).
 - (¹²) ALMEN L., KARZON T. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94: 393 (1957).
-